



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Marcadors de progressió/regressió de les lesions premalignes de baix grau del cèrvix uterí

Marta del Pino Saladrigues

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Marcadors de
progressió/regressió de
les lesions premalignes
de baix grau del cèrvix
uterí**

Marta del Pino Saladrigues

Juny 2009

**Departament de Ginecologia, Obstetricia, Pediatria, Radiologia
i Anatomia Humana**

Programa: **Ginecologia i Obstetricia**

Bienni: **2005-2007**

Títol de la tesi:

**Marcadors de progressió/regressió de les lesions premalignes
de baix grau del cèrvix uterí**

Marta del Pino Saladrigues

Directors:

Aureli Torné Bladé

Jaume Ordi Majà

ÍNDEX

Llista d'abreviacions utilitzades.	. 01
I. INTRODUCCIÓ	. 03
1. Importància del càncer de cèrvix.	. 05
2. Importància de les lesions precursors i conducta clínica.	. 06
3. El VPH com agent etiopatogènic de neoplàsies del tracte anogenital.	. 09
3.1. Epidemiologia de la infecció per VPH.	. 09
3.2. Paper del Virus del Papil·loma Humà en el càncer de cèrvix i les seves lesions precursors.	. 12
3.3. Estructura i tipus virals	. 13
3.4. Mecanismes de carcinogènesi del VPH.	. 15
3.5. Expressió de p16INK4a com a marcador de activitat oncogènica de VPH d'alt risc.	. 19
4. Comportament les lesions precursors del càncer de coll d'úter.	. 21
4.1. Cofactors de progressió.	. 21
4.1.1. Cofactors de persistència-progressió vírics.	. 22
4.1.2. Cofactors de persistència-progressió genètics.	. 25
4.1.3. Cofactors de persistència-progressió mediambientals.	. 26
4.2. Cofactors d' invasió.	. 29
5. El cribatge i diagnòstic de les lesions precursors del càncer de coll d'úter	. 30
5.1. Citologia cervical.	. 30
5.2. Citologia líquida.	. 34
5.3. Colposcòpia.	. 34
5.4. Estudi histològic.	. 36
5.5. Mètodes de detecció del VPH.	. 37

5.5.1. Mètodes morfològics. 37
5.5.2. Mètodes de detecció de proteïnes virals (immunohistoquímic). 37
5.5.3. Mètodes de biologia molecular - detecció de seqüències genòmiques del VPH 38
5.5.3.1. Hibridació <i>in situ</i> 39
5.5.3.2. Captura d'híbrids. 40
5.5.3.3. La Reacció en cadena de la polimerasa. 41
5.5.3.4. Expressió del ARNm dels oncogens E6 y E7). 44
5.6. Marcadors moleculars cel·lulars d' activitat oncogènica de VPH-AR. 45
5.6.1. p16 ^{INK4A} 45
5.6.2. Altres marcadors moleculars: CDC6, MCM5, Ki67. 46
6. Maneig de les lesions precursors del càncer de coll d'úter 48
6.1. Tractament de les lesions escatoses d'alt grau i seguiment posterior. 48
6.2. Tractament de les lesions escatoses de baix grau i seguiment posterior 52
7. Vacunes profilàctiques per a la infecció de determinats VPH. 55
II. HIPÒTESI DE TREBALL. 59
III. OBJECTIUS. 63
IV. TREBALLS REALITZATS, MÈTODES I RESULTATS. 67
<u>ESTUDI 1.</u> Progression to CIN2-3 of High Risk-Human Papillomavirus positive women: do negative, ASC-US or LSIL cytological result imply a different risk?. Int J Cancer (Submitted). 71
<u>ESTUDI 2.</u> p16INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women . Int J of Gynecological Pathology 2009;28:90-7. 101
<u>ESTUDI 3.</u> Value of p16INK4a as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade1. Am J Obstet Gynecol (in press). 111
V. DISCUSSIÓ GENERAL. 139
VI. CONCLUSIONS. 157

LLISTA D'ABREVIACIONS UTILITZADES

ASC-US: Atípia de cèl·lules escatoses de significat incert

ASC-H: Atípia de cèl·lules escatoses que no descarta lesió d'alt grau

CC: Citologia cervical

CIN: neoplàsies cervicals intraepitelials (en anglès *cervical intraepithelial neoplasia*)

CIS: Carcinoma *in situ*

CV: Càrrega viral

HC2: Captura d'híbrids de segona generació

HAART: Triple teràpia antiretroviral (de l'anglès *Highly Active Antiretroviral Therapy*)

HC2: Captura d'híbrids de segona generació

HLA: antígen leucocitari humà

HSIL: lesions escamoses intraepitelials d'alt grau (de l'anglès *high grade squamous intraepithelial lesion*)

LSIL: lesions escamoses intraepitelials de baix grau (de l'anglès *low grade squamous intraepithelial lesion*)

MTS: Malalties de Transmissió Sexual

SIL: lesions escamoses intraepitelials (de l'anglès *squamous intraepithelial lesion*)

URL: Unitats relatives de llum

VEGF: Factor de creixement de l'endoteli vascular

VHS: Virus de l'Herpes Simple

VIH: Virus de la Immunodeficiència Humana

VPH: Virus del Papiloma Humà

VPH-AR: Virus del Papiloma humà d'alt risc oncogènic

VPN: Valor Predictiu Negatiu

VPP: Valor Predictiu Positiu

I. INTRODUCCIÓ

1. Importància del càncer de cèrvix

El càncer de cèrvix és la segona causa de mort per càncer al món entre les dones, amb uns 500.000 nous casos cada any i al voltant de 260.000 morts anuals (Castellsagué, 2008). La seva incidència varia entre 1-50 casos per cada 100.000 dones, sent més elevada a l'Amèrica Llatina, el Carib, l'Àfrica Subsahariana, Melanèsia i el Sud-est asiàtic (WHO 2009). En països en vies de desenvolupament suposa fins al 25% de les neoplàsies. I el 60% dels casos incidents seran dones que moriran degut a un diagnòstic tardà.

Més del 80% d'aquests càncers són carcinomes escamosos, desenvolupats a partir de lesions precursors intraepitelials. La detecció de lesions precursors mitjançant citologia ha permès disminuir considerablement la incidència i mortalitat d'aquest càncer en països amb cribatge poblacional. Malgrat tot, a Europa cada any es diagnostiquen uns 60.000 nous casos, sent el 4^o càncer més freqüent i la 7^a causa de mort per càncer.

A principis del segle passat es va reconèixer la infecció pel virus del papil·loma humà (VPH) com a causa necessària del carcinoma de cèrvix i les seves lesions precursors (zur Hausen et al, 1974; zur Hausen, 1976). El desenvolupament d'anàlisis moleculars, la confirmació de la pluralitat del VPH, l'estructura i l'organització del genoma, i el seu paper en el desenvolupament d'alguns càncers humà van ser intensament estudiats en els anys 70 i 80. Aquests estudis van rebre un fort impuls arrel de les hipòtesis que postulaven que certs membres de la família del VPH tenien algun paper en el càncer de coll uterí (Durst et al, 1983) i la troballa d'alguns tipus de VPH en càncers cutanis que es produïen en el context d'una malaltia genètica poc habitual:

l'epidermodisplàsia verruciforme. Més endavant el descobriment de diferents genotips de VPH en el càncer de coll uterí i altres càncers anogenitals i en les lesions precursors d'aquests van donar lloc a un fort auge en l'activitat investigadora. A finals dels anys 80 s'havia acumulat un volum important de coneixements, i les dades experimentals disponibles llavors ja suggerien que la infecció per determinats VPH d'alt risc oncogènic (VPH-AR) era una condició necessària per al desenvolupament de propietats de creixement i fenotip maligne en les cèl·lules del càncer de cèrvix, relació que es va acabar de confirmar en estudis posteriors (Bosch, 1995; Walboomers et al, 1999; Bosch et al, 2002).

Més tard es va despertar l'interès per relacionar la infecció pel VPH amb altres neoplàsies del tracte genital inferior tant femení com masculí. Així es va comprovar la participació d'aquest virus en un percentatge important dels càncers de vagina, vulva, anus i penis.

2. Importància de les lesions precursors del càncer de cèrvix i conducta clínica

Des de les primeres dècades del segle XX sabem que pràcticament tots els càncers de cèrvix es desenvolupen sobre lesions precursors premalignes. Aquestes lesions es denominen neoplàsies cervicals intraepitelials (CIN, de l'anglès *cervical intraepithelial neoplasia*). La CIN es gradua segons la seva gravetat i el seu risc d'evolució a carcinoma invasor en CIN1, 2 i 3, aquesta última considerada equivalent del carcinoma *in situ*. Des de l'any 1989, la nomenclatura per descriure els resultats de la citologia, classifica les lesions

premaligues com lesions escamoses intraepitelials (SIL, de l'anglès *squamous intraepithelial lesion*), subclassificades com SIL de baix grau (LSIL *low grade-*

SIL) que inclou la CIN1, i SIL d'alt grau (HSIL, *high grade-SIL*) que inclou CIN2 i CIN 3 (Solomon et al, 2001).

El 60-80% de les lesions de CIN1/LSIL regressen espontàniament (representen canvis citopàtics d'una infecció aguda transitòria pel VPH) i només un petit percentatge d'entre 5-10% progressen a CIN2-3 (Nieh et al, 2005). La regressió és particularment freqüent de adolescents i dones joves, en aquest grup als 12 mesos han regressat el 61% (IC 95% 53-70) i als 36 mesos el 91% (IC 95%: 84-99) (Moscicki et al, 2004). Sembla que la probabilitat de regressió és menor en dones grans.

S'han realitzat molts estudis amb models *in vitro* per identificar els passos necessaris per la progressió de lesions intraepitelials a càncer i s'han descrit diverses alteracions gèniques possiblement implicades en la transformació maligna de les cèl·lules. Desgraciadament, avui dia no es disposa de cap mètode que diferenciï les pacients amb CIN1/LSIL que presentaran progressió a CIN2-3/HSIL o càncer. Les característiques histològiques de les lesions de baix grau no permeten diferenciar quina serà la seva evolució, continuem, doncs, desconeixent quines infeccions progressaran a lesió invasora i quines es resoldran espontàniament. Per aquest motiu avui dia totes les pacients amb lesions de baix grau són seguides de manera estricta fins la resolució de la infecció viral.

Ara bé, l'estudi exhaustiu de totes aquestes pacients representa un greu problema assistencial, per això, resulta actualment un objectiu prioritari en el

cribatge del càncer de cèrvix la identificació de biomarcadors moleculars capaços de diferenciar les veritables lesions precursors del carcinoma de les lesions transitòries que regressaran espontàniament.

El risc de transformació a carcinoma invasor de les lesions de CIN2-3/HSIL és molt més elevat (al voltant del 30% a curt termini). Per això, existeix consens en realitzar tractament escisional a les pacients amb CIN2-3/HSIL. Diferents estudis han mostrat també que, mentre que està clara la capacitat premaligna de les lesions de CIN3, les lesions de CIN2 constitueixen un veritable calaix de sastre, amb lesions properes a CIN1 amb tendència a la regressió, i veritables lesions premalignes similars a CIN3 (Nieh et al, 2005).

Els anàlisis virològics semblen evidenciar que l'aclariment de la infecció del VPH precedeix a la regressió dels canvis citològics (Nobbenhuis et al, 2001a; Dalstein, 2003). A l'any, la taxa acumulada d'aclariment de la infecció pel VPH va ser del 29% (IC 95%: 18-50), fet que va permetre predir la regressió de les alteracions en la citologia. Totes les dones que van resoldre la infecció pel VPH ho van fer dins dels 40 mesos de seguiment (Nobbenhuis et al, 2001b). La probabilitat del *clearenace* de la infecció disminueix amb la gravetat de la lesió intraepitelial.

3. El VPH com agent etiopatogènic de neoplàsies del tracte anogenital

3.1. Epidemiologia de la infecció per VPH

La infecció pel VPH és la infecció de transmissió sexual més freqüent, s'estima que sobre el 80% de les dones contacten amb el VPH al llarg de la vida.

La infecció per VPH s'adquireix freqüentment en els primers anys d'iniciar les relacions sexuals i el pic d'incidència acostuma a ocórrer entre els 16 i 20 anys d'edat. Tant la incidència com la prevalença de la infecció s'incrementa amb l'activitat sexual (Bosch et al, 2008). Els factors de risc associats a la infecció estan clarament relacionats amb la conducta sexual de l'individu: edat precoç en l'inici de les relacions, el nombre de companys sexuals, contacte amb individus d'alt risc (prostitutes). La circumcisió masculina i l'ús sistemàtic del preservatiu són factors que sembla que poden reduir el risc de transmissió sexual, tot i que existeix encara controvèrsia al respecte (Bleeker et al, 2003; Castellsagué et al, 2002; Winer et al, 2006; Shew et al, 2006).

Els òrgans més susceptibles d'infecció amb risc d'iniciar una transformació neoplàsica són el coll de l'úter i la línia pectínia del canal anal a través de l'epiteli metaplàstic de la unió escamo-cilíndrica. En aquesta unió les cèl·lules basals amb capacitat de replicació, i per tant susceptibles d'infecció viral, es troben en contacte amb la superfície. Freqüentment però les

infeccions s'estenen en llençol, fent possible llavors recuperar ADN viral de la vagina i la vulva en la dona i del gland, el prepuci i la pell, del penis i l'escrot, en l'home, així com la zona perianal en homes i dones. En totes aquestes àrees l'existència microerosions imperceptibles de la pell o la mucosa fan possible l'accés del virus a la capa basal i la subseqüent penetració en la cèl·lula epitelial.

La prevalença d'infeccions subclíniques, en edats de major activitat sexual, pot arribar a ser de fins a un 40% en la població femenina, tot i que en alguns grups de dones joves la infecció pot arribar a afectar un 70% dels individus (Moscicki et al, 1998). En edats més avançades aquesta es redueix a un 5%-10% (Myers et al, 2000). La gran majoria de les dones infectades (més del 90%) resolen la infecció de forma espontània. Només el petit grup de dones que es converteixen en portadores cròniques del VPH d'alt risc té un risc elevat de desenvolupar de lesions neoplàsiques del tracte genital (Castle et al, 2006).

Encara que aquesta infecció sigui necessària pel desenvolupament de la neoplàsia, aproximadament el 85-90% de les infeccions per VPH-AR són transitòries. La duració mitjana de les infeccions per VPH és d'uns 8-10 mesos pels tipus d'alt risc (Hopfl, 2000; Bosch et al, 2008), alguns tipus virals com el VPH-16 persisteix durant més temps (Burchell et al, 2006).

La infecció pel VPH és una infecció de la mucosa, en la que no existeix fase de disseminació hematògena, només un 50% de les dones infectades desenvolupen anticossos, que no necessàriament són anticossos neutralitzants capaç d'oferir defensa davant una nova infecció. Ara bé, la

resolució de la infecció sembla oferir un cert grau de protecció enfront de reinfeccions pel mateix tipus de VPH i s'ha descrit un cert grau d'immunitat creuada entre els tipus virals. Només un petit percentatge d'infeccions per VPH-AR progressen cap a la transformació maligna i la invasió. La progressió de les lesions precursors és un procés multifactorial en el que s'acaben produint múltiples alteracions que afecten l'estructura i expressió d'oncogens i gens supressors de tumors de la cèl·lula hoste infectada.

Els determinants coneguts de progressió són el tipus viral, la persistència de la infecció i la càrrega viral per unitat cel·lular i la integració de l'ADN víric en l'ADN cel·lular. Les infeccions per VIH constitueixen un factor de risc per a la infecció i la progressió neoplàsica. L'ús perllongat d'anticonceptius, l'alta paritat i el tabaquisme són factors addicionals establerts de progressió. I són possibles factors de progressió, les dietes pobres en fruita i verdura, i la co-infecció per altres MTS (en concret per *Chlamydia trachomatis* i pel VHS-2.)

En un percentatge important de dones la infecció pel VPH es manté en un estat latent, amb una reduïda activitat, sense o amb una mínima formació de virions complets. EN la infecció latent l'ADN víric resta en el nucli cel·lular en forma episomal. La replicació de l'ADN episomal en les infeccions latents només es dóna amb la replicació de l'ADN de la cèl·lula infectada en els estrats basals, per la qual cosa es produeixen molt poques còpies del virus. En aquesta forma d'infecció no es detecten alteracions citològiques ni histològiques i la presència del virus només pot detectar-se mitjançant tècniques moleculars.

3.2. Paper del Virus del Papil·loma Humà en el càncer de cèrvix i les seves lesions precursors

En els darrers anys s'han conegut els principals mecanismes biològics mitjançant els quals el VPH indueix càncer en humans i les bases genètiques i moleculars de la seva carcinogènesi (Kimono et al, 1998; Munger et al, 2001; Tringler et al, 2004): 1) s'ha identificat l'expressió de les proteïnes oncogèniques virals codificades pels gens E6 i E7 en teixit neoplàsic però no en teixit sa; 2) s'ha comprovat la capacitat transformadora d'aquestes oncoproteïnes per a bloquejar les proteïnes reguladores del cicle cel·lular (p53, pRb); i 3) s'ha demostrat que l'expressió mantinguda de E6 i E7 és un requisit indispensable per mantenir el fenotip maligne de les cèl·lules neoplàsiques.

La naturalesa causal de l'associació entre VPH i càncer de cèrvix es fonamenta, a més de en el coneixement de les bases moleculars que demostren el potencial carcinogen del VPH, en: 1) la detecció regular de ADN viral en les cèl·lules cancerígenes del coll uterí (pràcticament el 100% dels casos) i en les lesions precursors (95%-100%) i 2) els resultats de múltiples estudis epidemiològics realitzats en diferents poblacions i amb diferents dissenys, que demostren de forma coherent que la persistència per certs tipus virals són el principal factor de risc pel desenvolupament del càncer cervical.. Per altra banda, estudis prospectius evidencien que la infecció cervical persistent per virus d'alt risc precedeix l'aparició de CIN, i és necessària pel desenvolupament, el manteniment i la progressió d'aquestes lesions.

3.3. Estructura i tipus virals

El VPH pertany a la família dels *Papovaviridae*, està format per una molècula d'ADN circular dins d'una coberta proteica.

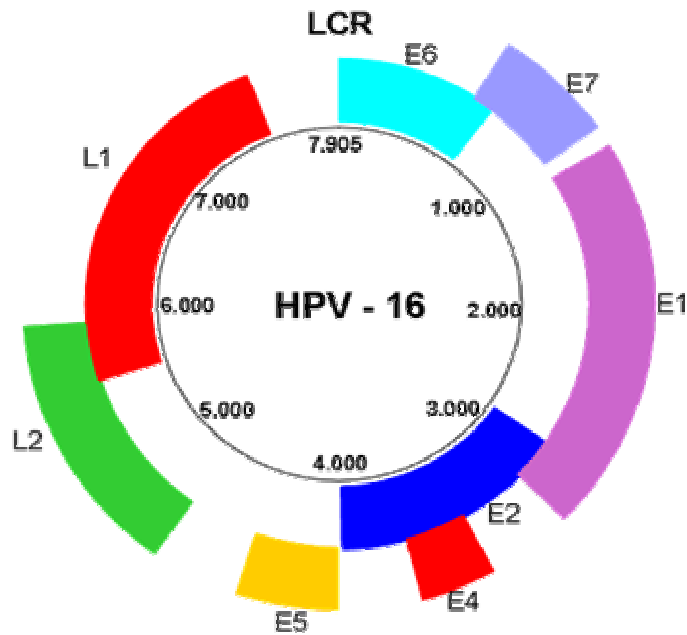


Fig.1. Estructura del genoma del VPH

En el seu genoma es distingeixen: 1) la regió reguladora (*upstream regulatory region*) que és una regió no codificant la funció de la qual és la regulació de l'expressió gènica i el seu ensamblatge en partícules virals; 2) la regió que codifica les "proteïnes precoces (*early proteins*)" (E1, E2, E4-E7), que es transcriuen a l'inici del cicle vital del virus i que són necessàries per a la replicació del ADN viral i la unió de les partícules virals produïdes a l'interior de la cèl·lula infectada; i per últim, 3) la regió que codifica les "proteïnes tardanes (*late proteins*)" que s'expressa al final del cicle vital i que transcriu les

proteïnes estructurals de la càpsida (Roden et al, 1994; Qi et al, 1996; Evander et al, 1997) . Els gens d'expressió precoç difereixen notablement en la seva seqüència entre els diferents tipus de VPH, en canvi, els gens d'expressió tardana presenten moltes similituts entre ells.

Fins l'actualitat s'han seqüenciat més de 100 tipus diferents. Per a caracteritzar un nou tipus de VPH es requereix una diferència de més del 10% en la seqüència de parells de bases dels gens E6, E7 i L1.

Tots en general presenten un tropisme característic. Els diferents VPH es classifiquen en:

Grup cutani: Els virus d'aquest grup s'aïllen en berrugues cutànies i plantars. A aquest grup pertanyen els tipus 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 26-29, 32, 38, 41, 49, 65.

Grup associat a epidermodisplàsia verruciforme: Els virus d'aquest grup s'aïllen en lesions de pacients amb epidermodisplàsia verruciforme, en lesions cutànies en pacients immunodeprimits i en alguns tumors epitelials. A aquest grup pertanyen els tipus 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 47, 50.

Grup anogenital: Són virus de transmissió sexual amb tropisme per les mucoses. Aquest grup al seu torn es divideix en virus d'alt i baix risc . Els virus de baix risc, els tipus més representatius dels quals són el 6 i 11, s'identifiquen en lesions proliferatives benignes (condilomes) del tracte anogenital d'ambdós sexes, però no en carcinomes. Els virus d'alt risc, representats principalment pels tipus 16 i 18, però també pels tipus 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82 es consideren els principals factors etiopatogènics de les

neoplàsies del tracte genital inferior, el 26, 53, i 66 són també probablement tipus d'alt risc (Muñoz et al, 2003). En diversos estudi s'ha demostrat la presència de seqüències genòmiques de VPH en quasi el 100% dels carcinomes invasors de coll uterí (Bosch et al, 1995; Walboomers et al, 1999), en un percentatge quasi igual de lesions premalignes d'aquesta localització (neoplàsies inatrepiteliais cervicals i escamoses) (Muñoz et al, 1992) i en un elevat percentatge de neoplasies i lesions premalignes de l'àrea ano-genital (vulva, vagina, anus i penis) (Rubin et al, 2001; Lu et al, 2003). Ocasionalment aquest grup s'aïlla en lesions de la mucosa de cavitat oral i orofaringe, i amb menor freqüència en lesions de laringe i esòfag (El-Mofty et al, 2005; Alos et al, 2009).

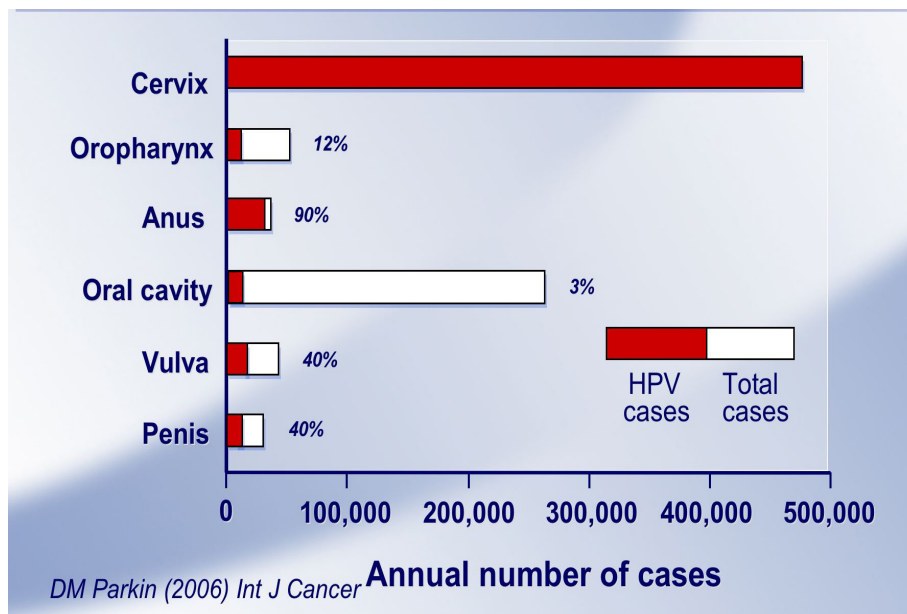


Fig.2. Implicació VPH en diferents càncers orogenitals.

3.4. Mecanismes de carcinogènesi del VPH

Els papil·lomavirus estan perfectament adaptats a la cèl·lula epitelial, que és el seu hoste natural. El virus utilitza el procés de diferenciació de la cèl·lula

infectada per a activar la maquinària de replicació cel·lular en benefici propi (Davidson et al, 2002; Gallowayl, 2003).

Mitjançant la hibridació *in situ* es demostra l'expressió seqüencial dels gens virals, la replicació del genoma, la síntesis de proteïnes derivades de gens precoços (E₆, E₇, E₂, E₄) i gens tardans (L₁ y L₂), l'encapsulació del genoma, i l'alliberament dels virions a mesura que s'exfolien les capes superficials de l'epiteli.

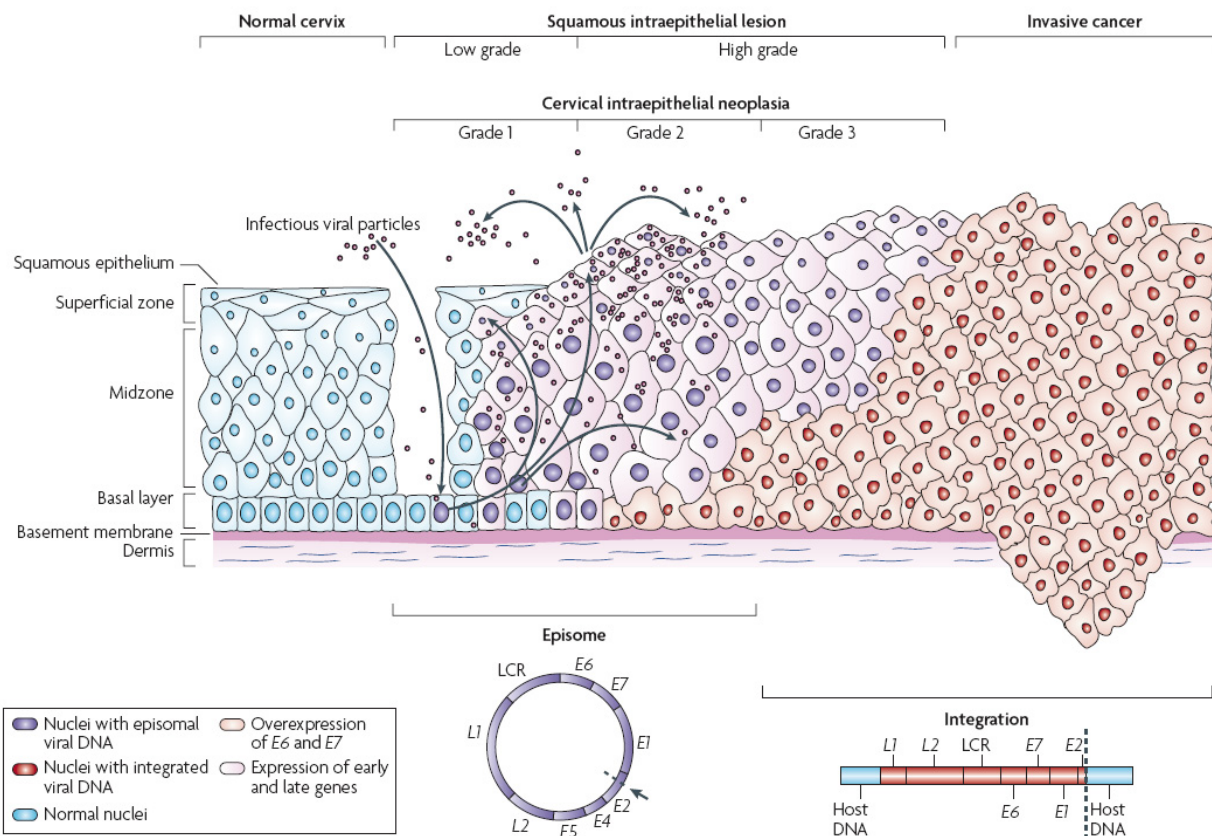


Fig.3. Progressió carcinogènica mediada pel VPH

El cicle comença quan les partícules infeccioses arriben a la capa basal de l'epiteli, allà s'uneixen a les cèl·lules i penetren en el seu interior. Per a mantenir la infecció, el virus ha d'infectar una cèl·lula basal amb capacitat de

replicació. El virus s'estableix en les cèl·lules basals en forma d'episomes (ADN no integrat), amb algunes desenes de còpies de genoma viral per cèl·lula que es repliquen coordinadament, i durant períodes variables de temps manté aquest baix número de còpies en aquestes cèl·lules que estan infectades però que encara són competents i poden replicar-se. Es pot especular que durant la persistència viral, el sistema immunològic manté la infecció en aquest estat.

Més tard, la cèl·lula basal comença a diferenciar-se i és impel·lida cap a estrats superiors de la epidermis/mucosa. En el compartiment suprabasal, aquesta cèl·lula perd la capacitat de dividir-se. És en aquest estrat on el papil·loma comença a replicar-se amplificant el genoma viral i produint també les proteïnes de la càpside amb la conseqüent aparició de virions que aprofiten el desintegrant natural de la cèl·lula epidèrmica propi del recanvi de les capes superficials per a alliberar-se a l'entorn (Ciaran et al, 2007; Woodman et al, 2007). Les cèl·lules superficials en les que s'acumulen nombrosos virions complets mostren característiques morfològiques peculiars i reben el nom de coilòcits (Meisels, 1976; Purola&Savia, 1977).

Les lesions cervicals de baix grau (condilomes acuminats o SIL de baix grau/CIN1), són el prototip d'aquesta forma d'infecció denominada infecció productiva. En elles té lloc la producció de grans quantitats de virions complets. El patró de diferenciació de l'epiteli escamós infectat és similar al patró de diferenciació de l'epiteli normals, observant-se cèl·lules immadures de tipus basal confinades en el terç inferior de l'epiteli i una correcta maduració en la superfície.

Per altra banda el genoma viral és capaç de integrar-se en la cèl·lula hoste, fenomen que ocorre en la major part dels carcinomes invasors i en un percentatge important de les lesions d'alt grau (Daniel et al, 1997; Kalantari et al, 2001; Hopman et al, 2005; Peter et al, 2006). La transformació neoplàsica requereix la transcripció dels oncogens E6 i E7 a ARNm i la traducció de les seves proteïnes virals E6 i E7.

Les proteïnes E6 i E7 són capaces d'interaccionar amb proteïnes pròpies de la cèl·lula hoste. Les interaccions més ben caracteritzades són les produïdes amb les proteïnes pRB i p53, tot i que actualment es coneixen moltes altres interaccions entre les proteïnes virals i les de la cèl·lula hoste que participen en la transformació maligna de les cèl·lules infectades. La unió de E7 a pRB és capaç d'activar-la desencadenant així l'expressió d'altres proteïnes necessàries per a la replicació de l'ADN. En condicions normals aquesta alteració en el comportament cèl·lula conduiria a l'apoptosi per acció de la p53. Però en aquest cas aquest mecanisme està bloquejant per l'acció de la proteïna viral E6, que unint-se a la p53 és capaç de degradar-la. Com a conseqüència s'anul·la la dependència del control del cicle cel·lular (Ferenczy&Franco, 2002). Així degut a la infecció vírica i l'activitat constant de E6 i E7 es produeix en la cèl·lula epitelial una creixent inestabilitat genòmica, acumulació de mutacions oncogèniques que comportaran, finalment, al desenvolupament del càncer.

3.5. Expressió de p16^{INK4a} com a marcador de activitat oncogènica de VPH d'alt risc

Com hem dit abans el VPH infecta les cèl·lules epitelials basals i utilitza la diferenciació cel·lular de l'epiteli per a expressar seqüencialment les seves proteïnes virals i completar el seu cicle biològic.

El mecanisme de transformació neoplàsica implica la transcripció i traducció dels oncogens E6 y E7. Les proteïnes virals E6 i E7 amb diferents factors implicats en el cicle cel·lular alterant la seva funció. Aquesta interacció és fonamental per a comprendre l'efecte preneoplàsic del VPH.

En condicions normals, la proliferació cel·lular requereix la inhibició de pRb. Aquesta s'aconsegueix mitjançant la seva fosforilació, cosa que provoca l'alliberament del factor de transcripció E2F, que fa entrar la cèl·lula a la fase G1 del cicle cel·lular, augmentant d'aquesta manera la replicació cel·lular. Les proteïnes encarregades de fosforil·lar a pRb, i per tant de mantenir-la inactivada, són unes quinases dependents de ciclina (CDK-4 i 6). La proteïna p16^{INK4A}, producte del gen CDKN2A localitzat en el cromosoma 9q21, és un inhibidor d'aquestes quinases. Així, en condicions normals, p16^{INK4A} provoca una hipofosforil·lació de pRb, y com a conseqüència una disminució de la proliferació cel·lular.

L' oncoproteïna E7 del VPH s'uneix i inactiva a pRb, afavorint així l'alliberament del factor E2F i, per tant, la proliferació cel·lular. Com a conseqüència d'aquest procés, existeix un increment de pRb inactivada, que

comporta un augment compensatori de p16 INK4A, proteïna encarregada de la seva hipofosforil·lació. S'ha observat que existeix una relació negativa entre p16^{INK4A} i pRb i que en les cèl·lules amb càncer de cèrvix, sota l'efecte de l'oncoproteïna E7 del VPH, existeix una sobreexpressió de la proteïna p16^{INK4A}. VPH amb les proteïnes reguladores del cicle cel·lular i constitueix un marcador de proliferació neoplàsica (Kelley et al,1995; Milde-Langosch et al, 2001; Sahebali et al, 2004).

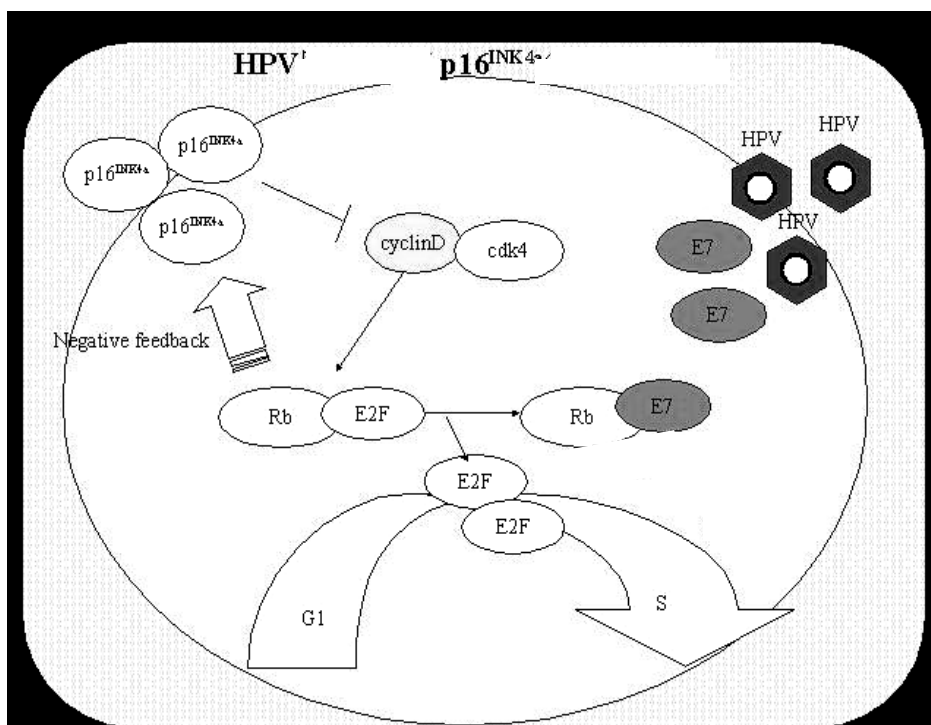


Fig.4. p16^{INK4A} mecanisme acció

La sobreexpressió de p16^{INK4A} és fàcilment detectable per tinció immunohistoquímica i ha estat proposada com a marcador biològic que pot permetre identificar de manera inequívoca les cèl·lules amb canvis displàsics o malignes induïts per VPH (Milde-Langosch et al, 2001; Keating et al, 2001; Haidopoulos et al, 2009) , millorant així l'especificitat diagnòstica i solucionant

els problemes existents de variabilitat inter- i intraobservador. Per altra banda, recentment, la sobreexpressió de p16^{INK4A} ha estat proposada com a marcador pronòstic de les lesions premalignes de coll uterí.

En un principi es va utilitzar només en el càncer de cèrvix, però recentment s'ha observat també sobreexpressió de p16^{INK4A} en altres neoplàsies relacionades amb la infecció d'VPH, tals com els carcinomes amigdalars, anals, penians, vaginals i vulvars . Més encara, s'ha demostrat que algunes localitzacions particulars com la cavitat oral la detecció immunohistoquímica de p16^{INK4A} és una tècnica simple, fàcilment aplicable al diagnòstic histològic de rutina i completament equivalent a la detecció d'VPH, que aporta informació tant diagnòstica com pronòstica (Alos et al, 2009).

4. Comportament les lesions precursors del càncer de coll d'úter

4.1. Cofactors de progressió

La infecció pel VPH-AR és causa necessària però no suficient pel desenvolupament del càncer de cèrvix, existeixen altres cofactors que modulen el risc de progressió de a càncer (Castellsagué et al, 2002).

L'activitat sexual, es vincula amb la probabilitat de contraure la infecció però no es relaciona amb el risc de progressió a càncer

Els cofactors de progressió, són aquells que afavoreixen la persistència de la infecció del VPH-AR, i es classifiquen en vírics, genètics i mediambientals.

4.1.1. Cofactors de persistència-progressió vírics

Genotip viral: No tots els genotips de VPH han demostrat la mateixa agressivitat. El seguiment de dones infectades per VPH-AR amb una citologia inicial negativa ha demostrat notables diferències en el risc de progressió a CIN 3 en funció del tipus de VPH-AR present a l'inici de l'estudi. Els VPH 16 y 18, especialment el 16, han demostrat una major capacitat de persistència i major risc de progressió. Entre el 10% i el 25% de les dones infectades pel VPH 16 o 18 presenta als 3 anys una CIN3 En canvi la progressió a CIN 3 de dones infectades per altres VPH-AR és al voltant del 3% (Khan et al, 2005; Winer et al, 2005). En dones de més de trenta anys aquestes diferències poden ser encara més notòries.

Variants del VPH: D'acord amb el Comitè de Nomenclatura del Papil·lomavirus, per definir un nou tipus de VPH es requereix una variació de al menys el 10% en la seqüència de nucleòtids en E6, E7 i L1 amb els VPH coneguts. Si la variació oscil·la entre 2-10% parlem de subtipus, i de variants si aquesta variació és de <2% en la regió codificant i <5% en la no codificant. S'han descrit, per exemple, 6 variants diferents del VPH 16: europea (E), asiàtico-americana (AA), africana 1 (Af1), africana 2 (Af2), asiàtica (As) i nord-americana (NA). No totes les variants tenen el mateix potencial oncogènic. Les variants no europees són les associades a una

major capacitat de persistència de la infecció, major risc de desenvolupament de lesions d'alt grau i major risc de progressió a càncer. (Wang et al, 2003). També les diferents variant poden associar-se a diferent histologia de les lesions. Així, per exemple, les variants asiàtico-americanes dels VPH 16 i 18 s'associen a tant a carcinomes escamosos com a adenocarcinomes, en canvi, les variants europees només s'associen a carcinomes escamosos.

Aquesta diferent agressivitat pot explicar-se per dos mecanismes fonamentalment: la seva capacitat funcional o bé la capacitat d'evasió del sistema immunitari. Ara bé, donades les diferències geogràfiques és possible que els polimorfismes immunogenètics regionals estiguin també relacionats amb aquestes variacions de persistència i progressió (Grodzki et al, 2006).

Càrrega viral: Existeixen diferents mètodes per determinar la CV (Gravitt et al, 2003). Amb PCR en temps real es determina el nombre de còpies de VPH per equivalent cel·lular, mentre que amb la HC2 la valoració, en URL, és semiquantitativa indicant el nombre total de còpies virals de la mostra. S'ha suggerit que una CV elevada s'associa a un major risc de progressió de la lesió, però és discutible. Hi ha diferents treballs amb conclusions controvertides. La infecció pel VPH 16 o 18 i una major càrrega viral determinada per PCR s'ha associat a un major risc de progressió a lesió d'alt grau i càncer (Moberg et al, 2004; Moberg et al, 2005). Pel que fa a la càrrega viral determinada amb HC2 hi ha autors que descriuen un increment progressiu de la mateixa lligada a la gravetat de la lesió (Ordi et al, 2003). CV superiors a 100URL s'associen a lesions cervicals en més del 90% dels casos i

aquesta relació és pràcticament del 100% per CV superiors a 1000 URL. En canvi un percentatge no menyspreable de casos amb CV inferiors a 10 URL no presenten lesions cervical (Ordi et al, 2003). Ara bé hi ha estudis que no troben aquesta relació (Lörincz et al, 2002), i defensen que la presència d'una CV baixa no ha de considerar-se exclouent de lesió d'alt grau, donat que un tant per cent important de pacients amb CIN2-3 tenen CV inferiors a 100 URL (Clavel, 2001) (30% de CIN2-3 y 46% de carcinomes invasors) o inclús inferiors a 10 URL (només un 8% de los CIN2-3 però fins un 15% de los carcinomes invasors).

Integració: La integració del genoma del VPH en l'ADN de la cèl·lula infectada provoca una disrupció de la regió viral reguladora de la replicació gènica E2. Com a conseqüència es perd la retroalimentació negativa que aquesta regió exerceix sobre l'expressió dels oncogens del virus. Aquesta disrupció és un fet crític en la patogènia de la neoplàsia cervical i un potencial biomarcador de malaltia progressiva. (Daniel et al, 1997; Kalantari et al, 2001; Hopman et al, 2005; Peter et al, 2006). Les probabilitats de que això ocorri augmenten amb la càrrega viral. Ara bé, no tots els genotips presenten la mateixa facilitat per a provocar aquesta integració. El VPH 18 per exemple sembla capaç de provocar la disrupció de E2 amb major facilitat que altres VPH, cosa que podria explicar el fet que les lesions associades a VPH 18 cursin sovint amb mínimes alteracions citològiques que fan que es subestimi el risc de la lesió histològica subjacent (Collins et al, 2009)

Hi ha autors que defensen que el VPH16 és capaç d'induir la transformació maligna sense que existeixi aquesta integració, cosa que indica

que en la transformació neoplàstica intervenen altres factors (Hudelist et al, 2004).

Coinfecció: En la literatura, la prevalença d'infeccions múltiples per VPH varia des de menys del 10% a més del 80%. És discutible si la coinfecció per diversos tipus virals augmenta el risc de progressió. Hi ha autors que han evidenciat que la tasa d'aclariment és independent de la coinfecció per altres tipus virals, almenys en dones immunocompetents (Molano et al, 2003). En canvi altres treballs descriuen un major risc de progressió en aquelles dones amb infecció per múltiples genotips virals (Trottier et al, 2006).

4.1.2. Cofactors de persistència-progressió genètics

Se sap que la **resposta immunitària**, innata, humoral i cel·lular, influeix en el curs de la infecció per VPH, per tant les variacions individuals dels gens relacionats amb el sistema immunitari del individu poden estar relacionades amb la persistència de la infecció viral i el risc de progressió a càncer.

La primera línia de defensa de les infeccions de la pell i les mucoses és la resposta immunitària innata, mediada per les cèl·lules NK (*natural killer*) que indueix l'apoptosi de les cèl·lules infectades pel virus i les cèl·lules tumorals.

En la regulació de la resposta immunitària cel·lular i humoral intervenen els antígens d'histocompatibilitat HLA, entre altres. Les molècules de HLA són molècules presentadores d'antígens i juguen un paper fonamental en la regulació de la funció immune.

Quin és el paper exacte que juga el sistema immunitari en la patogènia del càncer de cèrvix no queda establert (Einstein et al, 2009). Però sembla evident que aquelles pacients amb immunosupressió tenen una major persistència viral i major risc de progressió que les pacients immunocompetents (Frazer, 2009)

4.1.3. Cofactors de persistència-progresió mediambientals

Paritat: Hi ha vuit estudis de casos i controls sobre el càncer invasor i dos estudis sobre CIS de cèrvix, que suggereixen que les dones amb tres o quatre embarassos tenen un risc 2,6 vegades més elevat de càncer que les nul·líparees i, les dones amb set o més parts, presenten un risc 3,8 vegades major (Muñoz et al, 2002). Hi ha altres estudis que confirmen aquesta relació positiva entre la alta paritat i el càncer de cèrvix (Brinton et al, 1989; Thomas et al, 2001; Castellsagué et al, 2003). No queda del tot clar el per què d'aquesta associació. Les explicacions proposades inclouen factors hormonals associats amb l'embaràs, el traumatisme cervical en el moment del part, o la persistència de la zona de transformació exocervical.

Anticonceptius hormonals: Algunes investigacions troben relació entre l'ús perllongat de anticonceptius orals i l'aparició de càncer cervical. Una metaanàlisi que inclou deu estudis de casos i controls en pacients amb carcinoma invasor de cèrvix o CIS troba que l'ús d'anticonceptius a llarg termini podria augmentar fins a quatre vegades el risc de càncer en les dones infectades pel VPH-AR (Moreno et al, 2002). Altres autors no troben aquesta associació positiva entre els anticonceptius hormonals i l'augment de risc de

progressió (Thomas et al, 2002). En general, per les dones que presenten una infecció persistent pel VPH-AR, el mètode anticonceptiu aconsellat és el mètode barrera que sembla augmentar la probabilitat del *clearance* de la infecció. En els casos de dones que prenen anticonceptius hormonal cal fer la balança entre els beneficis d'aquests (reducció de càncer d'ovari i d'endometri) i el major risc de càncer de cèrvix que s'ha trobat en alguns treballs, valorant la possibilitat de canviar de mètode. En els casos en que es creu aconsellat mantenir els anticonceptius hormonal cal realitzar un cribat citològic estricte (Moreno et al, 2002)

Tabac: El tabaquisme és un de los cofactors ambientals més uniformement identificats amb el risc de desenvolupar lesions precanceroses i/o càncer cervical (Lavecchia et al, 1986). El tabac és el cofactor més important de progressió en aquelles dones infectades pel VPH-AR (Kjellberg et al, 2000), augmentant entre 2 i 4 vegades el risc de desenvolupar una lesió d'alt grau o càncer en comparació amb les dones no fumadores (Torné et al, 1997; Szarewski et al, 1998; Hildesheim et al, 2001; Castellsagué et al, 2003). Aquest augment de risc afecta també a les fumadores passives (Trimble et al, 2005). Per altra banda deixar de fumar s'ha associat a una disminució del tamany lesional de les pacients amb CIN. (Szarewski et al, 1998).

Immunosupressió: Les pacients amb algun tipus d'immunosupressió tenen un risc augmentat de càncer genital y anal comparat amb dones immunocompetents de la mateixa edat (Frazer, 2009). Diferents estudis han demostrat que una resposta immunològica deficient predisposa a la persistència de la infecció pel VPH-AR i per tant al desenvolupament de

lesions premalignes i a la progressió de les mateixes (Napp et al, 2005). La immunosupressió s'associa també a una major risc de recurrència en aquelles pacients tractades per CIN (Nappi et al, 2005; Massad et al, 2007).

Immunosupressió per VIH: En les pacients infectades pel VIH, s'ha reportat una major prevalença dones amb infecció pel VPH i de CIN (De Sanjosé&Palefsky, 2002; Nappi et al, 2005; Strickler et al, 2005; Bosch et al, 2007). Els *Centers for Disease Control and Prevention* van incloure, l'any 1993, el carcinoma escatós de cèrvix com a malaltia definitiva de SIDA. El VIH altera la història natural de la infecció pel VPH resultant-ne un comportament més agressiu amb major risc de progressió de les lesions premalignes (Strickler et al, 2005) i major incidència de recidives post-tractament (Gilles et al, 2005; Massad et al, 2007).

Ara bé la influència que té en aquest fet el recompte de CD4, la càrrega viral del VIH, o el tractament HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) per la infecció de la immunodeficiència humana, és encara un punt controvertit. Hi ha diferents treballs que troben relació entre el estatus immunològic, la càrrega del VIH i la prevalença de CIN (Harris et al 2005, Strickler et al, 2005, Dames et al, 2009) i altres que no (Lehtovirta et al, 2008).

Immunosupressió iatrogènica: També les pacients trasplantades que reben teràpia immunosupressora tenen un major risc de infecció pel VPH i de desenvolupar una lesió intraepitelial. (Paternoster et al, 2008). En les pacients trasplantades de ronyó el risc de càncer anogenital és 14 vegades superior a les pacients sanes (Veroux et al, 2009)

Infeccions associades: S'ha parlat d'una major probabilitat de desenvolupar càncer de cèrvix en pacients amb coinfecció pel VPH i un altre agent de transmissió sexual, en especial el VHS-2 o *Chlamydia trachomatis*, que en pacients amb infecció per VPH-AR únicament (Bosch et al, 2007). És probable que la alteració de la immunitat local sigui la causa d'aquesta sinèrgia. En el cas del VHS-2, els resultats d'una metaanàlisi en el que es van incloure set estudis de casos i controls per valorar l'efecte de la infecció pel virus de l'herpes en la etiologia del càncer del cèrvix, va demostrar que en el grup de pacients portadores del VPH-AR, el VHS-2 s'associava a un risc tres veges major de càncer (Smith et al, 2002). L'associació de *Chlamydia trachomatis* amb VPH-AR i lesions intraepiteliais és poc freqüent. La prevalença de *Chlamydia* és similar entre les dones amb citologia normal i aquelles amb alteracions citològiques. Aquest fet suggereix que la *Chlamydia* per si sola no induiria anomalies citològiques, ara bé tampoc no es pot descartar un possible rol com a cofactor. En un estudi de Silins i cols. l'antecedent d'infecció per *Chlamydia* doblava el risc de persistència de la infecció del VPH (Silins et al, 2005).

Nutrició i dieta: Una completa revisió de la literatura conclou que l'evidència disponible sobre el possible efecte deleteri de la dieta o l'estat nutricional en la carcinogènesis cervical no és convincent (García et al, 2005).

4.2. Cofactors d'invasió

La progressió de la neoplàsia intraepitelial a càncer invasor requereix l'expressió de factors angiogènics que estimulen la proliferació de nou vasos.

L'**angiogènesi**, induïda pel VEGF i altres proteïnes, és fonamental pel creixement del tumor, la invasió de l'estroma i les metàstasis (Folkman, 2002).

L'inici de l'angiogènesi ocorre ja en la neoplàsia intraepitelial i està associada a l'expressió de VEGF en l'epiteli anormal. La colposcòpia es basa en part en la observació dels canvis vasculars que constitueixen un signe colposcòpic de progressió de neoplàstica.

5. El cribatge i diagnòstic de les lesions precursors del càncer de coll d'úter

El cribatge del càncer de cèrvix s'ha basat clàssicament en la citologia, la colposcòpia i la biòpsia dirigida. En els darrers anys les tècniques de detecció del ADN del VPH han anat adquirint una major importància. Les darreres guies clíniques, tant americanes com europees (ACOG, 2003; ASCCP, 2004; IARC, 2004; SEGO, 2006; USPSTF 2009), ja recomanen la detecció del VPH-AR a partir de cert rang d'edat, sigui en el cribatge primari, la selecció de pacients de risc, seguiment de dones amb lesió cervical o seguiment de les pacients tractades.

5.1. Citologia cervical

La pràctica de la citologia cervico-vaginal és, en la actualitat, la base de la prevenció del càncer de cèrvix, gràcies a la capacitat per a detectar la neoplàsia cervical en estadi de lesió precursora (USPSTF, 2006; USPSTF, 2009). Aquesta tècnica es basa en la interpretació morfològica de les cèl·lules que es descamen de la superfície cervical. Els criteris per a

classificar les diferents alteracions es basen en el tamany cel·lular i nuclear, la morfologia del nucli i la intensitat de la seva tinció, l'arquitectura de la cromatina, la forma de la membrana nuclear i la relació entre el volum citoplasmàtic i el nuclear.

El 1962 Fidler comunicava que l'aplicació massiva de la citologia cervical (CC) tal com havia estat descrita per Georges Papanicolau el 1941 (Papanicolau, 1941), produïa una reducció important les taxes d'incidència i mobi-mortalitat del càncer de coll d'úter en les dones de British Columbia, Canadà (Fidler, 1962). Des d'e llavors, la CC va ser considerada la millor tècnica de cribatge pel càncer de cèrvix.

Luís Montalvo ha de considerar-se el introductor de la CC a Espanya (Montalvo et al 1967). La creació de la Societat Espanyola de Citologia el 1962 va ser fonamental per a que la CC rebés un impuls definitiu per a la seva difusió a Espanya.

Les comunitats i països que van introduir la tècnica de manera més o menys sistemàtica han anat publicant diferents dades que confirmes la utilitat de la mateixa (Bray et al, 2005a; USPSTF, 2006), aconseguint-se reduccions mitges del 75% en la incidència i la mortalitat per càncer de cèrvix uterí.

Tot i ser una tècnica relativament senzilla, la realització de la citologia cervical implica diferents passos des de l'obtenció de la mostra fins la interpretació dels resultats. Es fonamental que la presa de mostra sigui realitzada de la manera més escrupolosa possible, obtenint directament la mostra del exocèrvix, amb una espàtula, i l'endocèrvix, amb un raspall, o bé obtenint una mostra única exocervical i endocervical amb un raspall de base

àmplia. La mostra vaginal no té utilitat pel criatge de les lesions cervicals. Només en els casos d'estenosi vaginal que impedeixi la visualització del coll uterí o bé en dones histerectomitzades es realitza una toma única del fons vaginal. Els errors en la citologia més freqüents són, precisament, els deguts a la presa de mostra (2/3 dels falsos negatius), ja sigui degut a una presa inadequada com a les característiques pròpies de la lesió (superfície queratinitzada, lesió petita, etc) .

La primera lectura de criatge ha de ser realitzada per un citotècnic expert. Tots els casos anòmals han de ser revisats pel citopatòleg. Els errors de lectura (que constitueixen un 1/3 dels falsos negatius) poden ser deguts a la no identificació de les cèl·lules atípiques presents o bé al infradiagnòstic de les cèl·lules anòmales observades en el frotis. La mostra es considera no adequada per si no s'observen cèl·lules endocervicals o metaplàsiques. A més a més, la presència de sang a la mostra o la inflamació excessiva poden dificultar la interpretació de les cèl·lules observades al microscopi.

Malgrat la seva reconeguda utilitat, la CC té dues limitacions importants. La primera és la relativa baixa sensibilitat: diferents treballs han avaluat aquesta dada, i tot i que els resultats són molt variables, la sensibilitat de la citologia reportada és al voltant d'un 60% (rang 18,5-94,0%) (Puig-Tintoré et al 2006; Cuzick et al, 2006), cosa que implica al voltant d'un 15-50% de falsos negatius per HSIL o càncer (Spence et al, 2007). Aquesta sensibilitat és encara molt més baixa per la detecció de lesions glandulars (Bray, 2005b; Visioli, 2004). La segona limitació de la citologia és la detecció d'un nombre molt important de lesions de CIN1/LSIL que tenen mínim potencial de

progressió (Nieh et al, 2003; 2005). Estadístiques recents estimen que a Espanya es diagnostiquen anualment 500.000 nous casos de CIN1/LSIL. La majoria d'aquestes lesions tradueixen tan sols una infecció transitòria pel VPH. Aquest fet resulta de particular rellevància en termes de costos: s'estima que tres de cada cinc dòlars que es gasten a EEUU en els programes de cribatge de càncer de cèrvix es destinen a avaluar, seguir i eventualment tractar resultats citològics baix grau sense potencial de progressió.

Les limitacions de la CC, sobretot pel que fa la seva baixa sensibilitat van originar un debat sobre la seva utilització (Koss et al, 1980) que va fer evident la necessitat d'establir un control de qualitat en totes les fases de la seva realització: presa, fixació, lectura, informe i seguiment dels casos detectats. Va sorgir un moviment centralitzat en el *National Cancer Institute*, en EEUU i liderat per Robert Kurman i Diane Salomon que va donar lloc al primer informe Bethesda, actualitzat posteriorment (Solomon et al, 2002) amb l'objectiu de normalitzar el procés de la pràctica de la CC. El sistema Bethesda ha estat adoptat per la majoria de laboratoris de citologia espanyols.

El control de qualitat de la CC resideix en: 1) la lectura ràpida per un altre citotecnòleg i 2) la comprovació de que els percentatges dels resultats obtinguts no s'aparten significativament dels acceptats pels grups de consens (European, 2008)

5.2. Citologia líquida

La citologia líquida és una citologia en capa fina pretén facilitar la lectura al eliminar sang, grumolls o altres artefactes, augmentat d'aquesta manera el nombre de mostres satisfactòries per a valoració i millorar la capacitat de detecció de les lesions intraepitelials. Han sigut molts els treballs que han comparat l'eficàcia de la citologia líquida amb la citologia convencional. Inicialment els resultats publicats en la literatura van resultar contradictoris (Nanda et al, 2000; Albulafia et al, 2003; Klinkhamer et al, 2003). Treballs posteriors no van confirmar l'augment de l'eficàcia de la citologia líquida en relació a la disminució del número de mostres inadequades, ni l'augment de la sensibilitat i la especificitat respecte la citologia convencional (Davey et al, 2006; Bergeron, 2006; Arbyn et al, 2008)

5.3. Colposcòpia

La colposcòpia és una tècnica d'exploració òptica magnificada dels epitelis del coll uterí, la vagina i la vulva amb l'objectiu de detectar les lesions preinvasives o invasives del tracte genital inferior i la seva orientació terapèutica. La identificació de característiques epitelials inapreciables a simple vista que tradueixen canvis patològics permet valorar el grau d'anormalitat del teixit i localitzar l'àrea més sospitosa per obtenir-ne una biòpsia.

La colposcòpia permet diferenciar les dues fases de la història natural de la neoplàsia cervical. En la fase intraepitelial s'observen lesions

acetoblanques degudes las canvis epitelials que impedeixen el pas de la llum fins l'estroma, aquest és un signe poc específic però que permet delimitar l'àrea anormal. En la fase invasora s'observen vasos irregulars formats per l'acció de factors angiogènics i que constitueixen un signe de progressió (Puig, 2003). La colposcòpia és una tècnica amb una elevada sensibilitat (95%) (Mitchell et al, 1998) però amb una especificitat més baixa que la citologia (al voltant del 45%), donat que hi ha canvis anòmals que no corresponen a lesions intraepitelials. Per a cada imatge anòmala existeix una gradació que va des de canvis mínims, més suggestius de lesions de baix grau, fins alteracions majors suggestives de lesions d'alt grau o lesions invasores (Torné et al 2006)

Si no es visualitza la unció escamo-cilíndrica, es considera que la colposcòpia no ha estat satisfactòria, en aquests casos és important descartar l'existència de una lesió localitzada en el cancal endocervical.

La colposcòpia permet biopsiar de forma dirigida l'àrea més sospitosa i obtenir un diagnòstic histològic definitiu. Es considera el *gold standar* del diagnòstic de la patologia del tracte genital inferior. Ara bé, actualment es considera que el seu valor és menor del que se li havia atorgat fins ara degut a la combinació de l'error en l'àrea biopsiada i la baixa reproductivitat del diagnòstic histològic de les lesions intraepitelials cervicals (Cox et al, 2003; Castle et al, 2007)

Les indicacions de la colposcòpia varien depenent de les circumstàncies locals, i especialment dels recursos dels que es disposa. Avui dia l'administració de les vacunes profilàctiques dins el calendari vacunal i la

utilització de les tècniques de detecció de l'ADN del VPH-AR en el cribatge, està fent modificar les indicacions de la colposcòpia com tot el cribatge en sí (Meijer et al, 2009).

5.4. Estudi histològic

L'examen anatomopatològic és el que dóna el diagnòstic final de les lesions cervicals. Les lesions cervicals associades a la infecció pel VPH es graduen seguint els criteris de Richard, segons la seva gravetat i el seu risc d'evolució a carcinoma invasor. Així parlem de CIN1 (canvis citopàtics d'una infecció aguda transitòria pel VPH) i CIN2,3 (autèntiques lesions precancerígenes). Diferents estudis han mostrat que, mentre que està clara la capacitat premaligna de les lesions de CIN3, les lesions de CIN2 constitueixen un veritable calaix de sastre, amb lesions properes a CIN1 amb tendència a la regressió, i veritables lesions premalignes similars a CIN3 (Nieh et al, 2005).

Els criteris utilitzats són similars als de la citologia: alteracions nuclears en forma d'augment del tamany del nucli, hiper Cromàsia o irregularitat del contorn, aquestes alteracions estableixen el diagnòstic de CIN, la gradació d'aquesta s'estableix atenent a la gravetat de l'alteració madurativa. Una limitació important de l'examen histològic és que aquest, tot i ser el diagnòstic de referència, està subjecte a una moderada variabilitat inter- i intraobservador, sobretot entre CIN1 i alteracions reactives i entre CIN2 i 3 (Klaes et al, 2002; Parker et al, 2002).

Malgrat es considera que el LSIL citològic correspon al CIN1 histològic i el HSIL amb el CIN2,3, diferents estudis han demostrat que darrera del 5-20% de les citologies de LSIL hi ha en realitat una lesió d'alt grau ((Walker et al, 2006; Wright et al, 2007; Al-Nourhji et al, O 2008).

5.5. Mètodes de detecció del VPH

5.5.1. Mètodes morfològics

El diagnòstic de la infecció per VPH s'ha realitzat clàssicament mitjançant la identificació morfològica de les alteracions citopàtiques produïdes pel virus en les cèl·lules escatoses, alteracions que poden identificar-se tant en la citologia com en les mostres histològiques. La coilocitosi o atípia coilocítica s'ha considerat el signe morfològic característic de la infecció pel VPH. La presència inequívoca de coilocits indica infecció viral productiva, en realitat, són molt més freqüents en les lesions de baix grau que en les d'alt grau. De fet, la majoria de lesions escamoses d'alt grau, carcinomes escatosos invasors i totes les lesions glandulars (adenocarcinomes *in situ* i invasors) no contenen habitualment coilocits. És doncs, un mètode molt poc sensible sobretot tenint en conte que avui dia les tècniques de biologia moleculars tenen una sensibilitat de quasi el 100% .

5.5.2. Mètodes de detecció de proteïnes virals (mètode immunohistoquímic)

La demostració de la infecció del VPH pot efectuar-se detectant les proteïnes de la càpside mitjançant la immunohistoquímica. Aquest mètode té

la mateixa baixa sensibilitat que l'estudi morfològic de coilocits. Donat que la producció de la càpside té lloc només en les cèl·lules madures superficials la proporció de casos positius és inversament proporcional al grau de lesió essent quasi constantment negatiu en els casos de carcinomes invasors.

5.5.3. Mètodes de biologia molecular- detecció de seqüències genòmiques del VPH

En la darrera dècada, les tècniques de detecció de l'ADN dels VPH-AR han estat molt eficaces en el maneig clínic de la patologia cervical. La principal aportació d'aquestes tècniques és la seva elevada sensibilitat (Arbyn, 2009), en general, i valor predictiu negatiu, molt superiors als de la citologia.

Les darreres guies clíniques de consens, basades en la revisió de la literatura i l'opinió d'experts, que va publicar la Societat Americana de Patologia Cervical i Colposcòpia (ASCCP) afegien els mètodes de detecció del DNA del VPH-AR a la citologia com a part del cribatge de càncer de cèrvix uterí en dones majors de 30 anys (Wright et al, 2007) amb l'objectiu precisament de augmentar la sensibilitat del cribatge i valorar la possibilitat de augmentar l'interval d'avaluació. Dades recents confirmen que aquest nou enfocament del cribatge per dones a partir dels 30 anys redueix la incidència de CIN2,3 i de càncer de coll d'úter (Naucle et al r, 2007). Ara bé, aquest increment de la sensibilitat, s'acompanya d'una notable reducció de l'especificitat (Ordi et al, 2003), degut a que la tècnica detecta un nombre molt significatiu de dones amb infecció per VPH-AR que resoldran la infecció sense desenvolupar cap lesió cervical, fet evident, sobretot, si s'utilitza en

dones joves (Evander et al, 1995; Cuschieri et al, 2004; Cuzick et al, 2006). El principal guany de la inclusió de tècniques de detecció del DNA en el cribatge es dona en dones de més de 30-35 anys, en les quals un resultat negatiu permet augmentar l'interval de cribatge amb seguretat.

5.5.3.1. Hibridació in situ

La hibridació *in situ* es basa en l'ús de sondes marcades que hibriden específicament amb el DNA del VPH-AR situat intracel·lularment. Aquesta tècnica pot realitzar-se tant en mostra citològica com histològica. Existeixen diferents kits comercialitzats, alguns per a cribatge (inclouen un còctel de sondes que permet detectar un ampli grup de genopits sense diferenciar-los) i altres per a tipificació inclouen tres sondes, de les quals cadascuna detecta dos o més tipus virals agrupats segons la seva capacitat de produir neoplàsia.

La principal avantatge de la hibridació *in situ* és que permet visualitzar la morfologia de les cèl·lules infectades pel VPH (Hopman et al, 2005). La segona avantatge és la seva gran especificitat: la detecció de VPH-AR mitjançant aquesta tècnica s'associa constantment a la presència de lesions cervicals. Les infeccions latents en un epiteli normal són quasi constantment negatives amb aquesta tècnica.

El gran inconvenient d'aquesta tècnica és la seva baixa sensibilitat (al voltant d'un 40-70% de les SIL), deguda a que es necessiten un nombre elevat de còpies per a que sigui possible la seva detecció, cosa que fa poc útil aquesta tècnica en el cribatge del càncer de cèrvix (Torne et al, 1997).

5.5.3.2. Captura d'híbrids

Utilitza sondes de ARN capaces de detectar diferents tipus de VPH-AR. Quan existeix infecció vírica les sondes de ARN formen un híbrid amb el ADN del virus. Aquest híbrid és capturat per un anticòs específic i detectat mitjançant tècniques d'ELISA que utilitzen un compost quimioluminiscent per a revelar la reacció i que proporciona a més una informació semiquantitativa sobre la quantitat d'ADN viral (Scheurer et al, 2005). La tècnica disposa d'una sonda per a virus d'alt risc oncogènic i una altra per a virus de baix risc.

El test *Hybrid Capture 2* (HC2), test aprovat per la FDA (*Food And Drug Administration*) dels EEUU, és una prova àmpliament utilitzada en la detecció del VPH-AR. És un mètode ràpid i reproduïble amb una adequada relació entre sensibilitat i especificitat. Permet detectar 5 tipus de VPH de baix risc oncogènic (6, 11, 42, 43, 44) i 13 tipus virals de risc oncogènic alt o intermedi (16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), responsables del 90% dels carcinoma de cèrvix.

Utilitza com a llindar de positivitat 1 URL. Aquest test posseeix una sensibilitat propera al 95% (Lörincz et al, 2003; Brink et al, 2005), i un valor predictiu negatiu pròxim al 100% (*negative is negative*) (Ordi et al, 2003; Kulmala et al, 2004; Cuzick et al, 2008), així, un test HC2 negatiu permet excloure amb elevat grau de certesa l'existència d'una lesió premaligna d'alt grau o d'un carcinoma invasor. Alguns treballs suggereixen que el test podria ser optimitzat utilitzant un llindar de positivitat superior a 1.0 pg/mL. (Kumala et al, 2004). El seu principal inconvenient és que no permet genotipar els virus detectats.

Aquest mètode de detecció viral han estat recentment proposats per a millorar l'eficiència del cribatge de càncer de cèrvix (Arbyn et al, 2006; Ronco et al, 2007). Els diferents treballs realitzats en els darrers anys demostren que la utilització del HC2 en el cribatge augmentaria la detecció de lesions persistents i reduiria la incidència de CIN2,3 i càncer de cèrvix (Naucler et al, 2007; Ronco et al, 2008), a costa però d'un increment de detecció d'infeccions transitòries, degut a que el HC2, com les altres tècniques de detecció de DNA viral en general, comporten una reducció de al voltant d'un 4-6% de la especificitat (Cuzzick et al, 2008) i una reducció de un 10-20% aproximadament del VPP (Kotaniemi-Talonen et al, 2008) comparades amb la citologia.

5.5.3.3. La Reacció en cadena de la polimerasa

Es basa en la multiplicació del número de còpies d'un segment específic del ADN viral si aquest està present en la mostra analitzada. Aquesta és una tècnica amb una molt elevada sensibilitat, capaç de detectar la infecció viral amb molt poques còpies d'ADN (entre 10 i 100) encara que estiguin localitzades en una sola cèl·lula entre milers.

Existeixen dues alternatives fonamentals per la detecció de VPH mitjançant la PCR. En primer lloc, i com a mètode més utilitzat, disposem de la **PCR de regions de consens**, en la qual s'amplifica una regió amb una seqüència molt similar entre tots els VPH per, posteriorment, per mètodes d'hibridació específica, enzimàtics o de seqüenciació de l'ADN, realitzar la tipificació del virus. El primer d'aquests mètodes de consens que va ser

popularitzat va ser el que utilitza com a diana d'amplificació la regió comú de L1, utilitzant les sondes MY09 i MY11. El producte amplificat generat és d'aproximadament 450 parells de bases i presenta certs inconvenients, com no permetre la detecció de determinats VPH (VPH 35) i de tenir una sensibilitat limitada deguda, entre altres coses a que el seu relatiu gran tamany, en casos d'ADN de mala qualitat, l'amplificació es veu molt limitada.

Per tal de millorar aquestes limitacions, posteriorment es van realitzar diferents modificacions que bàsicament radicaven en el disseny de noves sondes per a la mateixa diana. Així es van dissenyar variants com PGMY09/11, que proporcionava una major sensibilitat i un augment de l'espectre de VPH detectats, o altres com GP5/GP6 o la seva variant millorada GP5+/GP6+ (l'únic test de PCR clínicament validat avui dia), la sensibilitat dels quals respecte altres *primers* consens és notablement major.

La **PCR específica** està basada en el disseny específic de *primers* per a regions diferencials entre els diferents VPH, i en ell cal destacar la seva extremada sensibilitat, ja que es poden amplificar específicament per exemple oncogens virals (E6 i E7) d'un determinat tipus, subtipus o variant viral amb una especificitat de quasi el 100%. Per altra banda permeten la realització d'anàlisi d'integració viral, detecció de variants, quantificació normalitzada en front de gens constitucionals, etc.

Les tècniques basades en l'amplificació per PCR són ràpides i relativament senzilles i poden aplicar-se tant a mostres de citologia com a biòpsies.

La seva elevada sensibilitat que presenten, en general, és el que les fa tant valuoses i alhora representa també un dels seus principals inconvenients, ja que detecten un nombre molt elevat de pacients amb infeccions transitòries. Un altre dels seus inconvenients és la facilitat de contaminació i falsos positius, malgrat que en cada kit es proposen diferents mesures de control.

Actualment existeixen un gran nombre de tests basats en PCR altament sensibles com GP5+/GP6+, PGMY09/11, SPF, Amplicor MWP, Linnear Array, Inno-Lipa, PapilloCheck (Monsonogo et al, 2005; Gillio-Tos et al, 2006; Wright et al, 2007; Hesselink et al, 2008; Iftner et al, 2009; Dalstein et al, 2009). Fins fa pocs anys el seu ús clínic era mínim i la majoria d'aquests test estaven enfocats a la recerca (Davies et al, 2001). En els darrers anys la seva validació clínica ha sigut un dels temes que més interès ha despertat, i avui dia, la seva utilització en el cribatge està essent avaluada (Bulkmans et al, 2007; Naucier et al, 2007; Ronco et al, 2008; Meijer et al, 2009). L'objectiu d'aquests estudis és trobar aquells test l'aplicació dels quals ofereixi un balanç òptim entre la sensibilitat clínica i l'especificitat, per tal de minimitzar la màxim l'excessiu seguiment o un tractament excessiu de les infeccions transitòries. Així per exemple, treballs actuals demostren tècniques extremadament sensibles, com SPF10-PCR, suposen un augment innecessari de dones que serien examinades de forma repetida (Hesselink et al, 2008).

La base d'aquest nou plantejament radica en que se sap que dins els VPH-AR no tots presenten la mateixa capacitat oncogènica. El VPH 16 per

exemple es considera el responsable del 50-55% de carcinomes de cèrvix (Bosch et al, 2008), dada que suggereix fortament que aquest tipus viral està dotat d'alguns avantatges biològics per la transmissió, persistència i capacitat de transformació. El mateix, però a menor escala passa amb el VPH 18 o 45, responsables del 40% dels adenocarcinomes de cèrvix. Així doncs la infecció per determinats genotips virals suposa un risc afegit de desenvolupar una lesió d'alt grau (Josefsson et al, 2001; Castle, et al, 2005; Khan et al, 2005). Per altra banda l'aparició de vacunes profilàctiques per a certs tipus virals d'alt risc (16 i 18) també ha donat rellevància a la tipificació viral.

5.5.3.4. Expressió del ARNm dels oncogens E6 y E7

El potencial oncogènic dels VPH-AR recau en les oncoproteïnes E6 y E7, capaces d'unir-se i modular l'expressió de proteïnes reguladores del cicle cel·lular, en especial p53 i pRb. Com a conseqüència d'aquesta interacció es produeix una distorsió del cicle cel·lular i una alteració de la reparació de l'ADN cel·lular, conduint la cèl·lula a la inestabilitat genòmica i a la transformació maligna. Per tant, l'expressió dels oncogens E6 i E7 és necessària per la síntesis d'aquestes proteïnes i la transformació maligna.

La detecció del ARNm dels oncogens E6 y E7 suposa una eina diagnòstica molt més específica que la simple detecció de l'ADN viral, significa que ha existit una integració del material genètic viral en l'ADN cel·lular i que s'està produint a més l'expressió del DNA viral.

Diversos treballs que correlacionen l'expressió del ARNm d'E6 i E7 amb el grau lesional atorgant a aquests marcadors un valor pronòstic (Sotlar 2004, Varnai et al, 2008; Catan et al, 2009).

5.6. Marcadors moleculars cel·lulars d' activitat oncogènica de VPH-AR

Darrerament han estat proposats diferents molècules cel·lulars com a marcadors biològics d'infecció viral amb valor diagnòstic i/o pronòstic. De tots aquests marcadors la proteïna p16^{INK4A} ha estat el més estudiat.

5.6.1. p16INK4A

La sobreexpressió de p16^{INK4A} és fàcilment detectable per tinció immunohistoquímica i ha estat proposada com a marcador biològic que pot permetre identificar de manera inequívoca les cèl·lules amb canvis displàsics o malignes induïts per VPH-AR, millorant així l'especificitat diagnòstica i solucionant els problemes existents de variabilitat inter- i intraobservador (Milde-Langosch et al, 2001; Klaes et al, 2002; Carozzi et al, 2008; Horn et al, 2008). Estudis molt recents proposen que la p16 podria a més tenir un valor pronòstic (Hariri et al, 2007; Yoshida et al, 2008)

La immunohistoquímica per p16^{INK4A} es gradua segons la tinció citoplàsmica i/o nuclear de la cèl·lula infectada: la tinció citoplasmàtica en cèl·lules aïllades (<5%) es considera negativa. La positivitat per p16^{INK4A} pot ser difusa, quan totes les cèl·lules basals tenyeixen, o focal en cas de tinció en una localitzada sigui en les cèl·lules basals o suprabasals (Kong et al,

2007). L'ús de la tinció immunistoquímica per p16^{INK4A} ha estat estudiat tant en mostres histològiques (Klaes et al, 2002; Benevolo et al, 2006) com en citologia (Bibbo et al , 2002; Negri et al , 2003; Sahebali et al ,2004).

5.6.2. Altres marcadors moleculars: CDC6, MCM5, Ki67

El CDC6 i MCM5 (Mini Chromosome Maintenance) són dos reguladors de la duplicació del ADN. En totes les cèl·lules eucariotes existeixen mecanismes de control de replicació del material genètic que s'han mantingut al llarg de l'evolució. Aquests mecanismes controlen que la replicació del DNA ocorri tan sols una vegada en cada cicle cel·lular. Són els anomenats "licenciadors" de la replicació de ADN i actuen formant un complex que, en unir-se al ADN, permet l'inici de la replicació del genoma cel·lular. Quan aquest complex s'allibera del DNA es bloqueja el reinici de la replicació del genoma cel·lular en el mateix cicle. L'alteració de la replicació del material genètic comporta una inestabilitat genòmica que contribueix a la transformació maligna de la cèl·lula. Diversos estudis han observat una sobreexpressió de MCM5 i CDC6 en les cèl·lules de les lesions displàsiques. En les cèl·lules "normals" ambdues molècules s'expressen únicament durant el cicle cel·lular, però no en els processos de diferenciació ni en les fases de quiescència, per això es consideren biomarcadors específics de "cèl·lules proliferatives", per la qual cosa s'han proposat com a marcadors de lesions displàsiques o neoplàsiques (Freeman et al ,1999; Davies et al, 2002). El 1998 Williams et al van proposar per primera vegada CDC6 i MCM5 com a potencials biomarcadors moleculars de les lesions premalignes del cervix

uterí (Williams et al, 1998), proposta que s'ha vist recolzada per treballs posteriors (Ishimi et al, 2003; Murphy et al, 2005; Halloush et al, 2008).

El ki67 és un marcador de proliferació cel·lular. La seva sobreexpressió es veu en casos de lesions displàsiques o neoplàsiques, i s'ha proposat juntament amb la p16 per a millorar la sensibilitat de la citologia i disminuir els falsos negatius (Akpola et al, 2004; Halloush et al, 2008). Altres treballs descriuen una expressió diferencial de Ki67 en relació amb la severitat de la lesió preneoplàsica donant-li així un valor diagnòstic (Carreras et al ,2007).

Molts altres marcadors com hTERT, mTOR, bcl-2, p53, p27(KIP1), ciclina E, etc, han estat estudiats (Saha et al , 2007; Bahnassy et al, 2007; Tan et al , 2008; Feng et al , 2009)

El seu paper avui dia és encara experimental i no tenen aplicació clínica, diversos treballs es plantegen de quina manera aquests biomarcadors serien útils dins el cribatge del càncer de cèrvix.

6. Maneig de les lesions precursors del càncer de coll d'úter

Com hem dit abans, d'acord amb el risc de progressió que tenen les diferents lesions premalignes, existeix consens en realitzar tractament escisional a les pacients que presentin lesions d'alt grau confirmades histològicament (CIN2-3). En canvi, tractar sistemàticament totes les lesions de baix grau (CIN1), la majoria de les quals són l'efecte citopàtic d'infeccions transitòries pel VPH-AR, suposaria no només un sobretractament injustificat (Puig 2003), sinó un increment de tots aquells efectes perjudicials secundaris a la conització, sobretot en cas de les dones en edat reproductiva (amença de part preterme, ruptura prematura de membranes...) (Tan et al, 2004; Jakobsson et al, 2007).

Per aquest motiu, sempre que es compleixin certs requisits (veure apartats següents), s'opta per una actitud conservadora oferint a la pacient seguiment sense tractament. Aquest fet però suposa una gran càrrega assistencial, derivada del seguiment estricte d'un gran nombre d'infeccions pel VPH i lesions cervicals que remetran de manera espontània.

6.1. Tractament de les lesions escatoses d'alt grau i seguiment posterior

Les lesions intraepiteliais d'alt grau (CIN2-3) presenten un risc de progressió elevat (Pinto&Crum, 2000; Spitzer et al,2006; McCredie et al, 2008), per la qual cosa existeix consens de tractar-les. Hi ha autors que

reporten un risc de progressió real de més d'un 50% en el cas de no tractar aquestes lesions (McCredie et al, 2008).

Existeixen dos grans grups de tractament: els escisionals i els destructius. Els primers donat que permeten obtenir material histològic per estudi (diagnòstic i l'avaluació dels marges del con cervical) són els tractament d'elecció (Wright et al, 1992; Kyrgiou et al,2005; Spitzer et al,2006)

La conització és el procediment més utilitzat, i existeixen diferents tècniques per a fer-la. Fins als anys 50-60 el tractament tradicional era la conització amb bisturí fred. Avui en dia altres tècniques igual d'efectives, que no requereixen anestèsia total, i que produeixen una menor alteració en la morfologia cervical han anat substituint el bisturí fred (Giacalone et al, 1999; Duggan et al, 1999, Bozanović et al, 2008). La nansa diatèrmica (*Loop electrosurgical excision procedure*, LEEP) és la principal tècnica utilitzada per a l'exèresi de les lesions cervicals, ja que presenta la mateixa eficàcia que altres tècniques escissionals amb avantatges afegides de comoditat, rapidesa, i baix cost (Kyrgiou et al, 2006; Suwannarurk et al, 2009).

Ara bé, el risc de malaltia invasora es manté elevat respecte les dones sense antecedents de lesió cervical malgrat el tractament (Soutter et al, 1997; Kalliala et al, 2005; Spitzer et al, 2006; Melnikow et al, 2009) per la qual cosa aquestes dones requereixen seguiment a llarg termini i sovint retractament de les recidives un cop identificades. Soutter et al. van reportar en una metaaanàlisi que les dones tractades per CIN mantenen un risc de desenvolupar càncer invasor al voltant de 2.8 vegades respecte la població

(Soutter et al, 2006). Avui en dia s'accepta que les dones amb antecedent de tractament per lesió cervical han de realitzar un seguiment estricte durant anys (Soutter et al, 2006; Spitzer et al, 2006; Strander et al, 2007), però no queda establert quants.

El risc de progressió de les lesions d'alt grau, és molt inferior en noies joves (per sota de 25 anys), en les quals el risc de progressió s'ha estimat al voltant d'1.5 % anual (Sasieni et al, 2009). Per aquest motiu, en dones joves, amb colposcòpia satisfactòria s'accepta fer un seguiment estricte (Spitzer et al, 2006), repetint la biòpsia en cas de citologia HSIL, o empitjorament de la lesió a la visualització amb colposcop i tractant la lesió sempre que aquesta persisteixi més de 24 mesos (Hoffman et al, 2004; Spitzer et al, 2006).

El principal objectiu de seguiment de les dones a les que s'ha fet una conització per una lesió d'alt grau, és la detecció precoç d'una recidiva o bé de lesió residual. Les guies clíniques actuals recomanen fer el seguiment d'aquestes dones amb determinació de VPH-AR, citologia i colposcòpia (Nobbenhuis et al, 2001b; Wright et al, 2006; Spitzer et al, 2006) cada 6 mesos. La colposcòpia, en general, no es recomana de forma seriada en el control post-tractament, però cal fer-la sempre davant d'una citologia alterada o bé una determinació de VPH-AR positiva. (Gardeil et al, 1997; Benchimo et al, 2005; Wright et al, 2006).

La determinació de VPH-AR com a seguiment post-tractament ha permès augmentar la sensibilitat de detecció de recidiva, sufragant el problema de l'alta taxa de falsos negatius de la citologia (Nobbenhuis et al,

2001b), la sensibilitat de la qual semblava disminuir en les pacients conitzades (Bollen et al, 1999).

Diversos factors s'han relacionat amb el risc de recidiva o persistència de lesió després d'un tractament per lesió d'alt grau, principalment, els marges de la peça quirúrgica o la persistència de VPH-AR post-tractament.

La valoració dels marges de la peça de conització és un dels aspectes fonamentals. L'afectació dels marges està relacionat amb el risc de recurrència de la lesió (Spitzer et al, 2006; Wright et al, 2006, Zielinski et al, 2004), cosa que ocorre en el 7% de les dones tractades amb marges negatius, i en el 30% de les dones tractades en les que hi havia afectació de marges de la peça de conització. L'afectació de marges no és sinònim en tots els casos de persistència de malaltia (Bretelle et al, 2000), però donat el risc de recidiva i la possibilitat de malaltia residual es recomana un seguiment estricte d'aquestes pacients.

La persistència d'infecció del VPH-AR en dones que han estat tractades també és un factor de risc per a la recidiva/persistència de lesió residual (Fusté, 2009; Riethmuller, 2008; Alonso, 2007; Nobbenhuis, 2001b). L'elevada sensibilitat i VPN de les tècniques de detecció del VPH-AR fan d'aquestes un mètode reproduïble i fiable de la valoració del risc de malaltia.

Noebbenhuis i cols. van reportar que la persistència d'infecció per VPH-AR als 6 mesos de tractament prediu amb major fiabilitat que la citologia la presència de lesió residual o recurrent (Nobbenhuis et al, 2001b).

Hi ha diversos grups que han estudiat possibles factors que s'associïn a la persistència del virus post-tractament amb resultats molt diversos (Bodner et al, 2002; Costa et al, 2003; Dalstein et al, 2003; Alonso et al, 2007). L'edat de la pacient, el grau histològic de la lesió tractada, els marges de la peça de conització, i la càrrega viral pre-tractament han estat factors descrits per a la persistència de la infecció.

6.2. Tractament de les lesions escatoses de baix grau i seguiment posterior

Aproximadament el 85% de les lesions de baix grau estan causades per VPH-AR, igual que pràcticament el 100% de les CIN2-3 i dels carcinomes de cèrvix. Només el 15% de les CIN1 estan produïdes pels tipus virals de baix risc (Ordi et al, 2003). Ara bé, la gran majoria de les CIN1, inclús aquelles produïdes per virus oncogènics, reflexen simplement l'efecte citopàtic d'una infecció transitòria i regressen de forma espontània (Ostor, 1993; Wright et al, 2003; Moscicki et al, 2004). Per aquest motiu les actuals guies clíniques no aconsellen de forma sistemàtica el tractament escisional d'aquestes lesions (ACOG, 2005; Wright et al, 2006; Puig-Tintor et al, 2006).

En aquest context es recomanen aquells canvis conductuals per a actuar sobre els cofactors de risc: suprimir l'hàbit tabàquic (Torné et al, 1997; Moscicki et al, 2001; Castellsagué et al, 2003), es recomana l'ús del preservatiu (Hogewoning et al, 2003; Shew et al, 2006).

La taxa de regressió en noies joves és encara més elevada, els 36 mesos regressen un 91% de les CIN1 (Moscicki et al, 2004), per la qual cosa

en aquest subgrup de pacients està encara més justificada la conducta conservadora, considerant a més la mobilitat que el tractament suposa sobre la fertilitat i la gestació (ACOG, 2005).

Estudis virològics han evidenciat que l'aclariment de la infecció precedeix la remissió dels canvis citopàtics (Nobbenhuis et al, 2001a). En el treball de Nobbenhuis i cols. al cap de l'any la taxa acumulada de *cleareance* de la infecció va ser del 29% (IC 95%: 18-50), cosa que va permetre en aquests casos predir la regressió de la lesió. Totes les dones que va aclarar la infecció ho van fer en els 40 mesos de seguiment (Nobbenhuis et al, 2001a).

Així doncs un estricte control d'aquestes lesions permet fer una conducta conservadora el temps suficient per permetre la resolució de la infecció i la regressió de la lesió (Puig-Tintoré et al, 2006).

El 2001, la *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP)* va liderar una conferència de consens amb l'objectiu de desenvolupar unes guies clíniques del maneig de les lesions cervicals intraepitelials (Wright et al, 2003) que van ser adoptades per altres societats. Per les dones amb diagnòstic histològic confirmat de CIN1 precedida per citologia de ASC-US, ASC-H, o LSIL, les guies clíniques actuals recomanen la repetició de la citologia als 6 i 12 mesos o bé la realització del test de VPH-AR als 12 mesos. En cas de determinació viral positiva o de nova citologia anormal, es recomana la realització de colposcòpia (Wright et al, 2003; Wright et al 2006).

Si la CIN1 persisteix més de dos anys pot plantejar-se el tractament o bé continuar fent un seguiment de la pacient. En cas de colposcòpia

insatisfactòria o CIN1 endocervical es recomana tractament escisional (Wright et al, 2006) .

Les dones amb CIN1 precedit per citologia de HSIL es recomana o bé tractament o bé seguiment amb citologia i colposcòpia cada 6 mesos, sempre que la colposcòpia sigui satisfactòria i la mostra endocervical negativa per a lesió. Si persisteix la citologia de HSIL es recomana fer tractament.

El maneig de les adolescents i les dones gestants presenta petites particularitats, en ambdós casos s'intenta una conducta conservadora sempre que sigui possible.

Ara bé, tot i l'alta probabilitat de regressió cal no oblidar que un 10-15% de les lesions de CIN1 progressen a CIN2-3 i un 0.3% a càncer (Ostor, 1993; Cox et al, 2003). Avui per avui, però no és possible predir, en el moment del diagnòstic quines seran aquelles lesions que progressaran amb el temps, per la qual cosa és fonamental el seguiment de totes elles.

En l'estudi ALTS es va concloure que moltes de les lesions CIN2-3 detectades en el seguiment de lesions CIN1, corresponien en realitat a lesions d'alt grau que havien estat infradiagnosticades en el moment del diagnòstic (Cox et al, 2003). El risc d'una lesió subjacent de CIN2-3 en una pacient diagnosticada de CIN1 és major quan la citologia prèvia ha estat HSIL i no ASC o LSIL (Massard et al, 2001; Alvarez et al, 2007).

7. Vacunes profilàctiques per a la infecció de determinats VPH

Les vacunes profilàctiques per a la infecció dels VPH més prevalents és avui dia un tema de gran actualitat amb molts interrogants encara per resoldre. Amb les recents publicacions dels dos majors estudis de fase III de les vacunes del VPH la perspectiva de la prevenció del càncer de cèrvix mitjançant les vacunes és un tema de gran interès. Tot i que el seguiment de les milers de pacients vacunades, és encara només moderat (5-6 anys), les dues vacunes actualment comercialitzades (Cervarix® i Gardasil®) han demostrat una elevada eficàcia, seguretat, immunitat i una protecció a llarg termini en front la infecció dels virus vacunals (Harper et al, 2006; Garland et al, 2007; Paavonen et al, 2007).

Cervarix® és una vacuna bivalent formulada amb antígens basats en la proteïna L1 de la càpside viral dels tipus 16 i 18 del VPH que s'autoensamblen formant partícules no infeccioses similars al virus (VLPs: *virus like particles*) i un adjuvant que potencia la resposta immune induïda per la vacuna (ASO4). Gardasil® és una vacuna tetravalent formulada amb antígens basats en la proteïna L1 dels virus oncogènics 16,18, i els no oncogènics 6 i 11 que també s'autoensamblen formant les VLPs i un adjuvant d'hidroxialumini. Els resultats dels 2 estudis fase II (GSK001/007 i Merk007) i els tres fase III (PATRICIA, FUTURE I i FUTURE II) han demostrat una eficàcia superior al 95% respecte la infecció persistent del VPH inclosos en les vacunes, CIN1+, CIN2+, AIS) (Schiller, 2008).

Ambdues vacunes ofereixen protecció contra la infecció pels VPH-AR 16 i 18 de les dones naïves, aquests dos genotips virals són els responsables del 70% dels càncers escatosos cervicals i el 80-85% dels adenocarcinomes (Castellsagué et al, 2006). S'estima que, gràcies a la protecció creuada en front de genotips relacionats, la protecció real d'aquestes vacunes en front el càncer de coll d'úter és encara superior.

Les vacunes profilàctiques han estat implementades aquest darrer any en el calendari vacunal, però tot i així queden encara sense respondre molts interrogants sobre la l'espectre real de la protecció i la protecció creuada, la immunitat a llarg termini de cadascuna de les vacunes, l'efecte sobre la incidència i prevalença de càncer, el cribatge en dones vacunades. Per resoldre totes aquestes qüestions cal continuar els estudis de seguiment a llarg termini i organitzar nous estudis fase IV, alguns dels quals ja s'estan duent a terme.

L'any 2007 el cost d'aquestes vacunes va excedir les possibilitats de molts països, a més de que la seva introducció va reflectir les grans diferències en l'accés a les vacunes relacionades amb el nivell socioeconòmic. Experiències prèvies com la introducció de la vacuna de la hepatitis B en els països en vies de desenvolupament han demostrat que el cost de la vacuna és un component essencial de l'èxit de la implementació de les mateixes (Kane et al, 2006).

Un altre tema de debat és el nou enfocament del cribatge en una població de dones vacunades. Després de 50 anys de citologia i quasi una dècada d'avaluació del cribatge amb els test de detecció del VPH-AR, la

introducció de les vacunes ha suposat un nou plantejament de la prevenció del càncer de cèrvix. Davant de una suposada reducció de la prevalença de lesions preneoplàsiques, diferents models matemàtics exploren estratègies de cribatge que combinin la vacunació amb esquemes sostenibles de cribatge (Raffle, 2007; Goldhaber-Feibert et al, 2008).

Aquestes vacunes no tenen activitat terapèutica: no s'ha demostrat efecte de cap d'elles en la regressió/progressió de les lesions premalignes (Schiller et al, 2008).

II. HIPÒTESI DE TREBALL

Un dels problemes principals del cribat convencional del càncer del cèrvix uterí mitjançant citologia és que aquesta tècnica detecta un gran nombre de dones amb alteracions cel·lulars lleus (ASC-US, LSIL) que són transitòries i presenten un baix risc de progressió a lesions premalignes d'alt grau i carcinoma invasor. Aquest problema s'agreuja notablement quan s'apliquen tècniques moleculars de detecció del VPH, les quals s'han introduït en el cribat en els darrers anys degut a que són molt més sensibles que la citologia. Aquestes tècniques demostren infecció viral no només en un percentatge alt de dones amb ASC-US i LSIL, sinó que a més, són positives en un nombre important de dones amb citologia negativa. Per tant, com a resultat dels programes de cribat els sistemes de salut es troben amb un grup de dones amb lesions citològiques lleus o amb infecció per VPH i citologia normal, el seguiment de les quals representen un problema assistencial greu i d'importància creixent. Són molt escasses les evidències existents sobre quin és el vertader risc de transformació maligna d'aquestes dones, i per tant quin és el comportament clínic més adequat.

Malhauradament, ni la clínica ni les característiques citològiques ni histològiques d'aquestes lesions són capaces de predir el risc de progressió d'aquestes lesions, no disposant-se actualment de cap mètode que diferenciï les pacients amb infecció per VPH i alteracions citològiques lleus o absents que presentaran progressió a CIN2-3/HSIL o càncer, cosa que implica el seguiment d'un gran nombre de dones sense risc de desenvolupar càncer cervical. En els darrers anys s'ha observat que p16^{INK4a}, una proteïna humana reguladora del cicle cel·lular està sobreexpressada de forma molt constant en lesions cervicals d'alt grau i càncers de cèrvix produïts per la infecció del VPH-

AR. La seva expressió indica l'existència d'interacció entre el virus i el genoma cel·lular i és especímicament intensa en les lesions d'alt grau i els càncers, mentre que en les lesions de baix grau la seva expressió és molt variable, per la qual cosa es planteja que podria tenir un paper en la identificació de les dones amb lesions lleus que tenen risc de progressió.

Sobre aquestes dues premises, aquesta tesi es planteja d'acord amb les següents **dues hipòtesis**:

1. Les dones amb infecció per VPH-AR i citologia normal poden tenir un risc de progressió semblant al de les dones amb citologia d'ASC-US o LSIL.
2. La sobreexpressió de p16^{INK4a} en les lesions cervicals causades per VPH-AR, podria ser útil en la identificació de lesions intraepitelials i, donat que reflexa la interacció del virus amb el genoma humà, podria senyalar les lesions amb més probabilitat de progressió.

III. OBJECTIUS

L'**objectiu general** de la present tesi és avaluar el risc de progressió a lesió d'alt grau de les dones amb infecció per VPH-AR i anomalies citològiques mínimes o absents i determinar si p16^{INK4a}, un dels nous marcadors moleculars de lesió premaligna i maligna associada a VPH, pot aportar dades rellevants respecte al risc de progressió d'aquestes lesions.

De forma particular, s'han plantejat els següents **objectius específics**:

1. Determinar el risc de progressió i la probabilitat de regressió espontània de les dones amb infecció per VPH-AR que presenten anomalies citològiques mínimes (ASC-US, LSIL) o citologia negativa, i analitzar si resultats diferents en la citologia impliquen una evolució diferent **(Estudi 1)**.
2. Avaluar si la càrrega viral determinada mitjançant la tècnica de captura d'híbrids millora la capacitat diagnòstica i/o proporciona informació sobre el pronòstic **(Estudis 1, 2 i 3)**.
3. Avaluar si altres factors, a més del resultat citològic i la determinació de la infecció per VPH-AR, influeixen en el risc de progressió **(Estudis 1 i 3)**.
4. Determinar la precisió de la tinció immunohistoquímica per p16^{INK4a} en el diagnòstic de les lesions premalignes cervicals **(Estudi 2)**.

5. Avaluar si la tinció immunohistoquímica per p16^{INK4a} permet identificar lesions premalignes associades a la infecció per VPH-AR no detectades en l'estudi histològic convencional (**Estudi 2**).
6. Estudiar si la tinció per 16^{INK4a} pot utilitzar-se com un marcador pronòstic de progressió/regressió de les lesions premalignes de baix grau (**Estudi 3**).

**IV. TREBALLS
REALITZATS,
MÈTODES I
RESULTATS**

La descripció de les pacients, així com la metodologia utilitzada en les diferents investigacions realitzades es troben detalladament explicades en les seccions de “Material i Mètodes” de cadascun dels tres articles que constitueixen el cos doctrinal de la present Tesi Doctoral

Tots tres articles s’inclouen a continuació tal i com es troben en la literatura científica.

Estudi 1

Progression to CIN2-3 of High Risk-Human Papillomavirus positive women: do negative, ASC-US or LSIL cytological result imply a different risk?

Marta DEL PINO^a, MD; Aureli TORNÉ^a, MD; Immaculada ALONSO^a, MD;
Raquel MULA^a, MD; Narcís MASOLLER^a, MD; Victòria FUSTÉ^b, MD;
Jaume ORDÍ^{b*}, MD

International Journal of Cancer

(Submitted)

Factor d'impacte: 4,55

Rànkings: 30/132 (1er quartil)

Progression to CIN2-3 of high risk-HPV positive women:
do negative, ASC-US or LSIL cytological result imply a
different risk?

Marta DEL PINO^a, MD; Aureli TORNÉ^a, MD; Immaculada ALONSO^a, MD;
Raquel MULA^a, MD; Narcís MASOLLER^a, MD; Victòria FUSTÉ^b, MD; Jaume
ORDI^{b*}, MD

a Department of Obstetrics and Gynecology, IDIBAPS-Hospital Clínic,
University of Barcelona, Faculty of Medicine, Barcelona, Spain

b Department of Pathology, IDIBAPS-Hospital Clínic, University of Barcelona
Faculty of Medicine, Barcelona, Spain

* Corresponding author. Department of Anatomical Pathology, Hospital
Clínic, University of Barcelona School of Medicine, C/Villarroel 170, 08036-
Barcelona, Spain. Fax: +34 93 2275717.
E-mail address: jordi@clinic.ub.es (J. Ordi).

ABSTRACT

Although there is information on the progression risk to cervical neoplasia grade 2-3 (CIN 2-3) of women with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), there is little data about the risk in women with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection and atypical squamous cells of unknown significance (ASC-US) or normal cytology. Our purpose was to evaluate the progression risk of women with HR-HPV infection having either LSIL, ASC-US or no cytological abnormalities and to analyze whether different cytological result implies different risk. 530 women (median age 33.9; range 15-74) with HR-HPV infection and normal, ASC-US or LSIL cytology were prospectively recruited and grouped at enrollment according to the initial cytological/histological diagnosis. Women were examined every 6 months by cytology, colposcopy, and HR-HPV by Hybrid Capture-2 (HC2), for at least 12 months (median 19.0). Progression to CIN2-3 was observed in 47(8.9%) women, regression to negative cytology and negative HR-HPV in 199(37.6%), and persistent infection or lesion in 284(53.6.0%). There were no statistically significant differences in the cumulative incidence rate of progression or regression between the three groups. The progression risk of women with normal, ASC-US or LSIL diagnoses was 9.4%, 12.9% and 7.9% respectively (p=NS). The progression rates were higher for women older than 35 years-old (13.3% vs 6.3%; p=0.006) and those with previous history of cervical lesion (43.1 vs 4.7; p<0.001). Those data suggest that women with HR-HPV infection and normal cytology could have the same progression risk than those with ASC-US or LSIL and probably they benefit from the same management.

Keywords: human papillomavirus · LSIL· ASC-US· normal cytology. follow-up· progression · regression

INTRODUCTION

The main objective of the cervical cancer (CC) screening is the identification of women with high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2-3), a premalignant lesion with a high risk of progression to CC. Pap test screening has had a significant impact in reducing the incidence and mortality from CC because its ability to detect these premalignant lesions (1;2)

However, in the last few decades, the use of cytology has been criticized, mainly because of its low sensitivity. In a meta-analysis including 62 different reports Nanda et al showed that the sensitivity of cytology ranged from 30 to 87%, with most studies reporting sensitivities around 50-60% (3), pointing out the need of more sensitive techniques of screening. Thus, molecular techniques of detection of high-risk human papillomavirus (HR-HPV), the cause of CC and their precursors, have increasingly being used in the screening and the management of patients with cervical pathology (4;5). There is now strong evidence that the sensitivity of HR-HPV tests to detect CIN2-3 and CC reaches figures around 95% (6-8), much higher than the sensitivity of the cytology.

The second major limitation of cytology is that, although is considered a highly specific technique, it detects not only CC and the truly premalignant high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), the cytological counterpart of CIN2-3, but also a significant number of women with mild cytological

abnormalities, i.e. atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), who have a low risk of progression to CIN2-3 and CC. Although these lesions have a low progression risk some studies have shown that colposcopy examination with directed biopsy in patients with ASC-US and LSIL detects CIN2-3 in 5-20%, (9-11) and that 10-15% of the rest of these patients develop CIN2-3 after a follow-up of 2 years (10;12). These facts justify that current protocols recommend colposcopy examination or follow-up with a repeat Pap-test at 6 and 12 months and/or HPV testing.

The addition of HR-HPV testing to cervical screening and the management of cervical lesions has resulted in a significant number of women positive for HR-HPV who have transient or non progressive infections (13-15). Different management approaches have been proposed for positive HR-HPV women according to the cytological result (11;16) but there are no agreement in which is the best follow-up option for women with HR-HPV infection and normal cytology.

The aim of this study is to evaluate the risk of progression to CIN2-3 of women with HR-HPV infection who have minimal (ASC-US, LSIL) or no cytological abnormalities and to analyze whether different cytological result implies different risk of progression, with the objective of providing further evidence that might help to establish the best management for those patients.

PATIENTS AND METHODS

Study design and case selection

The present study has been conducted at the Colposcopy Unit of the Hospital Clinic of Barcelona, which represents a hospital based, tertiary care facility where women with abnormal cytology (ASC, LSIL, or HSIL) and/or HR-HPV infection detected in the screening programs are referred to. At first visit all women attending the Unit routinely undergo a complete study including clinical history, Pap-test, HR-HPV test using Hybrid Capture 2 (HC2), and digital colposcopy exam. According to standard protocols, all women with abnormal cytology (ASC-US or higher) or positive result in HPV testing and an abnormal transformation zone undergo a colposcopy-directed biopsy and/or an endocervical curettage if the transformation zone is not visible or is only partially visible.

From all women attending this colposcopy unit from January 2000 to July 2008 due to an abnormal cytology or an HPV infection diagnosed within the previous 6 months, we prospectively recruited those that fulfilled the following criteria: 1) positive HR-HPV testing; and 2) Pap smear with normal, ASC-US or LSIL result.

The following were considered criteria of exclusion: 1) histological diagnosis of CIN2-3 or carcinoma in the biopsy and/or endocervical curettage; 2) previous history of cervical cancer; 3) previous abnormal Pap smear or HR-HPV positive result in the 3 years before the enrollment to the study; 4) previous treatment for CIN2-3 performed within the previous three years.

986 women were eligible for the study. 110 women were excluded because of a result of CIN2-3 in the biopsy performed at first visit, 15 were

excluded because previous history of cervical cancer, 182 because of abnormal Pap smear or HR-HPV positive result between 6 months and 3 years before the enrollment at the study and 65 because of previous treatment for CIN2-3 in the 3 years previous to the entrance in the study. Thus, 614 women were initially included in the study. From these patients, 84 patients were lost to follow-up, and were consequently excluded. Therefore, 530 patients were finally included in the analysis.

Patients were grouped according to their cytology result at first visit. In 149 patients a colposcopically directed biopsy (CDB) was performed in the first visit. Patients with CIN1 biopsy were classified as LSIL regardless the cytology result (negative, ASC-US or LSIL); those patients with negative biopsy were classified according to their cytology.

A history of previous cervical lesion or treatment was identified in 58 (10.9%) patients. In all these women the previous lesion was diagnosed more than three years before the entry in the current study and all of them had had several normal cytology and/or negative HR-HPV testing in the three years previous to the enrolment.

Information on HIV status was recorded in 478 (90.2%) of the patients. Fifty-two (10.9%) women were HIV positive. All patients had been on antiretroviral therapy since the identification of HIV infection. CD4 cells were within normal ranges and plasma viral load was not detectable in any of the women.

The study was approved by the Institutional Ethical Review Board.

Cytology, colposcopy and HR-HPV testing

The exocervical smear for the cytology was obtained with an Ayre spatula and the endocervical sample using a cytobrush; Cytology result was evaluated according to the criteria of Bethesda 2001. (17) Colposcopy was performed using a colposcope Olympus Evis Exera II CV-180 (Olympus, Barcelona, Spain) after preparing the cervix with 3% acetic acid. Colposcopic findings were described following the criteria of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (Barcelona 2002).

Cervical specimens for HR-HPV testing were collected using the Digene cervical sampler kit (Digene, Gaithersburg, Maryland). The samples were stored at -20°C until further processing. HR-HPV detection was performed using the commercially available HC2 system (Digene). All the samples were analyzed only for the presence of HR-HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68). The chemoluminescent reaction is read by a luminometer, which provides relative quantification of each individual sample which is compared with the mean of a series of positive controls containing 1.0 pg/mL. This cut-off of 1 relative light unit (RLU) (1.0 pg/mL) was used to classify a specimen as positive or negative.(18) The RLU value of each individual sample was recorded.

Follow-up Routine and Treatment Protocol

In all patients the follow-up controls were scheduled every 6 months. Cytology, HR-HPV test and colposcopy, with colposcopically directed biopsy (CDB) or endocervical curettage (ECC) if indicated, were performed in each visit. Indications of CDB or ECC during follow-up were: HSIL result in the Pap

test or significant worsening in colposcopy pattern or increasing of lesion size. Patients who developed CIN2-3, or negativize both the cytology and the HR-HPV test were excluded from the follow-up protocol. All patients with persistence of HR-HPV test or abnormal cytology were followed-up for a minimum period of 12 months. Thus, each patient's case had at least two colposcopy examinations, two Pap tests and two tests for HR-HPV.

Patients were grouped according to their outcome during the follow-up. Regression was defined as one or more negative results in the Pap test, with a negative HR-HPV test detection and, if available, a negative result in the histological diagnosis during follow-up. Persistent cytological or histological abnormalities (ASC-US or LSIL/CIN1) and /or positive HR-HPV testing were considered as persistent lesion. We independently analyzed three different situations: 1) patients having persistent ASC-US or LSIL/CIN1 with positive HR-HPV; 2) patients having persistent ASC-US or LSIL/CIN1 with negative HR-HPV detection; 3) patients with normal cytological result but a positive HR-HPV test.

Progression was defined as a histological diagnosis of CIN2-3 during the follow-up. All patients who developed a CIN2-3 were treated using loop electrosurgical excision procedure (LEEP).

Data Analysis

The data were analyzed with SPSS program (SPSS.IncTM . Version 15.0). The statistical methods used were mostly descriptive. Chi-square or Fisher exact tests were used as appropriate for comparisons between categorical variables. ANOVA tests were used for comparisons of quantitative

variables. The results are presented as absolute numbers and percentages or median and range.

All the analyses were repeated after stratifying by age (≤ 35 years-old versus > 35 years old), viral load (1-10, 10-100, >100 RLU), previous cervical lesion and HIV status, to evaluate the influence of these factors in the results and to avoid confusion factors.

The risk of progression and regression in each of the three groups (normal cytology, ASC-US and LSIL) for each time interval was computed by dividing the number of cases diagnosed in that interval by the number of women at risk during that interval. Using Kaplan-Meier methods, we calculated cumulative incidence rates (CIRs) with 95% confidence intervals for each interval up to 90.9 months.

RESULTS

From the 530 women recruited for the study, 55 (10.38%) had been referred for HR-HPV infection, 188 (35.47%) for ASC-US HR-HPV positive and 287 (54.15%) for LSIL. Median age of the overall group was 33.9 (range 15-74). Table 1 summarizes the age and the median viral load of the patients at the entry in the study.

The cytological/histological diagnosis at enrollment, after the first visit were: normal cytology in 117 women (22.1%), ASC-US in 70 (13.2%) and LSIL/CIN1 in 343 (64.7%). The correlation between the referral diagnoses and the diagnoses given after the first visit is summarized in Table 2.

In 149 patients a colposcopically directed biopsy was performed in the first visit. In 41 cases the biopsy was negative and in 108 cases the biopsy was diagnostic of CIN1. 38 of the patients with negative biopsy had a normal cytology and 3 had an ASC-US cytological result. From the 108 patients with CIN1 biopsy, 5 had a normal cytology, 4 an ASC-US cytological result and 99 a LSIL. All the patients with a CIN1 biopsy was included in the LSIL group.

Median follow-up period was 19.0 (range 6 to 90.9). Forty-seven patients (8.9%) progressed to a CIN2-3 during follow-up. 199 women (37.6%) spontaneously regressed and 284 (53.6%) persisted with ASC-US or LSIL/CIN1 and/or HR-HPV positive test. Table 3 shows the final outcome according to the initial result in the Pap test. There were not differences in the outcomes of those patients in which a biopsy was performed comparing to the patients with only a cytology exam. The rate of progression of patients with normal cytology and HPV infection was 7.9% (CI 95%: 1.7%-20.8%) and 10.3% (CI 95%: 5.2%-18.7%) for those with and without biopsy performed respectively (p 0.695). For women with ASC-US the rate of progression was 0% (CI 95%: 0.0%-56.2) and 13.4% (CI 95%: 7.2%-23.6%) for those with and without biopsy respectively (p 0.49), and for women with LSIL the progression risk was 10.2% (CI 95%: 5.8%-17.3%) and 6.8% (CI 95%: 4.2%-10.8%) (p 0.28).

The overall cumulative incidence rate (CIR) of progression to CIN2-3 according to the initial cytology result is shown in figure 1A. Figure 1B shows the CIR of regression according to the initial cytology result. No significant differences in progression or regression rates were observed between the different groups. In 284 women (53.6%) the lesion persisted at the end of the

follow-up. From these women with persistent lesions at the end of the follow-up, in 161 (56.7%) both the cytological alteration and the HR-HPV infection persisted, 102 (35.9%) had a persistent HR-HPV positive test with negative cytological result, and 21 (7.4%) showed negative test for HR-HPV and persistence of ASC-US/LSIL in the cytology.

The risk of progression to high grade lesion according to age at enrolment, history of previous cervical lesion and HIV status is summarized in Table 4. As shown in this table, women older than 35 and patients with previous history of cervical lesion or treatment for CIN showed a significantly higher progression risk.

The median time to progression to CIN2-3 was 16.4 months (range 5.3-63.7). No differences in time of progression to CIN2-3 were observed according to the initial cytological diagnosis (12.5 month for negative, 18.1 for ASC-US and 17.0 for LSIL respectively; $p=0.072$). The median time to progression was shorter for women under 35 than for women above 35 years (13.6 vs. 17.1 months; $p=0.026$). The median time to negativization was also shorter in young women (11.9 vs. 14.0 months; $p=0.026$).

Table 5 shows the outcome after follow-up according to the VL. There was no relation between viral load as measured with HC2 and risk of progression. HR-HPV test became negative during the follow up in forty one patients with normal cytology (41/117; 35.0%), twenty-five patients (25/70; 35.7%) with ASC-US and 147 patients with LSIL (147/343; 42.9%). Differences were no significant ($p= p 0.236$). The mean viral load at enrolment of patients with a persistent HR-HPV infection during the follow-up was no significantly different

than the mean viral load of the patients in which the infection regressed (556.4 vs. 499.8; $p=0.102$).

All the women who progressed to CIN2-3 had an HPV persistent infection. None of 213 (0%; CI 95%: 0%-1.8%) women becoming negative for HR-HPV during follow-up progressed to CIN2-3, whereas, 47 out of 317 (14.8%; CI 95%: 11.3%-19.2%) women who persisted with HR-HPV positive test progressed to high grade lesion ($p<0.001$).

DISCUSSION

The most remarkable result of our study was that patients with HR-HPV infection and mild or no cytological abnormalities showed similar progression risk during follow-up independently of the cytological result. Interestingly, those women with HR-HPV infection and normal Pap smears showed progression rates similar to those with ASC-US or LSIL. Thus, while HR-HPV testing provides relevant information in women with ASC-US or negative cytology (19), the cytology result seems not to add valuable information to discriminate the progression risk of the patients, except for women with HSIL lesions. The reported evidence on the progression risk of women with normal cytology and HR-HPV infection is very limited and there is no standardized management for those women. Most previously published reports on this issue include both HR-HPV negative and positive women (20), whereas our study includes only HR-HPV positive women.

In our series, significant differences were found in median viral loads between the three groups of patients at enrolment, with higher viral loads being

more likely associated with cytological abnormalities. In a previous study by our group (18), median viral loads were significantly higher in CC and HSIL than in LSIL or normal cases. Although viral load as measured by HC2 has been criticized mainly because there is no indication of the number of the cells collected, [3] several studies have shown this correlation between viral loads and severity of lesions (21;22). Studies using polymerase chain reaction have also found similar associations (23;24). It has also been shown that most women with high viral loads have cervical abnormalities (25). Using semi quantitative and quantitative approaches, several studies have suggested that the amount of HR-HPV DNA present in a cervical sample can be of value to predict prevalent or incident high-grade SIL (23;26-28). Despite those differences, in our study HR-HPV viral load did not predict the progression risk neither in the patients with negative cytology nor in those with ASC-US or LSIL. Although there are discrepant results in the literature regarding the possible usefulness of HR-HPV viral load, with some reports suggesting that viral load might be a risk factor for the progression to CIN2-3 and CC, (20;29), most studies do not find this association (30). Thus, only persistent HR-HPV infection and probably not viral load is associated with progressive CIN. (20;31-33) Our data confirm that persistent HR-HPV infection is a key prognostic risk factor of developing CIN2-3. (19;20;32;33). In our study none of the women who negativize the HPV infection develop a high grade lesion during the follow-up.

In agreement with other studies that claimed older ages were risk factor for persistent HPV infection and subsequently development of high grade cervical lesions (34;35) we find that those women older than 35 years old are at

high risk of progression than younger women. However, discrepant results have been reported , some studies did not find any role of age in progression/regression risk of the women with HPV infection and normal/minor abnormal cytology (20;36;37).

Interestingly, those women with a history of previous cervical lesion but having negative controls during the previous three years before the entry in the study had a higher risk of developing a high grade lesion when they become HPV positive again compared with women without previously cervical lesion. This higher risk of progression to CIN2-3 was independent of the cytological result at enrolment. Data about the long-term risk of CIN recurrence among women with previous CIN is very limited. The higher risk of developing high grade lesion or cervical cancer in women previous treated had been reported by many authors (38-40). Soutter et al reported in a meta-analysis around 2.8 times greater risk of developing invasive disease in those women treated for CIN compared with naïve women (41), without relationship between the year of publication and the rates of posttreatment invasive cancer (41). Melnikov et al founded that the risk was associated with initial CIN grade, treatment type, and age. (38). Today it is accepted that even undergoing active long-term surveillance, the risk of invasive cervical cancer among these women is about 3-5 times greater compared with women without previous CIN. (38-42). However, the optimal length and intensity of surveillance for this group remains unclear.

In this prospective study no differences for progression were found in HIV patients compared with the immunocompetent women. Despite It has been recently reported that the risk of CIN is not associated with decreased levels of

CD4 lymphocytes, duration of HIV infection, use of antiretroviral medication or plasma HIVL,(43) decreased CD4 lymphocytes, high human immunodeficiency viral load (HIVL) and HR-HPV infection are considered risk factors for CIN. (44;45) In our study all women followed a strict control of the HIV infection and maintained an adequate immunological status.

There are some possible limitations in this study. The first one is that in many occasions we found differences between the diagnoses of referral and the diagnoses at enrollment after first visit. It is well established that the concordance in the diagnosis of cervical lesions (either cytological or histological) is about 50%. Many studies reported Kappa index < 0.5 between pathologists from the same or different institutions. (46-49). Our data agree with these results. The number of women referred for HPV infection and normal cytology was expected to be higher than it was. It could be due to the HR-HPV testing is not establish in all Spanish medicals centers, yet. The addition of the HPV detection is being gradually implemented in the cervical cancer screening.

The second is about the little amount of women with ASC-US diagnoses at referral. The reason could be that women with ASC-US cytological result and HR-HPV negative test are returned to the screening program in their reference medical centre, not being considered to have higher risk than women with HR-HPV negative test and normal cytology.

No HPV typing data was available. One of the weaknesses of the HC2 assay is that it does not allow identifying specific HPV types. It has been shown that certain HR-HPV types, mainly types 16 and 18, are preferentially associated with cervical neoplasias (50-53). Another possible limitation is that a

number of our cases underwent a biopsy possibility that the biopsy procedure might have altered the evolution of the lesion. Nevertheless, there were not differences in the outcomes of those patients in which a biopsy was performed comparing to the patients with only a cytology exam. Moreover, studies about the effect in the natural history of cervical lesions of using both cytology and histology have shown no effect of biopsy on the short term of the disease. (54;55)).

In conclusion, our findings suggest that women with HR-HPV infection and normal cytological result could have the same progression risk than those with ASC-US or LSIL cytology and probably they should benefit from the same strict management. Further studies should be conducted in order to assess the relevance of the HR-HPV infection in patients with normal cytology and to establish the best management for these patients. Adding HR-HPV detection to triennial cytology as a screening option for cervical cancer in women aged ≥ 35 years appears to be more cost-effective than conventional cytology alone. (16;56;57). But, to assure the effectiveness of HPV testing in primary screening, it would be necessary an efficient policy for the management of women who test positive for the test, but have negative or minimal changes (ASC-US) in the cytological result.

Table 1. Age and median viral load of patients at entry in the study according to their initial cytology. Results in median and range.

	Cytology result at enrollment			p
	Negative	ASC-US	LSIL	
N	117	70	343	
Age	33.5 (15-73)	34.1 (15-55)	31.0 (18-74)	0.123
Viral load	156.0 (1.0-2878.2)	347.0(1.3-2502.3)	702.1 (1.1-5747.3)	<0.001

Table 2. Correlation between referral diagnoses and diagnose given after first visit (diagnoses at enrollment)

		Diagnosis at enrollment			
		Negative (n=117)	ASC-US (n=70)	LSIL (n=343)	
Cytology at referral	Negative	n	11	4	40
		%	20,0%	7,3%	72,7%
	ASC-US	n	59	40	89
		%	31,4%	21,3%	47,3%
	LSIL	n	47	26	214
		%	16,4%	9,1%	74,6%

Table 3. Outcomes according to the initial result in Pap test. Results expressed in n (%) and CI 95%

Outcome after follow-up	Diagnoses at enrollment			p
	Negative (n= 117)	ASC-US (n=70)	LSIL (n=343)	
Regression	44 (37.6%) (29.4%-46.7%)	22 (31.4%) (21.8%-43.0%)	133 (38.8%) (33.8%- 44.0%)	0.40
Persistence	62 (53.0%) (44.0%-61.8%)	39 (55.7%) (44.1%-66.7%)	183 (53.3%) (48.1%-58.6%)	0.88
Progression	11 (9.4%) (5.3%-16.1%)	9 (12.9%) (6.9%-22.7%)	27 (7.9%) (5.5%-11.2%)	0.23

(p 0.63)

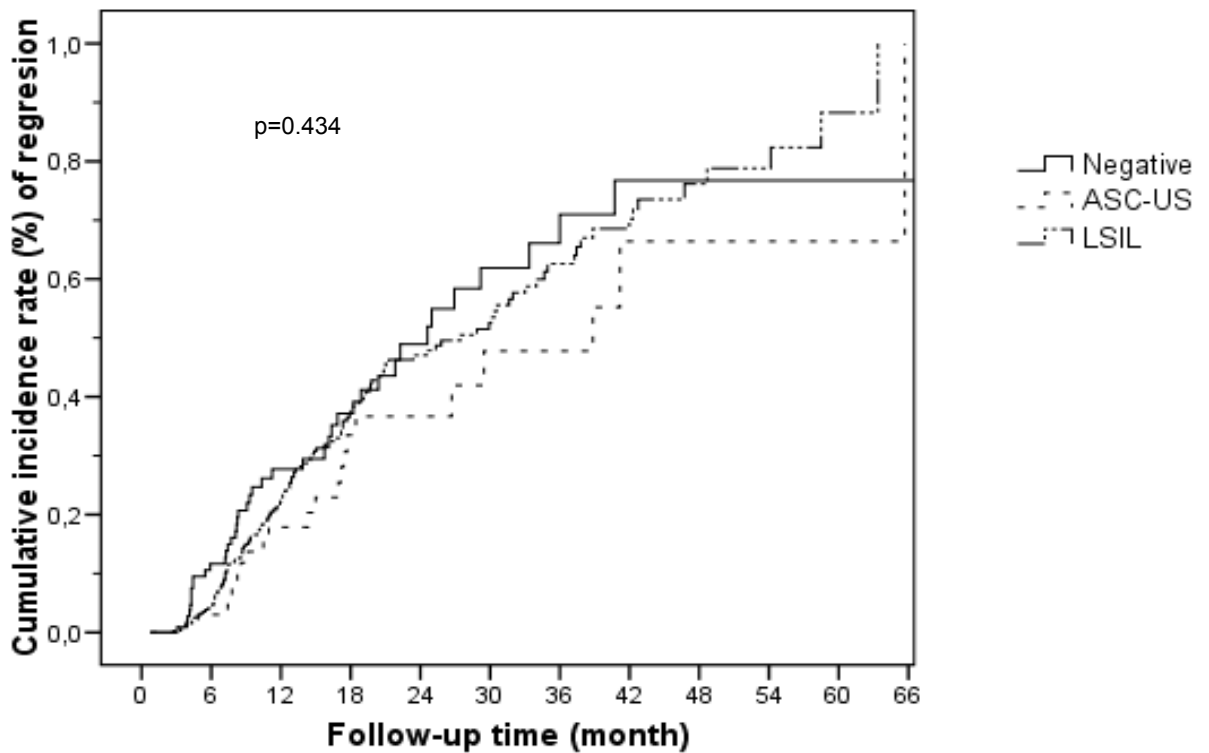
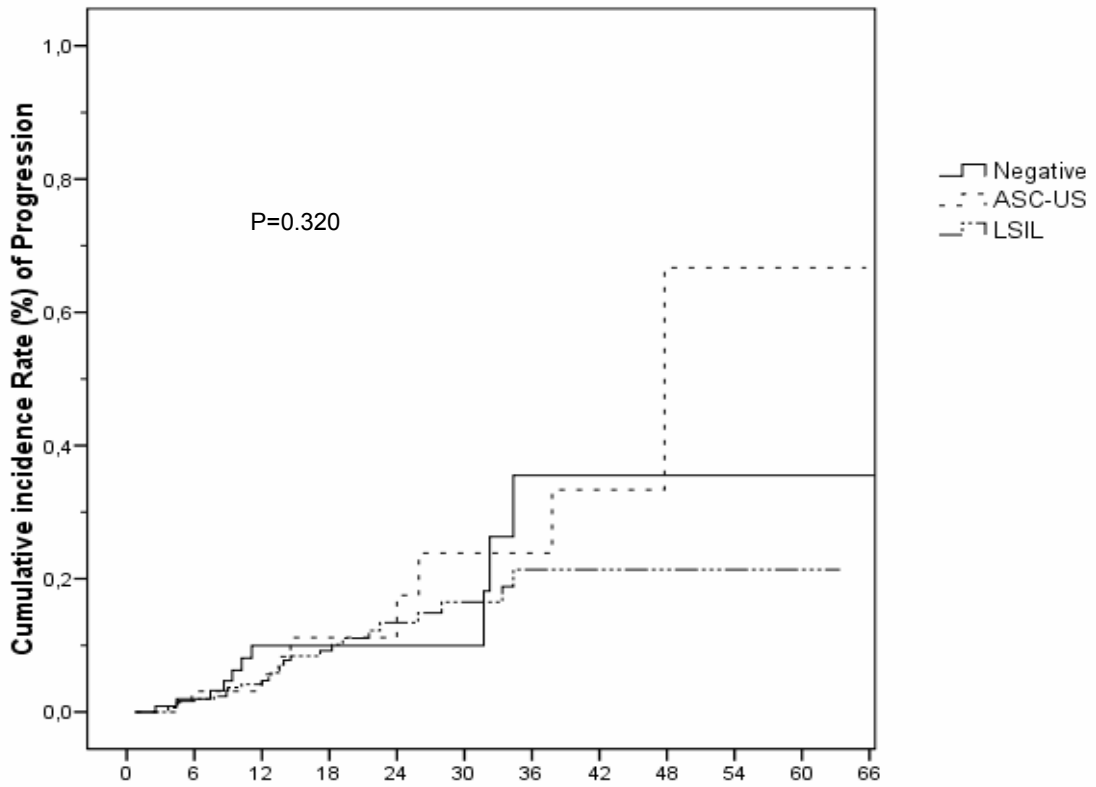
Table 4. Age at enrolment, initial cytological result, HIV status and progression risk.

	n	Progression to CIN2-3		p
		n	(%)	
Age at enrolment				
≤35	334	21	(6.3)	0.006
>35	196	26	(13.3)	
Previous cervical lesion				
No	472	22	(4.7)	<0.001
Yes	58	25	(43.1)	
HIV status				
Negative	426	42	(9.9)	0.252
Positive	52	2	(3.8)	

Table 5. Outcomes according to the initial viral load in HR-HPV detection by HC2. Results expressed in n (%) and CI 95%

Outcome after follow-up	HC2 relative light units		
	1-10 (n= 116)	10-100 (n=132)	>100 (n=290)
Regression	49 (42.6%) (33.9%-51.7%)	42 (33.9%) (26.1%-42.6%)	108 (37.1%) (31.8%-42.8%)
Persistence	60 (52.2%) (43.1%-61.1%)	67 (54.0%) (45.3%-62.6%)	157 (54.0%) (48.2%-59.6%)
Progression	6 (5.2%) (2.4%-10.9%)	15 (12.1%) (7.5%-19.0%)	26 (8.9%) (6.2%-12.8%)

(p 0.34)



Time	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	>60
NEGATIVE	117	91	65	45	35	21	20	15	13	11	3
ASC-US	70	66	48	36	22	14	11	9	9	5	2
LSIL	343	308	222	157	107	78	57	46	31	23	17

Reference List

- (1) Sasieni PD, Cuzick J, Lynch-Farmery E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. *Br J Cancer* 1996 Apr;73(8):1001-5.
- (2) Screening for squamous cervical cancer: duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication for screening policies. IARC Working Group on evaluation of cervical cancer screening programmes. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986 Sep 13;293(6548):659-64.
- (3) Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000 May 16;132(10):810-9.
- (4) Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1995;64:1-378.
- (5) Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002 Apr;55(4):244-65.
- (6) Brink AA, Zielinski GD, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ. Clinical relevance of human papillomavirus testing in cytopathology. *Cytopathology* 2005 Feb;16(1):7-12.
- (7) Lorincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 2003 Aug;127(8):959-68.
- (8) Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K, Radberg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007 Oct 18;357(16):1589-97.
- (9) Al-Nourhji O, Beckmann MJ, Markwell SJ, Massad LS. Pathology correlates of a Papanicolaou diagnosis of low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer* 2008 Dec 25;114(6):469-73.
- (10) Walker JL, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Am J Obstet Gynecol* 2006 Aug;195(2):341-8.
- (11) Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Oct;197(4):346-55.
- (12) Cox JT, Schiffman M, Solomon D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2003 Jun;188(6):1406-12.

- (13) Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGoogan E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004 Jan;57(1):68-72.
- (14) Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006 Sep 1;119(5):1095-101.
- (15) Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995 Apr;171(4):1026-30.
- (16) Spitzer M. Screening and management of women and girls with human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol* 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S14-S18.
- (17) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
- (18) Ordi J, Alonso I, Torne A, Esteve R, Sierra E, Campo E, Puig-Tintore LM. Human papillomavirus load in Hybrid Capture II assay: does increasing the cutoff improve the test? *Gynecol Oncol* 2005 Nov;99(2):313-9.
- (19) Kjaer S, Hogdall E, Frederiksen K, Munk C, van den BA, Svare E, Meijer C, Lorincz A, Iftner T. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res* 2006 Nov 1;66(21):10630-6.
- (20) Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail CK, Sautiere JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mouglin C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003 Sep 1;106(3):396-403.
- (21) Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Greenberg MD, Lorincz AT. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000 Jan 5;283(1):87-93.
- (22) Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I, Petry U, Baur S, Kirchmayr R, Michels W, Schneider A. Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol* 1998 May 1;10(1):49-56.
- (23) Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllensten UB. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000 Jun 24;355(9222):2189-93.
- (24) Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, Adami HO, Gyllensten UB, Melbye M. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000 Jun 24;355(9222):2194-8.

- (25) Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I, Lorincz A, Chan WK, Krausz T, Soutter P. HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999 Oct;81(3):554-8.
- (26) van DM, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002 Apr 1;98(4):590-5.
- (27) Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer* 1999 Jul;80(9):1306-11.
- (28) Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 2001 Jun 15;84(12):1616-23.
- (29) Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003 Sep 3;95(17):1336-43.
- (30) Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, Rush BB, Gravitt PE, Schussler JE, Schiffman M. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002 Jul 20;360(9328):228-9.
- (31) Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, van der Linden HC, Runsink AP, de Schipper FA, Meijer CJ. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer* 2001 Aug 3;85(3):398-404.
- (32) Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001 Dec 26;286(24):3106-14.
- (33) Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, Clavel C. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* 2002 Dec 10;102(5):519-25.
- (34) Franceschi S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res* 2005;166:277-97.
- (35) Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Schenck U, Baldauf JJ, Da SD, Anttila A, Nieminen P, Prendiville W. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1. *Cytopathology* 2008 Dec;19(6):342-54.
- (36) Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003 Feb 10;103(4):519-24.

- (37) Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, Verheijen RH, Meijer CJ. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001 Nov 24;358(9295):1782-3.
- (38) 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 May 20;101(10):721-8.
- (39) 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 Nov 19;331(7526):1183-5.
- (40) Soutter WP, de Barros LA, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaidis E, Kitchener HC. Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 1997 Apr 5;349(9057):978-80.
- (41) Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006 Apr 15;118(8):2048-55.
- (42) 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 Nov 24;335(7629):1077.
- (43) Lehtovirta P, Paavonen J, Heikinheimo O. Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *Int J STD AIDS* 2008 Jan;19(1):37-41.
- (44) Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005 Aug 1;121(2):226-32.
- (45) Robinson WR, Freeman D. Improved outcome of cervical neoplasia in HIV-infected women in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Patient Care STDS* 2002 Feb;16(2):61-5.
- (46) Sriamporn S, Kritpetcharat O, Nieminen P, Suwanrungraung K, Kamsa-ard S, Parkin DM. Consistency of cytology diagnosis for cervical cancer between two laboratories. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005 Apr;6(2):208-12.
- (47) Cibas ES, Dean B, Maffeo N, Allred EN. Quality assurance in gynecologic cytology. The value of cytotechnologist-cytopathologist discrepancy logs. *Am J Clin Pathol* 2001 Apr;115(4):512-6.
- (48) Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, Olsen CH, Miyazawa K, O'Connor DM. Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. *Obstet Gynecol* 2002 Aug;100(2):277-80.
- (49) Malpica A, Maticic JP, Niekirk DV, Crum CP, Staerke GA, Yamal JM, Guillaud MH, Cox DD, Atkinson EN, dler-Storthz K, Poulin NM, Macaulay CA, et al. Kappa statistics to measure interrater and intrarater agreement for 1790 cervical biopsy specimens among twelve pathologists: qualitative histopathologic analysis and methodologic issues. *Gynecol Oncol* 2005 Dec;99(3 Suppl 1):S38-S52.

- (50) Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. 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 Jul 20;97(14):1072-9.
- (51) van DM, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002 Apr 1;98(4):590-5.
- (52) Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000 Dec;81(Pt 12):2959-68.
- (53) Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis* 2006 Nov 1;194(9):1291-9.
- (54) 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. *Am J Obstet Gynecol* 2003 Jul;189(1):295-304.
- (55) del Pino M, Garcia S, Fuste V, Alonso I, Fuste P, Torne A, Ordi J. Value of p16^{INK4a} as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol* 2009;In press.
- (56) Goldie SJ, Kim JJ, Wright TC. Cost-effectiveness of human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in women aged 30 years or more. *Obstet Gynecol* 2004 Apr;103(4):619-31.
- (57) Holmes J, Hemmett L, Garfield S. The cost-effectiveness of human papillomavirus screening for cervical cancer. A review of recent modelling studies. *Eur J Health Econ* 2005 Mar;6(1):30-7.

Estudi 2

p16^{INK4a} immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women

Jaume Ordi ^{a*}, M.D., Sònia Garcia ^b, M.D., Marta del Pino ^b, M.D., Stefania Landolfi ^a, M.D., Immaculada Alonso ^b, M.D., Llorenç Quintó ^c, M.D., Aureli Torné ^b, M.D.

International Journal of Gynecological Pathology

2009 Jan;28(1):90-7

Factor d'impacte: 1,957

Rànkings: 23/60 (2º cuartil)

Original Article

p16^{INK4a} Immunostaining Identifies Occult CIN Lesions in HPV-positive Women

Jaume Ordi, M.D., Sònia Garcia, M.D., Marta del Pino, M.D., Stefania Landolfi, M.D.,
Immaculada Alonso, M.D., Llorenç Quintó, M.D., and Aureli Torné, M.D.

Summary: To evaluate whether p16^{INK4a} staining could help to recognize underestimated cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women positive for high-risk human papillomavirus (HR-HPV) with negative biopsy. Out of 1,259 women undergoing a histologic study and a simultaneous HR-HPV detection using the Hybrid Capture 2 test, we selected all patients testing positive for HR-HPV and having a negative biopsy (n = 139), as well as all women testing negative for HR-HPV with a biopsy of either CIN 1 (26 cases) or CIN 2 to 3 (11 cases). Of the remaining 1,083 women, we randomly selected for the purpose of controls, 50 cases negative for HR-HPV with negative biopsy and 100 cases positive for HR-HPV and with biopsy of CIN (50 CIN 1, 50 CIN 2–3). In all cases, immunohistochemical staining for p16^{INK4a} and a second evaluation of the initial biopsy was carried out. Thirty-four out of 139 biopsies (24.5%) testing positive for HR-HPV but having a negative biopsy were positive for p16^{INK4a}. Thirty of these cases (21.6%) were classified as harboring a CIN (11 CIN 1, 19 CIN 2/3) after reevaluation. Both the number of cases reclassified as CIN of any grade, or as CIN 2/3, were significantly higher for cases with HR-HPV load above 100 relative light unit ($P < 0.005$). Particular attention should be paid to biopsies from patients having positive Hybrid Capture 2. The risk of harboring undetected CIN of any type or CIN 2/3 is significantly higher for patients with high HR-HPV load. Immunostaining with p16^{INK4a} should be considered as a highly desirable addition to the histologic evaluation of cervical biopsy specimens in HR-HPV-positive women. **Key Words:** CIN—p16—Human papillomavirus.

The diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) relies on the identification of well-described morphologic features in the cervical biopsy, which is considered the gold standard for the diagnosis of premalignant lesions (1). According to current pro-

ocols, all lesions diagnosed CIN 2 or 3 should be treated due to their risk of progression to invasive carcinoma (2). Nevertheless, it has been repeatedly shown that the histologic diagnosis of CIN is affected by significant rates of discordance among pathologists (3–5). Several conditions such as atrophy, immature squamous metaplasia, severe inflammation with reactive epithelial changes, small representation of CIN lesions, and eosinophilic dysplasia (6) are particularly prone to cause difficulty to the histologic diagnosis (3).

High-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) are consistently associated with premalignant and malignant lesions of the uterine cervix (7,8). Molecular techniques to detect HPV are thus increasingly being used to improve the results of conventional strategies

From the Department of Pathology, School of Medicine, Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain (J.O., S.L.); Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain (S.G., M.d.P., I.A., A.T.); and Department of Epidemiology and International Health, School of Medicine, Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain (L.Q.).

Address correspondence and reprint requests to Jaume Ordi, M.D., Department of Anatomical Pathology, School of Medicine, Hospital Clínic, University of Barcelona, C/Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: jordi@clinic.ub.es.

of triage. HR-HPV testing by Digene Hybrid Capture 2 (HC2), a Food and Drug Administration-approved test, is widely used in the clinical management of cervical lesions because of its high sensitivity, which makes the test extremely useful for screening and triage (8–10). However, the low specificity of HC2 and of molecular techniques of HPV detection, in general, reduces their usefulness for particular cases (9,10).

Recent studies have shown that all HPV-associated carcinomas and their precursors show a strong overexpression of p16^{INK4a} as a consequence of the functional inactivation of pRb by the viral E7 (11–13). In recent years, p16^{INK4a} has been successfully demonstrated to be a sensitive and specific marker of HPV-associated carcinomas and CIN (12–18). It has been suggested that staining for this biomarker could help to identify more precisely CIN in tissue sections, and therefore reduce variation in interpretation of cervical lesions (13).

The usefulness of p16^{INK4a} in reducing interobserver variability, particularly its capacity to detect small foci of CIN, and the close relationship between HR-HPV infection and CIN, led us to study a series of cervical lesions having either positive HPV DNA testing with negative simultaneous biopsy or negative HPV DNA testing with biopsy result of CIN. In the study, we evaluated whether the ability of p16^{INK4a} staining to precisely identify premalignant and malignant HPV-associated lesions could help in recognizing underestimated or overestimated CIN lesions, which may have a clinical impact in the management of cervical disease.

PATIENTS AND METHODS

Study Design and Case Selection

The files of the pathology department at the hospital clinic were reviewed, looking for all women who had had a histologic study (colposcopically directed biopsy or endocervical curettage) and a concurrent HR-HPV detection using the HC2 test taken during the same visit. Thus, from December 1999 to March 2005, 1,259 women were identified. All women had been referred to the colposcopy clinic due to abnormal cytology (atypical squamous cells of any type, atypical glandular cells, or squamous intraepithelial lesions of any grade) in the 6 months before the admission.

The original diagnoses were established using pure morphologic criteria in hematoxylin and eosin-

stained sections, without knowledge of HPV status. In all, 416 were negative, 309 had a CIN 1, 489 had a CIN 2/3, and 45 an adenocarcinoma *in situ*. All biopsies had been evaluated by the same pathologist (Jaume Ordi).

Patients were classified in the following groups according to both HR-HPV test and biopsy results. Three hundred seventy-seven women were found to have a negative HR-HPV test with coincident negative biopsy. Seven hundred and six women had a positive HR-HPV test and a biopsy of CIN (283 CIN 1, 423 CIN 2/3). One hundred thirty-nine patients tested positive for HR-HPV and had a simultaneous negative biopsy. Thirty-seven women tested negative for HR-HPV and had a biopsy of CIN (26 CIN 1, 11 CIN 2/3).

The following study groups were selected from these women: 1) all patients (n = 139) testing positive for HR-HPV who had a simultaneous negative biopsy; 2) all women (n = 26) testing negative for HR-HPV and having a simultaneous biopsy of CIN 1; and 3) all women (n = 11) testing negative for HR-HPV and having a simultaneous biopsy of CIN 2 to 3. Of the remaining 1,083 women, the following groups were selected as controls: 1) 50 cases randomly chosen from the 377 women negative for HR-HPV and with negative biopsy; 2) 50 cases randomly selected from the 283 women positive for HR-HPV and with biopsy of CIN 1; and 3) 50 cases randomly selected from the 423 women positive for HR-HPV and with biopsy of CIN 2 to 3. Table 1 shows the mean age and HR-HPV viral load of the 6 study groups.

In all study groups, immunohistochemical staining for p16^{INK4a} was performed. Thereafter, a second evaluation was conducted in all cases. In this evaluation, after assessing and scoring the p16^{INK4a}-stained slides, a revision of the initial routinely processed hematoxylin and eosin slides was conducted and a final diagnosis was achieved. This final evaluation was conducted by 2 observers (Stefania Landolfi and Jaume Ordi).

Immunohistochemical Detection of p16^{INK4a}

Immunohistochemical studies were performed with the automated immunohistochemical system TechMate 500 (Dako Co, Carpinteria, CA), using the EnVision system (Dako). p16^{INK4a} was detected using the CINtec histology kit (clone E6H4, mtm Laboratories, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's protocol. In each series, a negative

TABLE 1. Mean age \pm SD and HR-HPV viral load of the 6 study groups

Study group (HR-HPV status/initial biopsy)	n	Age		HR-HPV viral load	
		Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range
Group A (HR-HPV +/negative)	139	36.9 \pm 11.6	16-84	350.9 \pm 609.7	1.1-2951.3
Group B (HR-HPV -/CIN 1)	26	33.8 \pm 8.4	19-50	—	—
Group C (HR-HPV -/CIN 2/3)	11	45.8 \pm 11.0	34-69	—	—
Group D (HR-HPV -/negative)	50	31.4 \pm 9.3	17-58	—	—
Group E (HR-HPV +/CIN 1)	50	31.4 \pm 11.2	16-72	974.6 \pm 985.5	1.1-2765.3
Group F (HR-HPV +/CIN 2/3)	50	39.3 \pm 11.6	21-76	622.7 \pm 724.2	12.9-3132.3

CIN indicates cervical intraepithelial neoplasia; HR-HPV, high-risk human papillomavirus.

control (omission of the primary antibody), and a positive control consisting of a CIN 3 were included. Staining was scored as negative, focal, or diffuse on the basis of nuclear and/or cytoplasmic staining. Cytoplasmic staining or reactivity in rare isolated cells (<5%) was considered as negative. Positivity was scored as diffuse when all basal and suprabasal cells in an area stained positive, and focal for cases with either focal staining of basal cells or any type of staining in suprabasal layers was present (19).

HPV Testing

Cervical specimens for HPV testing were collected using the Digene cervical sampler kit (Digene, Gaithersburg, MD). The samples were stored at -20°C until further processing. HPV detection was performed using the commercially available HC2 system (Digene). All the samples were analyzed only for the presence of HR-HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68). The chemoluminescent reaction is read by a luminometer, which provides relative quantification of each individual sample compared with the mean of a series of positive controls containing 1.0 pg/mL. This cut off of 1 relative light unit (RLU) (1.0 pg/mL) was used to

classify a specimen as positive or negative (10). The RLU value of each individual sample was recorded.

Treatment Protocol and Follow-up Routine

All women with histologic diagnosis of CIN 2 to 3 were treated. Cases of CIN 1 were also treated when one or more of the following criteria were present: large size, positive endocervical curettage, long-time persistence (at least 2 yr), or age above 40 years. All treatments were performed using loop electrosurgical excision procedure (LEEP).

All patients with biopsy diagnosis of CIN 1 and/or positive for HR-HPV and negative biopsy underwent follow-up controls that were scheduled every 6 months. Cytology and colposcopy with directed biopsy when abnormalities were detected were performed in each visit and HR-HPV test once a year. Patients were followed-up until negativization or fulfillment of the criteria of treatment.

Data Analysis

Data were analyzed with the program STATA (Version 9.0, StataCorp 2005, College Station, TX). Chi-square tests or Fisher exact tests were used as appropriate for comparisons between categorical

TABLE 2. Results of p16^{INK4a} immunostaining in the 6 study groups

Study group (HR-HPV status/initial biopsy diagnosis)	n	p16 ^{INK4a} immunostaining		
		Negative n (%)	Focal n (%)	Diffuse n (%)
Group A (HR-HPV +/negative)	139	105 (76)	10 (7)	24 (17)
Group B (HR-HPV -/CIN 1)	26	20 (77)	5 (19)	1 (4)
Group C (HR-HPV -/CIN 2/3)	11	0 (0)	0 (0)	11 (100)
Group D (HR-HPV -/negative)	50	46 (92)	4 (8)	0 (0)
Group E (HR-HPV +/CIN 1)	50	11 (22)	18 (36)	21 (42)
Group F (HR-HPV +/CIN 2/3)	50	0 (0)	1 (2)	49 (98)

CIN indicates cervical intraepithelial neoplasia; HR-HPV, high-risk human papillomavirus.

TABLE 3. p16^{INK4a} immunostaining categories, final diagnosis after slide review in the group of cases positive for HR-HPV but with negative initial biopsy

P16 ^{INK4a}	n	Biopsy final evaluation			P
		No lesion (n = 107)	CIN 1 (n = 13)	CIN 2/3 (n = 19)	
Negative	105	103 (98%)	2 (2%)	0 (0%)	<0.001
Focal	10	4 (40%)	6 (60%)	0 (0%)	<0.001
Diffuse	24	0 (0%)	5 (21%)	19 (79%)	<0.001

CIN indicates cervical intraepithelial neoplasia; HR-HPV, high-risk human papillomavirus.

variables. Agreement between final biopsy evaluation and p16^{INK4a} was evaluated using the weighted κ statistic.

RESULTS

The results of p16^{INK4a} immunostaining in the 6 study groups are shown in Table 2. Thirty-four out of 139 biopsies (24.5%) from group A (positive HR-HPV and negative initial biopsy) were positive for p16^{INK4a}. Table 3 shows p16^{INK4a} immunostaining categories and the final diagnoses after slide review in group A. After the second evaluation, 30 of these 34 (88.2%) p16^{INK4a}-positive cases were reclassified as harboring a CIN (11 as CIN 1 and 19 as CIN 2/3, one of them associated to adenocarcinoma *in situ*) due to the recognition of definite nuclear abnormalities. Thus, 21.6% of cases were reclassified as CIN after p16^{INK4a} staining, with 13.7% being reclassified as CIN 2/3. Reclassification as CIN was performed in 23/112 colposcopically directed biopsies (20.5%) and in 7/27 endocervical curettages (25.9%) (P = NS). The original referral cytologic diagnoses of cases from group A are shown in Table 4. The cause of the underdiagnosis in the initial evaluation was, in 22/30 cases, a small lesion missed in the routine observation (Fig. 1). In 5 of these 22 cases a marked cervicitis contributed to obscure the lesion (Fig. 2). The other 8 cases were reclassified as eosinophilic variant of CIN 2 that were underrecognized in the initial evaluation

TABLE 4. Referral original cytologic diagnoses in the group of cases positive for HR-HPV but with negative initial biopsy

Referral cytology	Biopsy final evaluation		
	No lesion (%)	CIN 1 (%)	CIN 2/3 (%)
ASC (n = 54)	44 (82)	5 (9)	5 (9)
L-SIL (n = 66)	55 (83)	7 (11)	4 (6)
H-SIL (n = 19)	8 (42)	1 (5)	10 (53)

ASC indicates atypical squamous cells; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; H-SIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; HR-HPV, high-risk human papillomavirus; L-SIL, low-grade squamous intraepithelial lesion.

(Fig. 3). The number of cases reclassified as CIN of any grade was significantly higher in cases having HR-HPV load above 100 RLU than in cases having HR-HPV load below 100 RLU (32.8% [21/64] vs. 12% [9/75]; P < 0.001). Also, the number of cases reclassified as CIN 2/3 was significantly higher in cases having HR-HPV load above 100 RLU than in cases having HR-HPV load below 100 RLU (20.3% [13/64] vs. 8% [6/75]; P < 0.05). No case negative for p16^{INK4a} was found to have CIN.

The results of p16^{INK4a} immunostaining in the cases negative for HR-HPV with positive initial biopsy (groups B and C) are provided in Table 5. All 11 biopsies diagnosed as CIN 2/3 had intense staining for p16^{INK4a} and none of them were downgraded in the second observation. Four cases initially diagnosed as CIN 1, all of them negative for p16, were reclassified as negative in the final evaluation and in 22 cases the initial diagnosis of CIN 1 was maintained in the final evaluation. p16^{INK4a} was scored negative in 72.7% of CIN 1 lesions negative for HR-HPV, and only 4.5% showed a strong staining. In contrast, p16^{INK4a} was negative in only 22% of CIN 1 lesions positive for HR-HPV and showed a strong reactivity in 42% of them (P < 0.001).

All cases from control group D (negative biopsy, negative HR-HPV) were either completely negative or showed only focal p16^{INK4a} immunostaining. In contrast, all biopsies from control group F (CIN 2/3, positive for HR-HPV) were positive for p16^{INK4a}, with 98% showing diffuse and strong staining. Seventy-eight percent of the biopsies from group E (CIN 1, positive HR-HPV) were positive for p16^{INK4a} but only 42% showed a diffuse positivity. The second evaluation confirmed the initial diagnosis in all cases from groups D to F.

Table 6 shows the results of p16^{INK4a} immunostaining in all cases of the study.

In all women from groups C and F the diagnosis of CIN 2 to 3 was confirmed in the LEEP specimen. Women with CIN 2 to 3 (groups C and F) were

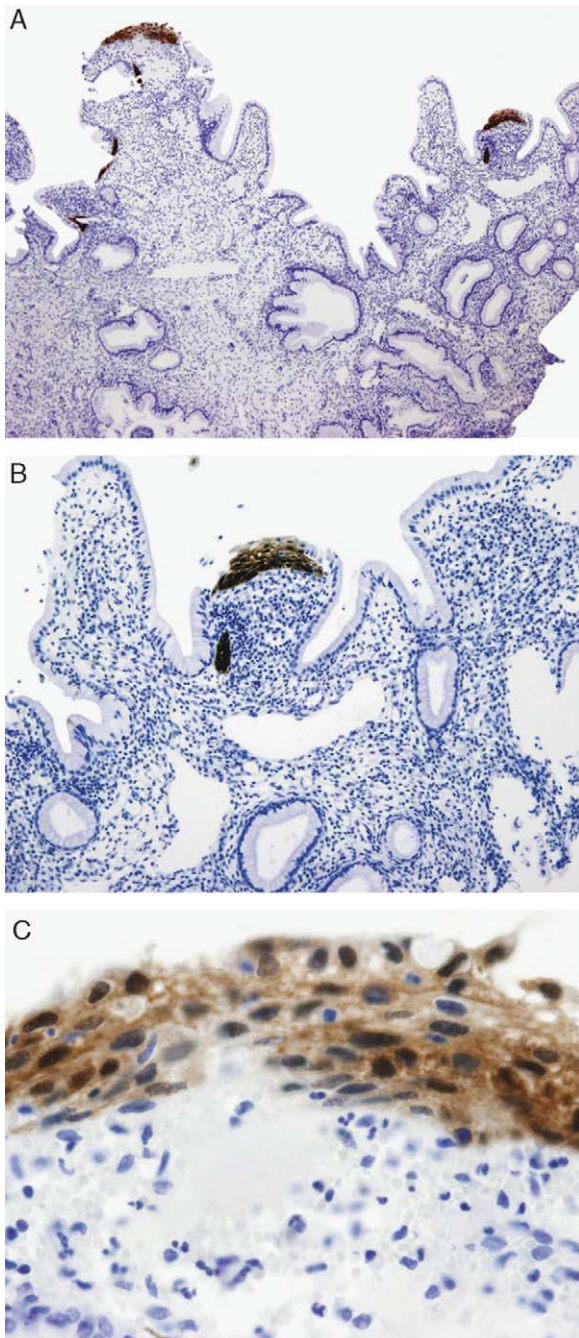


FIG. 1. A and B, Diffuse strong p16^{INK4a} immunostaining in a minimally represented cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 lesion initially not recognized. C, Higher magnification shows the nuclear changes characteristic of a CIN 2.

significantly older than women from the other groups ($P = 0.001$), but no differences were observed between women from groups C and F. In all patients from group B, the lesion regressed during follow-up. In group E, 12 women fulfilled criteria for treatment

during follow-up; the LEEP specimen showed a CIN 2 to 3 in 3 (25%). In women of group A, 16/19 (84.2%) diagnosed of CIN 2 to 3 in the revision, 3/13 (23.1%) patients with CIN 1 in the revision, and 10/107 (9.3%) diagnosed as negative in the revision developed a CIN 2 to 3 confirmed by LEEP during follow-up.

DISCUSSION

The most remarkable result of our study was that 21.6% of cases with initial negative biopsy but concurrently positive for HR-HPV, were reclassified as harboring a CIN after p16^{INK4a} staining. It is particularly noteworthy that 55.9% of them (13.7% of the overall group) were reclassified as CIN 2/3, thus having required treatment if properly diagnosed. Indeed, in 84.2% of them CIN 2 to 3 was detected during follow-up. Although p16^{INK4a} staining was the key to the diagnosis, the presence of the lesion was confirmed by the recognition of definite nuclear abnormalities on hematoxylin and eosin-stained slides in all cases. p16^{INK4a} staining was the clue that directed the pathologist's attention to the intensely stained areas in the slides, thus allowing the identification of previously unidentified areas of CIN (13). CIN lesions were missed in the initial evaluation due to the small representation, which in some cases were further obscured by severe inflammation. Eosinophilic variant of CIN 2, a recently recognized type of cervical neoplasia with morphologic characteristics of both cervical squamous dysplasia and metaplasia (6), was the third cause of missed lesion in the initial evaluation.

There is some controversy about using histopathology as the gold standard for cervical lesions because of disagreement between pathologists' over diagnoses (3–5), but recent studies have shown that diagnostic agreement is higher for high-grade lesions, suggesting that disagreement has little effect on treatment decisions (4,5). Our results indicate that histopathology has a notable risk of missing high-grade lesions. As the primary goal in the assessment of biopsy specimens is an accurate identification of lesions that are at high risk for progression to invasive carcinoma, p16^{INK4a} immunostaining should be considered as a highly desirable addition to the histologic evaluation or cervical biopsy specimens.

HR-HPV testing by Digene Hybrid Capture (HC2) is widely used in the management of cervical pathology because of the high sensitivity of the test

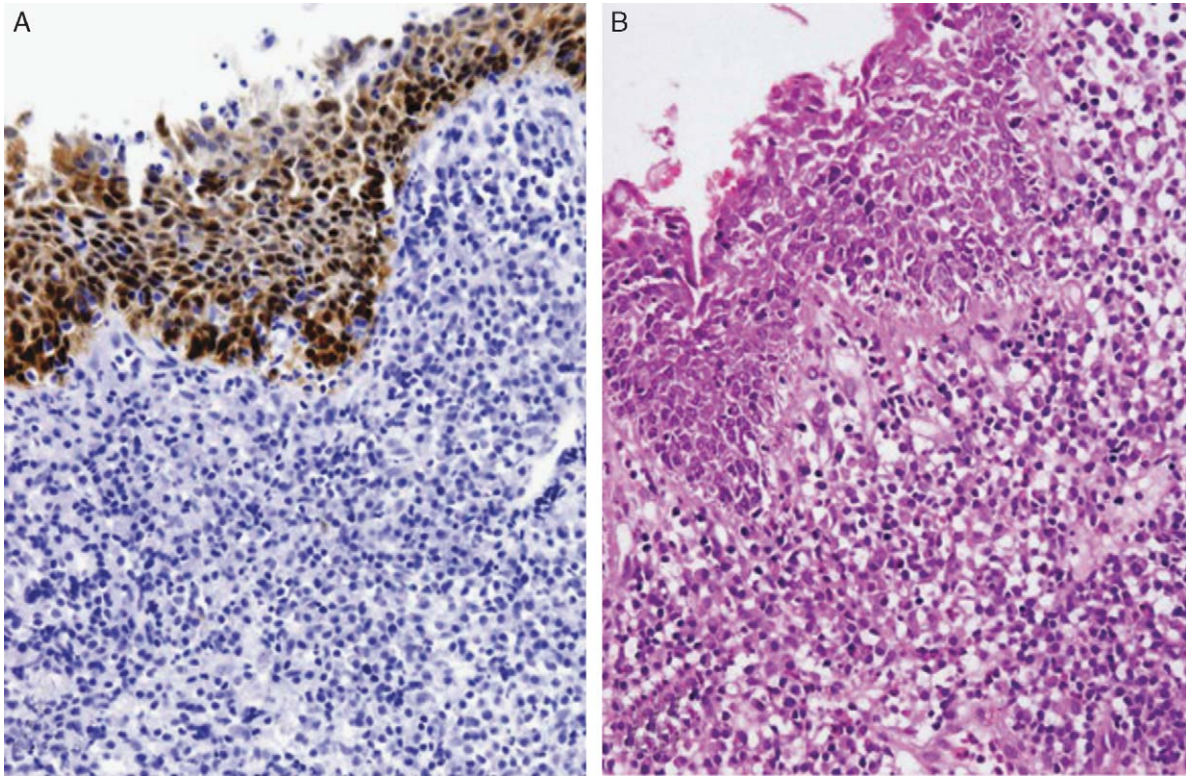


FIG. 2. A, Diffuse strong p16^{INK4a} immunostaining in a cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3 lesion initially not recognized due to scant representation. Severe inflammation contributed to the missed diagnosis. B, Hematoxylin and eosin staining of the CIN 3 area.

(8–10). However, HC2 has shown a relative low specificity and positive predictive values (9,10), with figures close to 80% to 90% in studies of primary screening (20,21), and around 50% in reports which included only women attending a colposcopy clinic or cases of atypical squamous cells of unknown sig-

nificance (9). In fact, it is known that a significant number of HPV infections regress spontaneously (22) and that HR-HPV DNA may persist some time after the disappearance of the morphologic changes. Thus, it is generally considered that HC2 is of limited diagnostic value for particular cases (9,10). Our

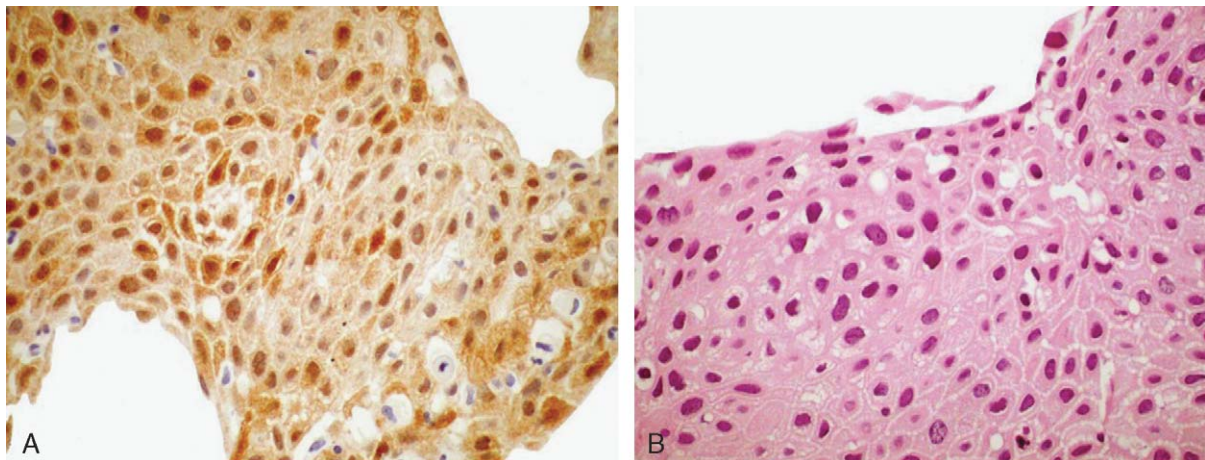


FIG. 3. A, Diffuse strong p16^{INK4a} immunostaining in a cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 of eosinophilic type, initially not recognized. B, Hematoxylin and eosin staining of the CIN 2 area.

TABLE 5. Results of p16^{INK4a} immunostaining in the cases negative for HR-HPV with positive initial biopsy

P16 ^{INK4a}	n	Biopsy final evaluation			P
		No lesion (n = 4)	CIN 1 (n = 22)	CIN 2/3 (n = 11)	
Negative	20	4 (20%)	16 (80%)	0 (0%)	<0.001
Focal	5	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	Not significant
Diffuse	12	0 (0%)	1 (8%)	11 (92%)	<0.001

CIN indicates cervical intraepithelial neoplasia; HR-HPV, high-risk human papillomavirus.

results indicate that special attention should be paid to patients showing positive HC2. It is worth noting that the risk of harboring an undetected CIN of any type or a CIN 2/3 was significantly higher when HR-HPV load was higher than 100 RLU (23).

In recent years, immunohistochemical expression of p16^{INK4a} has been proposed as a biomarker that would allow unambiguous identification of truly dysplastic and neoplastic cells in the uterine cervix (12,13). The relationship between overexpression of p16^{INK4a} and HPV-related premalignant and malignant lesions has also been shown in other settings such as the vulva (24,25), penis (26), anus (27), tonsil (28), and rinosinusal cavities (29). In the uterine cervix, p16^{INK4a} has successfully been shown to be a sensitive and specific marker for both squamous and glandular lesions of the cervical mucosa (14,15), with a better predictive value than HPV DNA testing for high-grade lesions (3,12,16–18). It has also been shown that p16^{INK4a} staining can help reduce interobserver variation in the histopathologic interpretation of cervical specimens (3,13). In our study, 99% of cases of CIN 2/3, but none of the negative biopsies, showed strong and diffuse reactivity for p16^{INK4a}. Our results are thus in keeping with previously published studies and stress the usefulness of p16^{INK4a} as a sensitive and specific biomarker for cervical premalignant lesions. Focal staining was less specific, with 5% of the negative biopsies, 35% of CIN 1, and 1% of CIN 2/3 showing this type of reactivity.

In the present series, immunostaining for p16^{INK4a} was scored positive in 66% of CIN 1 lesions, but only in 32% of the cases was the staining diffuse.

Interestingly, 72% of CIN 1 biopsies concurrently negative for HR-HPV were negative for p16^{INK4a} and only 4% showed a diffuse reaction. In contrast, only 22% of CIN 1 lesions positive for HR-HPV were negative for p16^{INK4a} and 42% showed diffuse staining, these differences being statistically significant. This indicates that CIN 1 lesions associated to low-risk HPV tend to be negative for p16^{INK4a} and that the use of p16^{INK4a} immunohistochemistry may identify low-grade cervical lesions with increased risk for progression to high-grade precancer or invasive lesions. It has been shown that, as observed in our series, not all HR-HPV associated low-grade CIN are p16^{INK4a}-positive, and regression is possible in over 60%, but low-grade CIN cases with diffuse p16^{INK4a} staining have a higher tendency to progress to high-grade lesions than p16^{INK4a}-negative cases (30).

Finally, all 11 cases diagnosed as CIN 2/3 but negative for HR-HPV showed a diffuse reaction for p16^{INK4a}, and none of them was reclassified in the second observation. It is noteworthy that although HC2, and most routinely used HPV tests, is highly sensitive, around 5% to 10% of cases of histologically proved CIN 2 to 3 are negative for HR-HPV with the test. The strong overexpression of p16^{INK4a} observed in these cases suggests that they are actually HPV-associated CIN. Other HR-HPV types not detected by the test, or other technical problems, may be the cause of this negative result.

In conclusion, our results indicate that particular attention should be paid to biopsies from patients having positive HC2 due to the risk of missing a hidden CIN 2 to 3 lesions. This risk is particularly high for

TABLE 6. p16^{INK4a} immunostaining in all cases of the study grouped according to the final diagnosis (weighted κ value: 0.7813, substantial agreement, P<0.001)

Biopsy final evaluation	N (326)	p16 ^{INK4a} (%)		
		Negative (n = 182)	Focal (n = 38)	Diffuse (n = 106)
No lesion	161	153 (95%)	8 (5%)	0 (0%)
CIN 1	85	29 (34%)	29 (34%)	27 (32%)
CIN 2/3	80	0 (0%)	1 (1%)	79 (99%)

CIN indicates cervical intraepithelial neoplasia; HR-HPV, high-risk human papillomavirus.

patients with high HR-HPV load. In these cases, immunostaining with p16^{INK4a} should be considered as a highly desirable addition to the routine histologic evaluation of cervical biopsy specimens.

Acknowledgments: The authors are grateful to Ms Roser Esteve and Mercè Bosch for their technical assistance with the HC2 test and Ms Margarita Mainar for her help with the immunohistochemical studies. They also thank Ms Marta Sánchez for the preparation and Mr Adam Brooks for the English revision of the manuscript.

REFERENCES

- Buckley CH, Butler EB, Fox H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1982;35:1-13.
- Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:295-304.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389-99.
- Malpica A, Maticic JP, Niekirk DV, et al. Kappa statistics to measure interrater and intrarater agreement for 1790 cervical biopsy specimens among twelve pathologists: qualitative histopathologic analysis and methodologic issues. *Gynecol Oncol* 2005;99:S38-52.
- Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, et al. Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. *Obstet Gynecol* 2002;100:277-80.
- Ma L, Fisk JM, Zhang RR, et al. Eosinophilic dysplasia of the cervix: a newly recognized variant of cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1474-84.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
- Zur HH. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
- Ordi J, Puig-Tintore LM, Torne A, et al. Contribution of high risk human papillomavirus testing to the management of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Med Clin (Barcelona)* 2003;121:441-5.
- Ordi J, Alonso I, Torne A, et al. Human papillomavirus load in Hybrid Capture II assay: does increasing the cutoff improve the test? *Gynecol Oncol* 2005;99:313-9.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-7.
- Agoff SN, Lin P, Morihara J, et al. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003;16:665-73.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.
- Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:668-73.
- Tringler B, Gup CJ, Singh M, et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004;35:689-96.
- Guimaraes MC, Goncalves MA, Soares CP, et al. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem* 2005;53:509-16.
- Guo M, Hu L, Baliga M, et al. The predictive value of p16(INK4a) and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2004;122:894-901.
- Hu L, Guo M, He Z, et al. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* 2005;18:267-73.
- Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, et al. p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007;31:33-43.
- Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003;362:1871-6.
- Dalstein V, Riethmuller D, Sautiere JL, et al. Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population; benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* 2004;40:1225-32.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8.
- Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I, et al. Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol* 1998;10:49-56.
- Santos M, Montagut C, Mellado B, et al. Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *Int J Gynecol Pathol* 2004;23:206-14.
- Santos M, Landolfi S, Olivella A, et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1347-56.
- Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 2001;159:1211-8.
- Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL. Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *Mod Pathol* 2003;16:692-9.
- Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162:747-53.
- El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of high-risk human papillomavirus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1367-72.
- Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004;445:616-20.

Estudi 3

Value of p16^{INK4a} as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1

Marta DEL PINO^a, MD; Sònia GARCIA^a, MD; Victòria FUSTÉ^b, MD;
Immaculada ALONSO^a, MD; Pere FUSTÉ^a, MD; Aureli TORNÉ^a, MD; Jaume
ORDI^{b*}, MD

American Journal of Obstetrics and Gynecology

(in press)

Factor d'impacte: 2,917

Rànking: 7/57 (1er quartil)

Your Submission, W08-0933R2

|The **American Journal of Obstetrics & Gynecology** to me
May 26 Reply

Dear Mrs Marta del Pino:

We are pleased to inform you that **your manuscript** number W08-0933R2 entitled, "**Value of p16INK4a as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1,**" is accepted for publication in the **American Journal of Obstetrics & Gynecology**.

Once the manuscript is typeset you will receive page proofs via email from the publisher prior to publication. Please review the proofs carefully, respond to any queries promptly, and return the proofs to the publisher within 48 hours. Any delay in returning the page proofs may result in a significant delay in publication.

It is assumed that no part of this work; text, tables, and illustrations have been previously published and that it will not be submitted elsewhere for publication without the consent of Elsevier. The Managing Editors should be notified if there are any press releases anticipated on accepted papers.

Thank you for submitting your work to us.

Sincerely,

Thomas J. Garite, MD Moon H. Kim, MD
Editor-in-Chief Editor-in-Chief

=====

EDITORIAL OFFICE CONTACTS

WEST OFFICE

Sandra Perrine, Managing Editor
Email: Perrine@Ajog.Phxcoxmail.com
Phone: (480) 812-9261

EAST OFFICE

Donna Stroud, Managing Editor
Email: ajog@rroho.com
Phone: (614) 527-3820

Value of p16^{INK4a} as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1

**Marta DEL PINO^a, MD; Sònia GARCIA^a, MD; Victòria FUSTÉ^b, MD;
Immaculada ALONSO^a, MD; Pere FUSTÉ^a, MD; Aureli TORNÉ^a, MD; Jaume
ORDI^{b*}, MD**

^a Department of Obstetrics and Gynecology, IDIBAPS-Hospital Clínic, University of Barcelona, Faculty of Medicine, Barcelona, Spain

^b Department of Pathology, IDIBAPS-Hospital Clínic, University of Barcelona Faculty of Medicine, Barcelona, Spain

* Corresponding author. Department of Anatomical Pathology, Hospital Clínic, University of Barcelona School of Medicine, C/Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain. Fax: +34 93 2275717.

E-mail address: jordi@clinic.ub.es (J. Ordi).

Running title: p16^{INK4a} as progression risk marker in CIN1

Word counts: Abstract: 150 words

Text: 2665 words

Condensation:

The value of p16 as a marker for progression/regression has been studied in a group of women with a histologic diagnosis of CIN-1. None of the p16-negative lesions showed progression to a high-grade precursor lesion .

Value of p16^{INK4a} as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1

Marta DEL PINO, MD; Sònia GARCIA, MD; Victòria FUSTÉ, MD; Immaculada ALONSO, MD; Pere FUSTÉ, MD; Aureli TORNÉ, MD; Jaume ORDÍ, MD

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the usefulness of p16^{INK4a} staining to classify CIN1 according to its progression/regression risk.

STUDY DESIGN: Patients with a histological diagnosis of CIN1 were prospectively recruited (n=138). Simultaneous detection of HR-HPV, and p16^{INK4a} evaluation were performed. Follow-up was conducted every 6 months by cytology and colposcopy, and annually by HR-HPV testing, for at least 12 months (mean 29.0). Progression was defined as a histological diagnosis of CIN2-3, regression as a negative cytology and HR-HPV, and persistence as a cytological result of LSIL and /or a positive test for HR-HPV.

RESULTS: Progression was observed in 14 women (10.1%); 66 (47.6%) regressed, and 58 (42.0%) had a persistent disease. p16^{INK4a} was positive in 77 (55.8%) initial biopsies. Progression to CIN2-3 was identified in 14/77 (18.2%) women with positive and 0/61 (0.00%) with negative p16^{INK4a} immunostaining (p<0.001).

CONCLUSIONS: p16^{INK4a} negative CIN1 lesions rarely progress and may benefit from a less intensive follow-up.

Keywords: p16^{INK4a} · immunohistochemistry · human papillomavirus · cervical intraepithelial neoplasia · CIN1 · follow-up · progression · regression

INTRODUCTION

Although almost all carcinomas of the uterine cervix are derived from intraepithelial neoplasias,¹ only a minority of these lesions progress to cervical cancer². High-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), which include cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3 (CIN2-3), are considered the immediate precursors to cervical cancer due to the relatively high risk of them developing into cervical carcinoma.¹ Accordingly, excisional treatment is the standard way to manage these lesions. In contrast, low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and their histological counterpart CIN1, frequently regress spontaneously in 1-2 years and rarely progress to CIN2/3 and cervical cancer. Thus, an observational strategy is the current approach to managing these lesions.³ Nevertheless, 10-15% of LSIL/CIN1 lesions progress to CIN2/3.³⁻⁷

The known clinical and histological characteristics have a low predictive value regarding the outcome of the CIN1 lesions, and are not useful in distinguishing those which will persist or progress from those that will probably regress. High-risk human papillomaviruses (HR-HPV), which are known to be the cause of almost all cervical carcinomas, are detected in approximately 85% of LSIL/CIN1 lesions, thus adding little prognostic information to the histological and cytological diagnosis.⁸ Therefore, the diagnosis of LSIL/CIN1 results in a high number of patients subjected to a strict follow-up, most of which will completely regress. Being able to identify those LSIL/CIN1 lesions more likely to progress or regress would represent a major contribution to the clinical management of the patients with cervical pathology.²

p16^{INK4a} has recently been proposed as a biomarker for cervical lesions, clearly improving the histological evaluation of cervical intraepithelial neoplasia and carcinomas.⁹ p16^{INK4a} over-expression, which indicates an early interference of the viral oncoproteins with cellular proteins involved in cell-cycle regulation,¹⁰⁻¹² is detected in almost all high-grade lesions, whereas reactive conditions such as metaplasia are reported to be negative or show only sporadic staining.¹³⁻¹⁵ In contrast with the consistent positive staining of CIN2-3 lesions, CIN1 show a marked variability in their staining, with some lesions being positive and others showing a negative reaction. Nevertheless, it is not known whether this immunohistochemical variability in p16^{INK4a} staining could also provide information on the evolution of LSIL/CIN1 lesions.

The aim of this study was to evaluate the potential usefulness of p16^{INK4a} as a prognostic marker of progression and regression in a series of prospectively recruited patients with biopsy proven CIN1, followed-up at least 12 months later by colposcopy, cytology and HR-HPV analysis.

PATIENTS AND METHODS

Study design and case selection

For our study, our cases were selected from patients attending the colposcopy in clinic of the Hospital Clinic from January 2003 to October 2007 due to abnormal cytology (atypical squamous cells [ASC] of any type or SIL of any grade). We prospectively recruited women with a diagnosis of CIN1 based on a histological study (colposcopically directed biopsy [CDB] or endocervical curettage [ECC]) that

fulfilled the following criteria of inclusion: 1) A cervical cytology (Pap test) as well as a HR-HPV test taken concurrently with the biopsy procedure; 2) representative CIN1 lesion available for immunohistochemical study in the paraffin block of the biopsy material; and 3) follow-up data including at least colposcopy and cytology every 6 months and HR-HPV detection every 12 months, for a minimum of 12 months. The study was approved by the Institutional Ethical Review Board.

Histological Evaluation

The histological slides, routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E), from all the cases were reviewed by one of the authors (J.O.) to confirm the presence or absence of CIN. The histological diagnoses were established using pure morphologic criteria based on H&E stained sections, without knowledge of HPV status or the cytology result. In all histological specimens, two new serial sections were performed. In one of them, a new H&E staining was done to confirm the presence of CIN lesion. In the second section, an immunohistochemical staining for p16^{INK4a} was performed.

Immunohistochemical Detection of p16^{INK4a}

Immunohistochemical studies were performed with the automated immunohistochemical system Tech-Mate 500 (Dako Co, Carpinteria, California), using the EnVision system (Dako). p16^{INK4a} was detected using the CINTec® histology kit (clone E6H4, mtm Laboratories, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's protocol. In each series a negative control, consisting of a normal cervix, and a positive control, consisting of a CIN3, were included. Staining was

scored as negative, focal, or diffuse on the basis of nuclear and/or cytoplasmic staining. Cases with complete absence of p16^{INK4a} staining were defined as negative. The immunostaining was scored as focal when either discontinuous staining of isolated basal cells, or any type of staining in superficial and/or suprabasal layers, were detected. Diffuse staining was defined as continuous staining of the basal and suprabasal cells in an area, independently of whether superficial cells of the squamous epithelium were stained or not.¹⁶ Although all types of positivity were recorded, only diffuse staining was considered a positive reaction.

HPV Testing

Cervical specimens for HPV testing were collected using the Digene cervical sampler kit (Digene, Gaithersburg, Maryland). The samples were stored at -20°C until further processing. HPV detection was performed using the commercially available HC2 system (Digene). All the samples were analyzed only for the presence of HR-HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68). The chemoluminescent reaction is read by a luminometer, which provides relative quantification of each individual sample, compared with the mean of a series of positive controls containing 1.0 pg/mL. This cut-off of 1 relative light unit (RLU) (1.0 pg/mL) was used to classify a specimen as positive or negative.¹⁷ The RLU value of each individual sample was recorded.

Treatment Protocol and Follow-up Routine

In all patients the follow-up visits were scheduled every 6 months. Cytology and colposcopy, with CDB or ECC if indicated, were performed in each visit. HR-HPV test was done every 12 months. A second CDB was performed during follow-up in the case of an HSIL result in the Pap control test or in the case of a significant worsening in colposcopy pattern or increase of lesion size. All patients were followed-up for a minimum period of 12 months. Thus, in each patient's case at least two colposcopy examinations, two Pap tests and one test for HR-HPV were done in the follow-up. Patients were excluded from the follow-up protocol after a diagnosis of CIN2/3, or after two consecutive follow-up examinations with a negative result in both the cytology and HR-HPV test.

Patients were grouped according to their outcome during the follow-up. Regression was defined as one or more negative results in the Pap test, with a negative HR-HPV test detection and, if available, a negative result in the histological diagnosis during follow-up. Persistent LSIL/CIN1 was diagnosed on the basis of either one or more cytologies of LSIL and/or a CIN1 diagnosis in a CDB or ECC, or persistence of a positive HR-HPV test detection. We independently analyzed three different situations: 1) Patients having persistent LSIL/CIN1 in the cytology or biopsy with positive detection of HR-HPV; 2) Patients having persistent LSIL/CIN1 in the Pap test or biopsy with negative HR-HPV detection; 3) Patients with normal cytological result but HR-HPV persistence.

Progression was defined as the appearance of a histologically confirmed high-grade lesion (CIN2/3) during the follow-up, independent from the cytological and virological result. Patients who developed a CIN2/3 were treated using loop electrosurgical excision procedure (LEEP).

Data Analysis

The data was analyzed with the program SPSS (Version 16.0). Chi-square tests or Fisher exact tests were used as and when appropriate for comparisons between categorical variables. The efficacy of clinical, virological or immunohistochemical parameters for the diagnosis of progression to CIN2-3 were evaluated as sensitivity, specificity and positive and negative predictive values.

RESULTS

During the study period, 155 patients had a biopsy specimen with a histological diagnosis of CIN1 and they were all initially included in the study. Fourteen patients were lost to the follow-up, and consequently were excluded. Three cases were excluded because the CIN1 lesion had disappeared in the new sections for immunohistochemical staining. Therefore, 138 patients with a CIN1 biopsy were finally included in the study. HR-HPV was positive at recruitment in 129 women (93.5%). Concurrent cytology results at entry were HSIL in 2 women (1.4%), LSIL in 105 (76.1%), atypical squamous cells of unknown significance (ASC-US) in 15 (10.9%) and negative in 16 (11.6%). Mean follow-up period was 29.0 ± 16.2 months (range 12 to 60).

From these 138 patients, 14 (10.1%) progressed to a CIN2-3. The average time of progression was 23.6 ± 9.3 months. Sixty-six women (47.6%) spontaneously regressed and 58 (42.0%) persisted with LSIL and/or HR-HPV positive test. From the women in which either the cytological lesion or the HR-HPV infection persisted, twenty-eight (20.3%) showed persistence of both cytological

LSIL and HR-HPV positive test, 25 (18.1%) had a persistent HR-HPV positive test with negative cytological result, and 5 (3.6%) showed negative test for HR-HPV and persistence of LSIL in the cytology. Table 1 summarizes the age, number of positive results for HR-HPV and viral loads, and the Pap test result of the patients at the entry in the study, according to the different outcomes. No significant differences were observed between the different groups either for age ($p=0.608$), or for HR-HPV load ($p=0.318$). None of the women initially negative for HR-HPV progressed to CIN2-3.

The results of p16^{INK4a} staining in the initial biopsy and the final outcome after follow-up are presented in table 2. Overall, a diffuse staining for p16^{INK4a} was detected in 77 (55.8%) of the cases; 33 (42.8%) of these cases regressed, 30 (40.0%) persisted and 14 (18.2%) progressed to CIN2-3. Thus, all patients showing progression to CIN2-3 showed a diffuse staining in the initial biopsy. Out of the 61 cases (44.2%) with either negative or focal result, 33 (54.1%) regressed, and 28 (45.9%) persisted, none of them progressing to CIN2-3. Positive staining for p16^{INK4a} was observed in 1/9 (11.1%) women negative for HR-HPV and in 76/129 (58.9%) women positive for HR-HPV ($p=0.01$). A diffuse staining for p16^{INK4a} was observed in all 14 cases that progressed to CIN2-3. Figure 1 shows the histological features as well as p16^{INK4a} staining both in the initial and in the final biopsy of one of the women who progressed to CIN2-3. A second biopsy was performed in 15 women showing persistence of cytological LSIL and/or HR-HPV positive test. Histological CIN1 was diagnosed in 9 of them, 7 of which showed a diffuse staining for p16^{INK4a}. A second biopsy during follow-up was obtained in 4

women who regressed; in all these biopsies p16^{INK4a} was negative. Figure 2 illustrates the histological features as well as p16^{INK4a} staining both in the initial and in the final biopsy of one of the women who regressed to a normal cervical epithelium.

Table 3 shows the risk of progression to CIN2/3 according to age, initial HR-HPV load determined by HC2 (in RLU), cytology result and p16^{INK4a} immunostaining. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for progression of positive staining for p16^{INK4a} were 100 (74.7; 100); 49.2 (26.7; 71.7); 18.2 (0; 77.8); and 100 (84.3; 100) respectively.

DISCUSSION

The most remarkable result of our study was that all CIN1 biopsies from patients who progressed to CIN2-3 during follow-up were positive for p16^{INK4a}, and accordingly, none of the CIN1 biopsies negative for p16^{INK4a} progressed. Thus, the sensitivity and negative predictive value for progression to CIN2-3 of p16^{INK4a} staining in the initial biopsy were 100%. Our results confirm previous data, suggesting that CIN1 lesions positive for p16^{INK4a} have a significantly higher tendency to progress to CIN2-3 and that a negative result for p16^{INK4a} may exclude progression during follow-up.^{18;19}

The detection of HR-HPV in CIN1 patients is of very limited use, because a negative result excludes progression in only 6-15% of cases.¹⁷ In our study, over-expression of p16^{INK4a} was observed in only 11.1% of women with HR-HPV

negative CIN1, indicating that it is probably a sporadic event in these cases.⁹ Conversely, 58.9% of HR-HPV positive CIN1 were positive for p16^{INK4a}. Nevertheless, the negative result in over 40% of cases indicates that p16^{INK4a} can provide useful information in HR-HPV positive CIN1. Interestingly, a correlation between high viral load and significantly higher progression rates was observed in our series.

p16^{INK4a} over-expression indicates interference of the viral oncoproteins with cellular proteins involved in the cell-cycle regulation¹⁰⁻¹² and it is involved in the carcinogenic process induced by HR-HPV. In keeping with this, immunohistochemical over-expression of p16^{INK4a} has been shown to unambiguously identify truly pre-malignant and malignant cells in the uterine cervix from both squamous and glandular origin.^{13;20-22} The close relationship between over-expression of p16^{INK4a} and HR-HPV-related pre-malignant and malignant lesions has also been shown in other settings such as the vulva^{23;24}, penis²⁵, anus,²⁶ tonsil²⁷ and rinosinusal cavities.²⁸ In the uterine cervix, p16^{INK4a} has been shown to be a sensitive and specific marker with a better predictive value than HPV DNA testing for CIN2-3^{20;29-32}, and it has been reported to reduce interobserver variation in the histopathologic interpretation of cervical specimens.^{13;32} In contrast with this consistent positive staining for p16^{INK4a} of CIN2-3 and invasive carcinomas, CIN1 lesions tend to show a much more variable staining, with percentages of diffuse positive staining ranging from 20 to 50%. This variable staining has raised the question whether immunohistochemical p16^{INK4a} overexpression could be of value in clinical practice, identifying those CIN1 lesions at risk of progression.

Only two studies aiming to evaluate the potential of p16^{INK4a} as a prognostic marker of progression in CIN1 have been published.^{18;19} Both studies have shown that, as observed in our analysis, p16^{INK4a} over-expression is associated with higher rates of progression to CIN2-3. Our study has several strengths: 1) it is the first prospective study evaluating p16^{INK4a} as a prognostic marker to identify CIN1 at higher risk of progression to CIN2-3; 2) a well-defined follow-up routine was established in all cases; and 3) HR-HPV data was available from all the patients enrolled in the study both at the entry and during follow-up.

It should be pointed out that, although CIN1 lesions positive for p16^{INK4a} showed a significantly higher tendency to progress to CIN2-3, only 18.2% of p16^{INK4a} positive CIN1 cases from our study progressed to CIN2-3, and 42.9% of them completely regressed. This indicates that, although pRb inactivation by E7 is an early and necessary event in the oncogenesis of cervical carcinoma, further molecular events, such as the induction of chromosomal instability and the accumulation of mutations, may be required for the progression of a cervical lesion. Moreover, the status of the individual's host immune system may have a significant influence on the clearance of the infection and reversion of the early oncogenic steps. A few recent studies suggest that the addition of other immunohistochemical markers, such as L1, to p16^{INK4a} may help in the identification of those lesions at higher risk to progress to CIN2-3.^{33;34}

There are some possible limitations in this study. No HPV typing data was available and therefore, the potential correlation between p16^{INK4a} staining, specific type of HR-HPV and progression rate of the CIN1 lesions could not be assessed. Another possible limitation is the possibility that the biopsy procedure might have

altered the evolution of the lesion. Nevertheless, studies using both cytology and histology to follow the natural history have shown no effect of punch biopsy on the short term of the disease³⁵ and similar probabilities of regression, persistence and progression have been reported in studies based in histology and cytology. In this regard, the rates of regression, persistence and progression observed in our series are similar to those reported in most studies. Further studies including p16^{INK4a} detection in cytology should be conducted in order to assess the relevance of this technique in the evaluation of women with LSIL.

In summary, our results indicate that CIN1 lesions positive for p16^{INK4a} have a significantly higher tendency to progress to CIN2-3, whereas patients with CIN1 lesions negative for p16^{INK4a} rarely progress. Thus, p16^{INK4a} may have an important role in the assessment of CIN1 lesions, because it may exclude around half of CIN1 cases from an intensive clinical follow-up.

Acknowledgements

The authors are grateful to Ms. Roser Esteve, Teresa Cuberes and Fuencisla Maderuelo for their technical assistance with the HC2 test and the cytological evaluation, and Ms. Margarita Mainar and Elena Gonzalvo for their help with the immunohistochemical studies. We thank Ms. Marta Sánchez for the preparation and Ms. Kate Johnson for the English revision of the manuscript.

REFERENCES

1. el HA, Kocjan G, Du MQ. Clonality analysis of archival cervical smears. Correlation of monoclonality with grade and clinical behavior of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Cytol.* 2003;47:117-23.
2. Schneider V. CIN prognostication: will molecular techniques do the trick? *Acta Cytol.* 2003;47:115-16.
3. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twigg LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2003;189:295-304.
4. ACOG Practice Bulletin number 66, September 2005. Management of abnormal cervical cytology and histology. *Obstet.Gynecol.* 2005;106:645-64.
5. Cox JT, Schiffman M, Solomon D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2003;188:1406-12.
6. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 1993;12:186-92.
7. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J.Natl.Cancer Inst.* 2001;93:293-99.
8. Schiffman M, Khan MJ, Solomon D, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A et al. A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J.Natl.Cancer Inst.* 2005;97:147-50.
9. Ordi J, Garcia S, Del PM, Landolfi S, Alonso I, Quinto L et al. p16INK4a Immunostaining Identifies Occult CIN Lesions in HPV-positive Women. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 2008.
10. Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J.Virol.* 2001;75:4705-12.
11. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am.J.Pathol.* 1998;153:1741-48.

12. von Knebel DM. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur.J.Cancer* 2002;38:2229-42.
13. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int.J.Cancer* 2001;92:276-84.
14. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am.J.Surg.Pathol.* 2003;27:187-93.
15. Ozalp SS, Yalcin OT, Tanir HM, Dundar E, Yildirim S. Bcl-2 expression in preinvasive and invasive cervical lesions. *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* 2002;23:419-22.
16. Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, Longacre TA. p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am.J.Surg.Pathol.* 2007;31:33-43.
17. Ordi J, Alonso I, Torne A, Esteve R, Sierra E, Campo E et al. Human papillomavirus load in Hybrid Capture II assay: does increasing the cutoff improve the test? *Gynecol.Oncol.* 2005;99:313-19.
18. Hariri J, Oster A. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 2007;26:223-28.
19. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch.* 2004;445:616-20.
20. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod.Pathol.* 2003;16:665-73.
21. Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2004;190:668-73.
22. Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum.Pathol.* 2004;35:689-96.

23. Santos M, Montagut C, Mellado B, Garcia A, Cajal S, Cardesa A et al. Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 2004;23:206-14.
24. Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suarez H et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am.J.Surg.Pathol.* 2006;30:1347-56.
25. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am.J.Pathol.* 2001;159:1211-18.
26. Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL. Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *Mod.Pathol.* 2003;16:692-99.
27. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ et al. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med.Microbiol.Immunol.* 2003;192:129-32.
28. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of high-risk human papillomavirus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am.J.Surg.Pathol.* 2005;29:1367-72.
29. Guimaraes MC, Goncalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J.Histochem.Cytochem.* 2005;53:509-16.
30. Guo M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson MD. The predictive value of p16(INK4a) and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am.J.Clin.Pathol.* 2004;122:894-901.
31. Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod.Pathol.* 2005;18:267-73.
32. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am.J.Surg.Pathol.* 2002;26:1389-99.
33. Hilfrich R, Hariri J. Prognostic relevance of human papillomavirus L1 capsid protein detection within mild and moderate dysplastic lesions of the cervix

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Hematoxylin and eosin staining of an area of CIN1 in a patient, who progressed to a CIN 2. **(B)** Diffuse p16^{INK4a} immunostaining in the CIN1 lesion. **(C)** Hematoxylin and eosin staining in the biopsy showing progression to CIN2. **(D)** Diffuse p16^{INK4a} immunostaining in the CIN2.

Figure 2. (A) Hematoxylin and eosin staining of an area of CIN1 in a patient, who regressed to a negative result of the Pap test, complete negative HR-HPV test, and negative colposcopically directed biopsy. **(B)** Focal positive immunostaining for p16^{INK4a} in the CIN1 lesion. **(C)** Hematoxylin and eosin staining in the biopsy showing regression to normal epithelium. **(D)** Negative p16^{INK4a} immunostaining in the final biopsy

Table, revised

Table 1. General characteristics (age, HR-HPV status and viral load and cytology result) of the patients at entry in the study according their final outcome.

Evolution at follow-up	n	Mean age (range)	HR-HPV		Mean viral load	SD	Cytology result			
			positive	(%)			Negative	ASC-US	LSIL	HSIL
Progression	14	35.7 (22-65)	14	(100)	878.6	± 722.5	1	1	10	2
Persistence										
Cytology LSIL, HPV positive	28	32.9 (21-63)	27	(96.4)	810.2	± 842.9	3	2	23	0
Cytology negative, HPV positive	25	34.9 (21-61)	25	(100)	999.1	± 729.9	3	0	22	0
Cytology LSIL, HPV negative	5	36.4 (22-52)	4	(80.0)	872.1	± 755.9	1	2	2	0
Regression	66	30.6 (19-68)	58	(89.2)	811.2	± 842.2	8	10*	48	0

* ASC-H in one patient

Table 2. Results of p16^{INK4a} staining in the initial biopsy and final outcome after follow-up.

Evolution at follow-up	n	p16 ^{INK4a} immunostaining		
		Diffuse (%)	Focal (%)	Negative (%)
Progression	14	14 (100)	0 (0)	0 (0)
Persistence				
Cytology LSIL, HPV positive	28	12 (42.9)	4 (14.3)	12 (42.9)
Cytology negative, HPV positive	25	16 (64.0)	3 (12.0)	6 (24)
Cytology LSIL, HPV negative	5	2 (40.0)	3 (60.0)	0 (0)
Regression	66	33 (50.0)	15 (22.7)	18 (27.3)
Overall	138	77 (55.8)	25 (18.1)	36 (26.1)

Diffuse staining was defined as continuous staining of the basal and suprabasal cells in an area, independently of whether superficial cells of the squamous epithelium were stained or not. Focal staining was defined as either discontinuous staining of isolated basal cells or any type of staining in superficial and/or suprabasal layers.

Table 3. Risk of progression to CIN2/3 according to age, initial HR-HPV load determined by Hybrid Capture 2 (in relative light units, RLU), cytology result and p16^{INK4a} immunostaining.

Age	n	Progression to CIN2/3		
		N	(%)	p
<30	66	3	(4.5)	0.047
>30	72	11	(15.3)	
HPV load (RLU) at first visit				
<1	9	0	(0)	0.16
1-500	62	4	(6.4)	
>500	67	10	(14.9)	
Cytology result				
Negative/LSIL/ASC*	136	11	(9.3)	0.03
HSIL	2	2	(100)	
p16^{INK4a} immunostaining				
Negative	61	0	(0)	<0.001
Positive	77	14	(18.2/47.4)	

* ASC-H in one patient

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

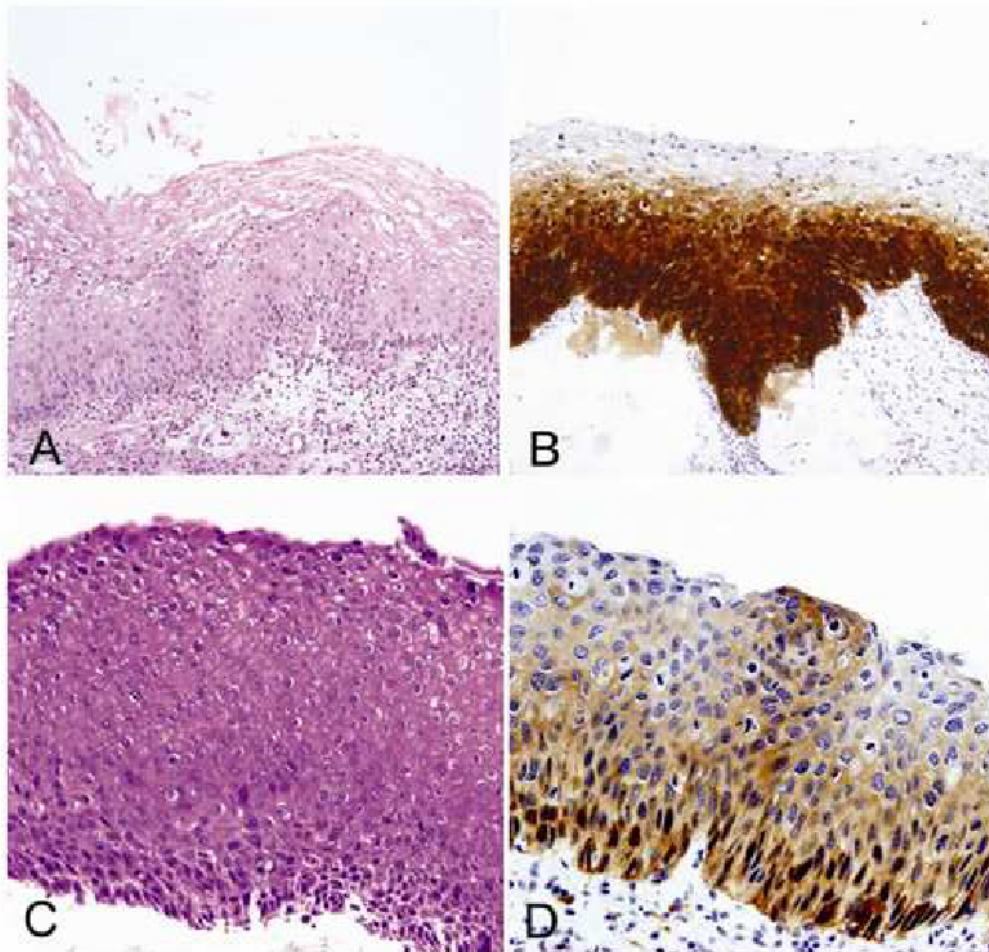


Fig 1. Histological features and p16INK4a staining in the initial and final biopsy of one of the women who progressed to CIN2-3.

Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

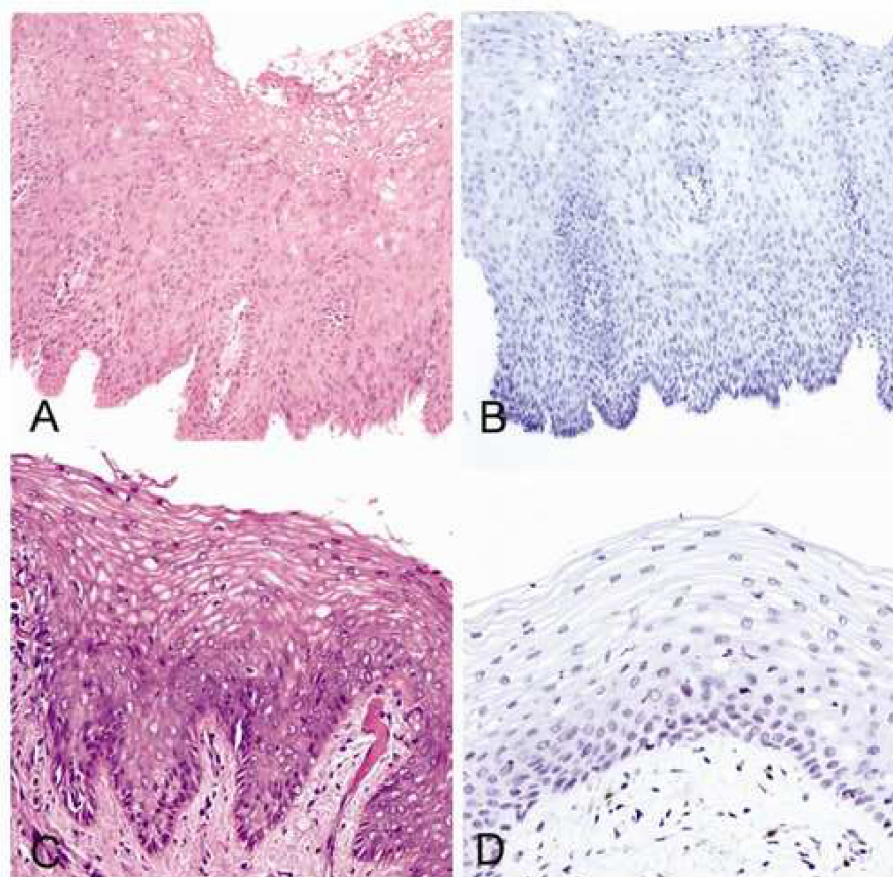


Fig 2. Histological features and p16INK4a staining in the initial and final biopsy of one of the women who regressed to a normal cervical epithelium

V. DISCUSSIÓ

GENERAL

Tot i que ha estat ben estudiat el risc de progressió a CIN2-3 de les dones amb citologia de LSIL (Cox et al, 2003; Walker et al, 2006), hi ha pocs treballs sobre aquest risc en aquelles dones amb infecció per VPH-AR amb mínimes alteracions citològiques, o citologia normal (Cox et al, 2003;Cuzick et al, 2003).

Actualment no hi ha dubte de que la persistència de la infecció per VPH-AR és el principal factor de risc per a desenvolupar una lesió intraepitelial l'alt grau (Bosch et al, 2002; Ho et al, 1995). Les actuals guies clíniques proposen d'addició de la detecció del VPH-AR a la citologia amb l'objectiu d'augmentar la sensibilitat del criatge (Nanda et al, 2000; Lorincz et al, 2003; Brink et al, 2005; Naucle et al, 2007;Naucle et al r, 2009). Ara bé, per assegurar l'eficàcia del test de detecció del VPH-AR en el criatge primari és necessari un correcte maneig de totes aquelles dones que presenten infecció pel virus sense traducció, o amb una mínima alteració en la citologia. Actualment no existeix un seguiment estandaritzat per aquestes pacients (Spitzer et al, 2007; Wright et al, 2007).

En el **primer treball** de la tesi, vam estudiar quin era el risc de les dones amb un test de VPH-AR positiu i amb citologia normal o amb mínims canvis en la citologia (ASC-US). Curiosament, totes les dones VPH-AR positives van presentar un risc de progressió similar en el seguiment, independentment del resultat citològic. Les pacients amb una citologia normal van presentar un risc de progressió idèntic al que tenen les pacients amb ASC-US o LSIL. Així doncs, el test de detecció de VPH-AR permetria estratificar el risc de les dones pel que fa a la capacitat de progressió (Kjaer et al, 2006) mentre que la citologia no aporta informació addicional a l'hora de discriminar les pacients

amb major o menor risc de progressió, exceptuant aquells casos en que la citologia és d'alt grau (HSIL).

La majoria dels treballs publicats a la literatura sobre dones amb citologia normal inclouen en la mateixa anàlisi tant casos positius com negatius per a VPH-AR (Dalstein et al, 2003). No resulta sorprenent així que el risc de progressió d'aquest grup de dones sigui inferior al de les dones amb citologia anormal. La principal aportació del nostre estudi és que s'han inclòs únicament dones amb infecció pel VPH-AR. Raó per la qual trobem un major risc de progressió d'aquestes dones, equiparable les pacients amb citologia de ASC-US o LSIL.

En el nostre treball s'han trobat diferències significatives entre les càrregues virals (CV) determinades mitjançant la tècnica de HC2 en els tres grups de pacients a l'inici de l'estudi. Les CV més altes s'associaven a major grau d'anomalia citològica. En un estudi previ d'aquest grup (Ordi et al, 2005), es va trobar que la CV era superior en mostres de càncer de cèrvix o HSIL en comparació amb mostres de LSIL o citologies normals. Tot i que la CV determinada de forma semiquantitativa per HC2 ha estat sovint criticada perquè el seu valor depèn en part del nombre de cèl·lules recollides i no indica la CV cel·lular [3], diferents estudis han demostrat que existeix una relació positiva entre la CV i la gravetat de les lesions (Schiffman et al, 2000; Nind et al, 1998). Altres estudis realitzats mesurant la CV per PCR han trobat la mateixa relació (Josefsson et al, 2000; Ylitalo et al, 2000). A més a més, s'ha pogut objectivar que la majoria de les dones amb CV elevades tenen anomalies citològiques (Cuzic et al, 1999). A més a més, alguns treballs realitzats amb

altres tècniques de detecció viral quantitatives o semiquantitatives, han conclòs que la càrrega de VPH-AR present en les mostres cervicals pot tenir un valor en el moment de predir el la prevalença o incidència d'una lesió d'alt grau (Clave et al I, 1999; Josefsson et al, 2000; Clavel et al, 2001; van et al, 2000).

En el nostre treball es va valorar la capacitat de la CV de VPH-AR per predir el risc de progressió. No vam trobar associació entre la CV i la progressió a CIN2-3 ni en les pacients amb citologia normal ni en aquelles amb ASC-US o LSIL. En la literatura trobem resultats discrepants sobre aquest aspecte. Si bé alguns treballs reporten que la CV pot ser un factor de risc de progressió a CIN2-3 i càncer de cèrvix (Dalstein et al, 2003; Schlecht et al, 2003), la majoria dels estudis no troben aquesta associació, almenys amb CV determinades per HC2 (Lorincz et al, 2002). Per tant, és probable que només la persistència de la infecció viral i no pas la CV s'associïn amb el risc de progressió de les lesions cervicals (Zielinski et al, 2001; Schlecht et al, 2001; Dalstein et al, 2003; Bory et al, 2002) Els nostres resultats confirmen que la infecció persistent és el principal factor pronòstic del risc de desenvolupar una lesió d'alt grau, dada ja exposada prèviament en la literatura (Bory et al, 2002; Dalstein et al, 2003; Kjaer et al, 2006; Schlecht et al, 2001). En el nostre treball cap de les dones que van negativitzar el virus va desenvolupar una lesió d'alt grau durant el seguiment.

En el nostre treball aquelles dones majors de 35 anys presenten un risc significativament més gran de progressió que les dones joves. Aquests mateixos resultats han estat reportats per altres autors que han trobat una relació similar a la del nostre estudi entre l'edat, la persistència de la infecció

viral i el subseqüent desenvolupament d'una lesió cervical d'alt grau (Franceschi et al, 2005; Jordan et al, 2008). No obstant això, hi ha alguns estudis en la literatura que no troben cap relació entre l'edat i el risc de progressió/regressió en les dones amb infecció pel VPH-AR i citologia normal o amb canvis mínims (Schlech et al, 2003; Nobbenhuis et al, 2001; Dalstein et al, 2003).

Un fet rellevant del nostre estudi és que aquelles dones amb antecedent de lesió cervical però que havien resolt la infecció (espontàniament o després del tractament) i havien presentat controls posteriors negatius en els tres anys anteriors a l'estudi, van mostrar un major risc de desenvolupar una lesió cervical d'alt grau davant la nova infecció en comparació amb les dones sense antecedents de lesió. Aquest risc més alt era independent del resultat de la citologia a l'inici de l'estudi. Tot i que la informació sobre el risc a llarg termini de la recurrència de CIN en dones amb antecedent de lesió cervical premaligna és encara limitada, aquest major risc de desenvolupar lesions intraepitelials d'alt grau o càncer de les dones prèviament tractades per CIN ja ha estat reportat per diferents autors (Melnikow et al, 2009; Kalliala et al, 2005; Soutter et al, 1997). Soutter et al. en una metaanàlisi van reportar un risc de desenvolupar un càncer invasiu 2,8 vegades superior per aquelles dones amb antecedent de tractament per lesió intraepitelial cervical comparat amb la població general (Soutter et al, 2006). Melnikov et al. van trobar que el risc de recidiva estava associat amb el grau de CIN inicial, el tipus de tractament, i l'edat de la pacient (Melnikow et al, 2009). D'acord amb aquestes dades està plenament acceptat que, malgrat realitzar un seguiment estricte, el risc de

càncer invasor en aquestes dones es manté entre 3 i 5 vegades per sobre del de les dones sense antecedent de CIN (Melnikow et al, 2009; Soutter et al, 1997; Soutter et al, 2006; Strander et al, 2007; Kalliala et al, 2005). Ara bé, no està clarament establert quina hauria de ser la duració i la intensitat òptima del seguiment post-tractament d'aquestes pacients.

En aquest primer treball no vàrem trobar diferències significatives en el risc de progressió de les pacients amb infecció per VIH respecte les pacient VIH negatives. Tot i que recentment ha estat publicat un estudi que conclou que el risc de desenvolupar una lesió intraepitelial no està associat a la disminució del nivells de CD4, l'ús de tractament antiretroviral, la duració de la infecció o la càrrega viral del VIH (Lehtovirta et al, 2008), els estudis publicats fins ara consideraven tant els nivells de limfòcits CD4, com la CV del VIH i la infecció pel VPH-AR com els principals factors de risc per al desenvolupament de CIN (Nappi et al, 2005; Robinson & Freeman, 2002). Totes les pacients amb infecció per VIH incloses en el nostre treball seguien estrictes controls per a la seva malaltia de base i van mantenir un correcte estat immunològic durant l'estudi.

Hi ha algunes possibles limitacions del nostre estudi. La primera és que el resultat citològic amb el qual les pacients venien referides a la Unitat de Patologia Cervical del nostre centre diferia sovint del diagnòstic de la primera visita, un cop realitzada una citologia, l'examen colposcòpic i una biòpsia en els casos en que era necessari. La concordança en els diagnòstics de les lesions cervicals (tant citològiques com histològiques) ha estat ben estudiada i està al voltant del 50%. Diferents treballs reporten índex kappa inferiors al 0.5 entre patòlegs, tant si provenien de la mateixa institució com d'institucions

diferents (Sriamporn et al, 2005; Cibas et al, 2001; Parker et al, 2002; Malpica et al, 2005). Els resultats obtinguts en l'estudi són similars als reportats en la literatura. Per altra banda trobem que el nombre de dones remeses per infecció per VPH-AR i citologia normal, va ser inferior a l'esperat. Aquest fet pot ser degut a que els tests de determinació de VPH-AR no han estat establerts encara en tots els centres com a part del cribatge del càncer de cèrvix, raó per la qual la major part de les dones incloses en l'estudi van ser referides per citologia anormal. No obstant això, aquest test està sent gradualment implementat en els diferents centres espanyols i per això, des de l'any 2006 s'ha incrementat de forma gradual el nombre de dones derivades per aquest motiu. També hi ha poques dones amb diagnòstic d'ASC-US a l'inici del estudi, cosa que s'explica perquè aquelles dones amb citologia d'ASC-US i determinació del VPH-AR negativa eren retornades als programes de cribatge en els seus centres de referència ja que aquestes dones no presenten un major risc de lesió d'alt grau que la població general.

Una altra limitació de l'estudi és que no tenim dades sobre la tipificació viral de les diferents mostres. La determinació de VPH-AR mitjançant HC2 no permet identificar els genotips virals específics que es troben en una mostra. Se sap que determinats tipus virals, particularment el 16 i el 18, tenen un comportament més agressiu presentant més capacitat de persistència i una major probabilitat de desenvolupar càncer cervical (Khan et al, 2005; van et al, 2002; Villa et al, 2000; Wheeler et al, 2006).

Un altre punt a tenir en compte és que en el nostre estudi es va realitzar una biòpsia a algunes pacients en el moment en la visita inicial, procediment

que podria haver alterat l'evolució de la lesió. Ara bé, no es van trobar diferències significatives en l'evolució de les pacients a les quals se'ls ve realitzar la biòpsia comparades amb aquelles a les quals només se'ls va fer una citologia. A més a més, diferents estudis sobre la història natural de les lesions inatrepiteliais cervicals han mostrat que no existeix un efecte clar de la realització d'una biòpsia en l'evolució a curt termini de les lesions (Youkeles et al, 1976, Wright et al, 2003).

En conclusió, les troballes d'aquest primer estudi suggereixen que les dones amb infecció per VPH-AR i citologia normal podrien tenir el mateix risc de progressió que aquelles amb citologia d'ASC-US o LSIL i per tant probablement haurien de ser controlades seguint la mateixa estratègia. Aquestes dades són particularment rellevants en el moment actual en el que, per tal de millorar la sensibilitat i la relació cost-benefici del cribat primari del càncer de cèrvix, es planteja afegir la determinació del VPH-AR a una citologia trianual en aquelles dones majors de 35 anys (Goldie et al, 2004; Holmes et al, 2005; Spitzer et al, 2007). La introducció de la detecció de VPH-AR en el cribat implicarà l'aparició d'un nombre significatiu de dones positives per VPH-AR i citologia negativa i és, per tant, crucial establir estratègies clares d'actuació. No obstant això, el nombre de dones amb citologia negativa i infecció per VPH-AR en el nostre estudi és relativament baix, per la qual cosa calen més estudis que confirmin aquestes dades.

Les dades de seguiment d'aquest primer treball, mostraven que aquelles dones amb infecció per VPH-AR tenien un major risc de progressió del que s'havia apuntat fins ara, i que aquelles pacients amb elevada CV tenien una

major probabilitat de presentar lesió intraepitelial en la citologia/histologia simultània a la determinació viral. Per aquest motiu vam decidir revisar un grup d'aquestes dones amb biòpsies inicialment interpretades com a negatives per a lesió premaligna i avaluar el risc de la existència de possibles falsos negatius. L'aparició en els darrers anys de la tècnica de tinció immunohistològica de p16^{INK4a}, una proteïna intracel·lular que es sobreexpressa en lesions intraepitelials produïdes pel VPH-AR, va fer que en aquest **segon treball** ens plantejéssim: 1) la utilitat d'aquest marcador a l'hora de detectar aquestes lesions cervicals en les biòpsies interpretades com a normals, reduint així l'infradiagnòstic de les lesions premalignes i 2) la relació entre el risc de falsos negatius del diagnòstic i la CV.

La conclusió més rellevant del segon treball de la present tesi va ser que el 21,6% dels casos amb una biòpsia inicialment interpretada com a negativa però amb una detecció de VPH-AR positiva van ser reclassificades com a CIN després de la tinció immunohistoquímica de p16^{INK4a}. Va ser particularment rellevant el fet que el 55,9% d'aquests casos (que correspondrien al 13,7% de tot el grup) van ser re-classificats com a CIN2-3 i per tant aquestes pacients eren candidates a tractament considerant el diagnòstic correcte. De fet, en el 82,2% d'aquests casos la CIN2-3 es va detectar al llarg del seguiment. Tot i que la tinció de p16^{INK4a} va ser la clau diagnòstica, la presència de la lesió va ser confirmada en tots els casos, ja que en tots ells les anomalies nuclears característiques de la displàsia estaven presents en les preparacions tenyides amb Hematoxilina-Eosina (H&E). La tinció de p16^{INK4a} va ser la clau que va dirigir l'atenció del patòleg cap a les àrees intensament tenyides de les

preparacions, per molt petites que fossin, permetent la identificació de la lesió intraepitelial que prèviament no havia estat identificada (Klaes et al, 2001). La causa per la qual aquestes lesions havien estat infradiagnosticades en l'avaluació inicial era fonamentalment l'escassa representació de la lesió en la biòpsia, dificultada en alguns casos per una marcada reacció inflamatòria. La presència d'un variant de CIN recentment reconeguda com un subtipus de CIN2 (Ma et al, 2004), denominada variant eosinofílica, la qual presenta característiques de displàsia i metaplàsia cervical, va ser la tercera causa d'infradiagnòstic d'aquestes lesions en l'avaluació inicial.

Existeix controvèrsia en la literatura sobre si la histopatologia hauria de ser el *gold standard* del diagnòstic de les lesions cervicals degut a les importants diferències interobservador en el diagnòstic d'una mateixa mostra (Klaes et al, 2002; Malpica et al, 2005; Parke et al, 2002). Tot i això, estudis recents han demostrat que l'acord en els diagnòstics és major en les lesions d'alt grau, i suggereixen que aquests desacords tenen poca rellevància en les decisions sobre si cal o no tractament (Malpica et al, 2005; Parker et al, 2002). Els nostres resultats indiquen que el diagnòstic histològic té un risc no despreciable de obviar lesions d'alt grau. El principal objectiu en el diagnòstic de les biòpsies és precisament la identificació de les lesions que tenen un elevat risc de progressió a càncer invasor, l'ús de la tinció immunohistoquímica per a p16^{INK4a} en l'avaluació histològica de les biòpsies cervicals podria ser de gran utilitat.

La determinació del VPH-AR mitjançant el test de HC2) ha estat molt utilitzada en el maneig de la patologia cervical per l'elevada sensibilitat i el alt

valor negatiu del test (zur Hausen et al, 2002; Ordi et al, 2003; Ordi et al, 2005). Ara bé, l'HC2 té una especificitat i un valor predictiu positiu relativament baixos (Ordi et al, 2003; Ordi et al, 2005), amb resultats positius al voltant del 80-90% de les dones cribades de la població general (Cuzick et al, 2003; Dalstein et al, 2004) i del 50% si es té en compte únicament pacients a les quals se'ls havia de practicar una colposcòpia o dones amb citologia de ASC-US (Ordi et al, 2003). Se sap que la majoria d'infeccions pel VPH-AR regressaran de forma espontània (Ho et al 1998) i que el DNA del VPH-AR pot persistir un temps després de la desaparició de les lesions morfològiques. Per tant, en determinats casos la determinació viral per HC2 té un valor diagnòstic limitat (Ordi et al, 2003; Ordi et al, 2005). Els nostres resultats indiquen que cal posar especial atenció en aquelles pacients amb tests de HC2 positiu. Val la pena remarcar que el risc de no detectar una CIN de qualsevol grau o una CIN2-3 és més elevat en aquells casos en que la càrrega del VPH-AR és superior a 100 URL (Nindl et al 1998).

En els darrers anys, la sobreexpressió de p16^{INK4a} ha estat proposada com un marcador biològic que permet la identificació de veritables cèl·lules displàsiques o preneoplàsiques del cèrvix uterí (Agoff et al, 2003; Klaes et al, 2001). La relació entre la sobreexpressió de p16^{INK4a} i l'existència de lesions intraepiteliales relacionades amb la infecció per VPH-AR ha estat també mostrada en altres localitzacions com la vulva (Santos et al, 2004; Santos et al, 2006) , el penis (Rubin et al, 2001), l'anús (Lu et al, 2003) l'amígdala (Klussmann et al, 2003) i les lesions rinosinusals (El-Mofty et al, 2005, Alòs et al, 2009). En el coll uterí la tinció de p16^{INK4a} ha demostrat ser un marcador

amb una elevada sensibilitat i especificitat tant per lesions escamoses com glandulars de la mucosa cervical (Schorge et al, 2004; Tringler et al, 2005) amb un valor predictiu per la detecció de lesions d'alt grau més bo que no pas els test de detecció del DNA del VPH-AR (Klaes et al, 2002; Agoff et al, 2003; Guimaraes et al, 2005; Guo et al, 2004; Hu et al, 2005). Diferents treballs han mostrat que la tinció per p16^{INK4a} redueix la variabilitat interobservador en la interpretació histopatològica de les mostres de coll d'úter (Klaes et al, 2002; Klaes et al, 2001).

En el nostre estudi, el 99% dels casos de CIN2-3 i cap de les biòpsies negatives van mostrar una reacció intensa i difusa per a la tinció de p16^{INK4a}, en acord amb els estudis prèviament publicats en la literatura. Aquest fet remarca la utilitat de la p16^{INK4a} com a un marcador sensible i específic de les lesions premalignes de cèrvix. La tinció focal va ser menys específica, el 5% de les biòpsies normals, el 35% de les biòpsies de CIN1 i l'1% de les CIN2-3 van mostrar aquest tipus de reactivitat.

En la sèrie del nostre estudi, la tinció immunohistoquímica de p16^{INK4a} va ser considerada positiva en el 66% dels casos de CIN1, però només el 32% d'aquests casos van demostrar una tinció difusa. És interessant remarcar que el 72% de biòpsies de CIN1 amb detecció viral negativa van ser presentar una tinció per p16^{INK4a} també negativa i només el 4% tenien una tinció difusa pel marcador. En canvi, tan sols el 22% de les lesions CIN1 positives per VPH-AR van ser negatives per p16^{INK4a} i el 42% d'aquestes van presentar una tinció difusa. Les diferències van ser estadísticament significatives. Aquests resultats demostren que les lesions de baix grau associades a VPH de baix risc

oncogènica són en general negatives per a la tinció de p16^{INK4a}, i que, per tant, aquest marcador està ajudant a identificar les lesions de baix grau que tenen major risc de progressió cap a lesions d'alt grau o invasores. S'ha demostrat, i els resultats d'aquest treball així ho corroboren, que no totes les lesions de CIN1 associades a VPH-AR són positives per a la tinció de p16^{INK4a}, i que la regressió d'aquestes és possible en el 60% dels casos, ara bé, les lesions de baix grau que mostren una tinció difusa per a p16^{INK4a} tenen un major risc de progressió que no pas aquelles que són p16^{INK4a} negatives (Negri, 2004).

Per acabar, remarcar que els 11 casos diagnosticats com a CIN2-3 però negatius per VPH-AR van mostrar una intensa reacció per p16^{INK4a}, cap d'ells va ser reclassificat després de la segona avaluació. La determinació viral per HC2 o per altres test utilitzats se sap que té una elevada sensibilitat, però tot i així, al voltant del 5-10% dels casos histològicament confirmats de CIN2-3 presenten determinació de VPH-AR negatives. La intensa sobreexpressió de p16^{INK4a} observada en aquests casos suggereix que són lesions també associades a la infecció per VPH-AR. Altres VPH-AR no inclosos en aquests test de detecció viral o altres problemes tècnics poden ser la causa d'aquests falsos negatius.

En conclusió, els resultats d'aquest segon treball indiquen que cal posar especial atenció en aquelles biòpsies de pacients que tenen una determinació viral positiva ja que existeix el risc de que en l'avaluació histopatològica no s'identifiquin lesions de CIN2-3 presents en la mostra. Aquest risc és especialment elevat en pacients amb altes càrregues virals. L'addició de la tinció immunohistoquímica amb p16^{INK4a} a l'avaluació histològica de rutina de

les biòpsies de cèrvix podria ser de gran utilitat, permetent la identificació d'aquestes lesions i evitant el seu infradiagnòstic, fet especialment important en aquells casos en els quals la identificació de les lesions implicaria un diferent maneig de les pacients.

En el **tercer treball** de la tesi vàrem voler estudiar el possible valor de la tinció per p16^{INK4a} com a marcador pronòstic. Els resultats obtinguts en el segon estudi semblaven apuntaven a que les lesions positives per a p16^{INK4a} eren aquelles amb major risc de progressió, conferint a aquest marcador no només un valor diagnòstic sinó també una valor pronòstic. Actualment el trobar possibles marcadors de risc de progressió és un dels reptes més important donat que l'augment de la sensibilitat de les noves estratègies de cribatge trobem un gran nombre de dones amb anomalies citològiques o infecció viral que cal seguir de forma estricta però la majoria d'elles presenten infeccions transitòries que es resoldran de manera espontània. Això suposa una gran sobrecàrrega assistencial i un risc de sobretractament d'aquestes pacients amb la morbiditat futura que això comporta.

Els resultats més remarcables d'aquest tercer estudi prospectiu van ser que totes les biòpsies de CIN1 de pacients que van progressar a CIN2-3 durant el seguiment van ser positives per a p16^{INK4a} i en canvi cap de les biòpsies negatives per p16^{INK4a} van progressar cap a lesions l'alt grau. Per tant la sensibilitat i el valor predictiu negatiu per a la progressió a CIN2-3 de la tinció de p16^{INK4a} en la biòpsia del moment del diagnòstic va ser del 100%. Els nostres resultats confirmen dades prèviament publicades que suggerien que les lesions de CIN1 amb tinció positiva per p16^{INK4a} tenen un risc significativament

major de progressió cap a CIN2-3 i que una tinció per p16^{INK4a} negativa podria excloure progressió en el seguiment (Hariri et al, 2007; Negri G et al, 2003) .

La determinació de VPH-AR en aquelles pacients amb lesions de CIN1 té una utilitat molt relativa, donat que un resultat negatiu, que exclouria progressió, es dóna només en el 6-15% dels casos (Negri et al, 2004). En aquest estudi la sobreexpressió de p16^{INK4a} va donar-se tan sols en l'11% de les dones amb CIN1 i determinació viral negativa, indicant una probable infecció transitòria, en aquests casos. Inversament el 58.9% de les dones amb CIN1 i determinació per VPH-AR positiva van ser positives per a p16^{INK4a}. Ara bé, el resultat negatiu de la tinció en 40 % dels casos indica que la tinció per p16^{INK4a} afegeix una valuosa informació en aquells casos de CIN1 i determinació viral positiva. És interessant remarcar la correlació que vam trobar entre l'elevada càrrega viral i el risc de progressió d'aquesta sèrie, que no recolzava els resultats del nostre primer treball, en el qual no es va trobar aquesta relació.

La sobreexpressió de p16^{INK4a} indica l'existència d'interacció entre les oncoproteïnes virals i les proteïnes cel·lulars implicades en la regulació del cicle (Sano et al, 1998; Giarre et al, 2001; von Knebel et al, 2002), fet relacionat amb la carcinogènesi i la transformació maligna relacionada amb la infecció pel VPH-AR i que detecta la sobreexpressió de p16^{INK4a} (Klaes 2001 et al; Agoff, 2003 et al; Schorge et al, 2004; Tringler et al, 2004).

En la literatura, fins l'actualitat trobem tan sols dos estudis que avaluen el potencial de la p16^{INK4a} com a marcador pronòstic de progressió de les lesions de CIN1 (Hariri et al, 2007; Negri et al, 2008). Ambdós estudis han mostrat,

com en el nostre cas, que la sobreexpressió de p16^{INK4a} està associada a taxes de progressió majors cap a CIN2-3. El nostre treball té varis punts que li donen un valor afegit respecte els anteriorment publicats: 1) és el primer treball prospectiu que avalua l'expressió de p16^{INK4a} com a marcador pronòstic a l'hora d'identificar aquelles lesions de CIN1 amb major risc de progressió a CIN2-3; 2) de tots els casos tenim un seguiment estricte i sistemàtic 3) es presenten dades de la determinació viral de totes les pacient incloses en l'estudi a l'inici d'aquest i durant el seguiment.

Cal remarcar que, tot i que les lesions de CIN1 positives per a p16^{INK4a} presentaven un major risc de progressió a CIN2-3, només un 18.2% dels casos de CIN1 amb sobreexpressió de p16^{INK4a} van progressar a lesions d'alt grau, i un 42.9% d'aquests casos van regressar de forma espontània. És a dir que, tot i que la inactivació de la pRb causada per l'oncoproteïna viral E7, és un esdeveniment necessari en la transformació maligna, calen altres alteracions com la inducció de la inestabilitat cromosòmica, i l'acumulació de mutacions per a la progressió d'una lesió cervical. A més a més diferents treballs remarquen la importància de l'estat immunològic del sistema hoste en la capacitat de d'aclarir la infecció viral i revertir els passos més precoços de l'oncogènesi.

Uns pocs estudis recents suggereixen que l'addició d'altres marcadors biològics com L1 a la p16^{INK4a} podrien ser d'ajudar en la discriminació de les lesions amb major risc de progressió a lesions d'alt grau (Negri et al, 2008; Hilfrich et al, 2008).

Aquest treball presenta algunes limitacions. No hi ha dades sobre la tipificació viral i per tant la possible correlació entre la tinció per p16^{INK4a},

determinats tipus de VPH-AR i el risc de progressió no han pogut ser avaluades. Una altra possible limitació és la possibilitat de que el fet de realitzar una biòpsia (totes les mostres d'aquest treball són biòpsies) hagi pogut alterar l'evolució de les lesions. Aquest fet ha estat comentat també en el primer treball, i els resultats presentats en aquell així com els reportats en la literatura no mostren cap efecte de la biòpsia en la història natural de la lesió a curt termini. En aquest sentit les taxes de regressió, persistència i progressió de la nostra sèrie en aquest treball són similars a les publicades en la literatura.

Caldrien estudis que avaluessin la tinció per p16^{INK4a} en mostres de citologia per tal de confirmar la rellevància d'aquesta tècnica en el maneig de les dones diagnosticades de LSIL.

En resum, els nostres resultats indiquen que les lesions de CIN1 positives per a p16^{INK4a} tenen un risc significativament major de progressió a CIN2-3, mentre que les pacients amb lesions de CIN1 que mostra negativitat a la tinció de p16^{INK4a} rarament progressen. Així doncs la p16^{INK4a} pot tenir un paper important en l'avaluació de les lesions CIN1, ja que podria evitar un seguiment estricte i innecessari del 50% de les pacients amb diagnòstic de lesió d'alt grau.

VI. CONCLUSIONS

1. El risc de progressió i la probabilitat de regressió de les dones amb infecció per VPH-AR és equiparable, tant si presenten anomalies citològiques lleus (ASC-US, LSIL) com si tenen una citologia negativa. Per tant l'estratègia de seguiment de totes elles hauria de ser la mateixa, independentment del resultat citològic.
2. Les pacients amb càrrega viral (CV) alta, determinada mitjançant el test HC2, tenen un risc més gran de presentar una lesió cervical d'alt grau sincrònica, per la qual cosa és necessari una avaluació acurada de les mostres histològiques d'aquestes pacients. En canvi, la CV no determina el risc de progressió ni aporta cap informació pronòstica.
3. Les dones més grans de 30-35 anys i aquelles amb antecedent de lesió cervical presenten un risc de progressió a CIN2-3 significativament més alt. En canvi, la infecció per VIH ben controlada clínicament no s'associa a una major el risc de progressió.
4. La tinció immunohistoquímica per p16^{INK4a} mostra gran sensibilitat i especificitat per al diagnòstic de les neoplàsies intraepiteliais d'alt grau, i és útil en el diagnòstic diferencial d'aquestes lesions amb les alteracions metaplàsiques o reactives.
5. La tinció immunohistoquímica per p16^{INK4a} és capaç de posar de manifest un nombre significatiu de lesions intraepiteliais en biòpsies inicialment interpretades com a negatives, ja que permet dirigir l'atenció

del patòleg a les zones displàstiques. Aquest fet és especialment útil en casos de representació lesional escassa o reacció inflamatòria.

6. La negativitat de la tinció immunohistoquímica per a p16^{INK4a} en una lesió premaligna de baix grau permet identificar aquelles dones amb un risc molt baix o nul de progressió.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM (2003) Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol Oncol* 90, 137-144.

Agoff NS, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA (2003) p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 16:665–673

Akpolat I, Smith DA, Ramzy I, Chirala M, Mody DR. (2004) The utility of p16^{INK4a} and Ki-67 staining on cell blocks prepared from residual thin-layer cervicovaginal material. *Cancer*. 25;102:142-9

Al-Nourhji O, Beckmann MJ, Markwell SJ, Massad LS (2008). Pathology correlates of a Papanicolaou diagnosis of low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer*. 25;114:469-73.

Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Garcia S, Campo E, Pahisa J, Ordi J. (2007) High-risk cervical epithelial neoplasia grade 1 treated by loop electrosurgical excision: follow-up and value of HPV testing. *Am J Obstet Gynecol.*;197:359.e1-6. Epub 2007 Aug 21.

Alos L, Moyano S, Nadal A, Alobid I, Blanch JL, Ayala E, Lloveras B, Quint W, Cardesa A, Ordi J (2009). Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer*. Apr 13

Alvarez RD, Wright TC. (2007) Effective cervical neoplasia detection with a novel optical detection system: A randomized trial. *Gynecol Oncol*;104:281-9.

Arbyn M, Sasieni P, Meijer C, Clavel C, Koliopoulos C, Dillner J (2006). Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 24, S78-S89

- Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. (2008). Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*;111:167-77.
- Arbyn M, Cuzick J (2009). International agreement to join forces in synthesizing evidence on new methods for cervical cancer prevention. *Cancer Lett.* 2009 8;278(1):1-2. Epub 2008.
- Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. (2007) The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 24;7:4.
- Benchimol Y, Mergui JL, Uzan S (2005) The role of viral HPV testing in post-operative follow-up. *HPV Handbook. Current evidence-based applications.* New York: Taylor & Francis.
- Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. (2006) Immunohistochemical expression of p16^{INK4a} is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol*;19:384-91
- Bergeron Ch (2006) Human papillomavirus testing with liquid-based system: Feasibility and comparison with reference diagnoses. *Acta Cytol* 50, 16-22.
- Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. (2002) Procedure for immunocytochemical detection of p16^{INK4A} antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol*;46:25-29.
- Bleeker MC, Hogewoning CJ, Voorhost FJ, et al (2003). Condom use promotes regression of cervical neoplasia. *Int J Cancer* 107:804-10.
- Bodner K, Bodner-Adler B, Wierrani F, Kimberger O, Denk C, Grunberger W (2002) Is therapeutic conization sufficient to eliminate a high-risk HPV infection of the uterine cervix? A clinicopathological analysis. *Anticancer Res* ;22: 3733-3736.

- Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden J (1999) Prediction of recurrent and residual cervical dysplasia by human papillomavirus detection among patients with abnormal cytology. *Gynecol Oncol*; 72: 199-201.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87, 796-802.
- Bosch FX, Lorincz AT, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002) The causal relation between Human Papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244-265
- Bosch FX, Cuzick J, Schiller JT, et al (2006). Vacunas VPH y cribado en la prevención del Cáncer de cuello uterino. *Vaccine*, vol 24 (31).
- Bosch FX, de Sanjosé S. (2007) The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*;23(4):213-27.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*.19; 26 Suppl 10:K1-16
- Bozanović T, Ljubic A, Momcilov P, Milicevic S, Mostić T, Atanacković J. (2008) Cold-knife conization versus the loop electrosurgical excision procedure for treatment of cervical dysplasia. *Eur J Gynaecol Oncol*;29(1):83-5
- Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Møller H, Hakama M, Parkin DM. (2005a). Incidence Trend in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European Countries: Changing risk and the effects of screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:677-686
- Bray F, Carstensen B, Møller H, Zappa M, Zakelj MP, Lawrence G, Hakama M, Weiderpass E. (2005b). Incidence Trend of adenocarcinoma of the cervix in 13 European Countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2192-2199

Bretelle F, Cravello L, Yang L, Benmoura D, Roger V, Blanc B. (2000) Conization with positive margins: what strategy should be adopted?. *Ann Chir.*;125:444-9

Brink AA, Zielinski GD, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ.(2005). Clinical relevance of human papillomavirus testing in cytopathology. *Cytopathology.* 16: 7-12

Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F, Garcia M, Rawls WE (1989) Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 130, 486–496.

Buckley CH, Butler EB, Fox H (1982). Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol*; 35:1-13.

Bulkmans NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders PJ, Meijer CJ. (2007) Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet.* 24;370:1740-2.

Burchell AN, Eduardo L. Franco EL (2006) Epidemiology of Oncogenic and Nononcogenic HPV Types, and the Evidence for Differences in Their Sexual Transmissibility En Monsonego J (ed): *Emerging Issues on HPV Infections: From Science to Practice.* Basel, Karger, pp 20-33.

Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, Giorgi-Rossi P, Pontenani G, Rosso S, Sani C, Sintoni C, Segnan N, Zorzi M, Cuzick J, Rizzolo R, Ronco G (2008); New Technologies for Cervical Cancer Screening (NTCC) Working Group. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*;9: 937-45. Epub 2008.

- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, et al (2002). Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med*; 346: 1105-12.
- Castellsagué X, Muñoz N (2003) Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31: 20-28.
- Castellsagué X (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*;110(3 Suppl 2):S4-7. Review.
- Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM (2005). Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst*.20;97:1066-71.
- Castle Ph, Jeronimo J, Schiffman M, et al (2006). Age-Related Changes of the Cervix Influence Human Papillomavirus Type Distribution. *Cancer Res* 66:1218-24.
- Castle PS, Sideri M, Jeronimo J, Solomon D, Schiffman M. Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer (2007) *Am J Obstet Gynecol*; 197:356
- Cattani P, Siddu A, D'Onghia S, Marchetti S, Santangelo R, Vellone VG, Zannoni GF, Fadda G (2009). RNA (E6/E7) versus DNA (E6/E7) assays for risk evaluation in women infected with Human Papillomavirus (HPV). *J Clin Microbiol*. 29. [Epub ahead of print]
- Chan JK, Monk BJ, Brewer C, Keefe KA, Osann K, McMeekin S, Rose GS, Youssef M, Wilczynski SP, Meyskens FL, Berman ML (2003) HPV infection and number of lifetime sexual partners are strong predictors for “natural” regression of CIN2 and 3. *Br J Cancer* 15:1062–1066
- Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, Woodman CB. (2009) Disruption of the E2 gene is a common and early event

in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res.* 1;69:3828-32.

Costa S, de Simone P, Venturoli S, Cricca M, Zerbini ML, Musiani M, et al (2003) Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Gynecol Oncol*; 90:358-356.

Cox JT, Schiffman M, Solomon D, ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group (2003) Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol*; 188:1406-1412.

Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGoogan E. (2004). Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*;57:68-72.

Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. (2006) Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*;119:1095-101.

Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, Dillner J, Meijer CJ (2008). Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*;26:6743-4. EpubOct 23.

Dalstein V, Riethmuller D, Pr  tet JL, Le Bail Carval K, Sauti  re JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Moug  n C (2003). Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer*;106:396-403.

Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Danchez R, Ronsin C (2009). Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods* 156: 77-83

- Dames DN, Ragin C, Griffith-Bowe A, Gomez P, Butler R (2009). The prevalence of cervical cytology abnormalities and human papillomavirus in women infected with the human immunodeficiency virus. *Infect Agent Cancer*;4 Suppl 1:S8.
- Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna S (1997) The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol*; 78:1095–1101.
- Davey E, Barrat A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, Saville M (2006). Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet*; 367:122-132.
- Davidson EJ, Kitchener HC & Stern PL (2002) The use of vaccines in the prevention and treatment of cervical cancer. *Clin Oncol* ;14:193–200.
- Davies P, Kornegay J, Iftner T (2001) Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* ;15: 677-700
- Davies RJ, Freeman A, Morris LS, Bingham S, Dilworth S, Scott I, Laskey RA, Miller R, Coleman N (2002). Analysis of minichromosome maintenance proteins as a novel method for detection of colorectal cancer in stool. *Lancet*;359:1917-9.
- De Sanjose S, Palefsky J (2002) Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Research* 89, 201–211.
- Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Gebhardt JA, Groshen S, Morrow CP, Roman LD. (1999) Cold-knife conization versus conization by the loop electrosurgical excision procedure: a randomized, prospective study. *Am J Obstet Gynecol*;180:276-82.

- Durst M, Gissmann L, Ikenberg H & zur Hausen H (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3812–3815
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*; 243:934-7.
- Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, Strickler HD, Coursaget P, Tan T, Halsey N, Jenkins D (2009). Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis*;9:347-56
- el Hamidi A, Kocjan G, Du MQ (2003). Clonality analysis of archival cervical smears. Correlation of monoclonality with grade and clinical behavior of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Cytol*;47:117-23.
- El-Mofty SK, Lu DW (2005) Prevalence of high-risk human papillomavirus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol*;29:1367-1372.
- European Cervical Screening Network (2008). European guidelines for quality assurance in cervical screening 2nd edition.
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G (1995). Human papillomavirus infection is transient in young women: a population based cohort study. *J Infect Dis* 171: 1026-30
- Evander M, Frazer IH, Payne E et al (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*;71:2449–2456.
- Feng W, Duan X, Liu J, Xiao J, Brown RE (2009). Morphoproteomic Evidence of Constitutively Activated and Overexpressed mTOR Pathway in Cervical Squamous Carcinoma and High Grade Squamous Intraepithelial Lesions. *Int J Clin Exp Pathol*;2:249-60. Epub 2008.

- Ferenczy A, Franco E (2002). Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol*;3:11-6.
- Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29, 15-18.
- Franco EL, Rohan TE (2002). Cancer precursors. Epidemiology, detection and prevention. New York (NY): Springer-Verlag, p1-430
- Frazer IH (2009). Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology*. 20;384:410-4. Epub 2008.
- Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N (1999). Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res*;5:2121-32
- Fuste P, Bellosillo B, Santamaria X, Mancebo G, Mariñoso L, Alameda F, Espinet B, Sole F, Serrano S, Carreras R (2009). HPV Determination in the Control After LEEP Due to CIN II-III: Prospective Study and Predictive Model. *Int J Gynecol Pathol*. Jan 30. [Epub ahead of print]
- Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, Vecchione A, Giordano A (2003) Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 56:532–536
- Galloway DA (2003) Papillomavirus vaccines in clinical trials. *Lancet Infect Dis* 3, 469–475
- Gardeil F, Barry-Walsh C, Prendville W, Clinch J, Turner MJ (1997). Persistent intraepithelial neoplasia after excision for cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Obstet Gynecol*; 89:419-422.
- Garcia-Closas R, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA (2005). The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer* ;117: 629-637.

- Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 356:1928-1943.
- Giacalone PL, Laffargue F, Aligier N, Roger P, Combecal J, Daures JP (1999). Randomized study comparing two techniques of conization: cold knife versus loop excision. *Gynecol Oncol*; 75:356-60.
- Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M (2001). Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol* 75:4705–4712
- Gilles C, Manigart Y, Konopnicki D, Barlow P, Rozenberg S (2005). Management and outcome of cervical intraepithelial neoplasia lesions: a study of matched cases according to HIV status. *Gynecol Oncol*; 96:112–118.
- Goldhaber-Fiebert JD, Stout NK, Salomon JA, Kuntz KM, Goldie SJ (2008). Cost-effectiveness of cervical cancer screening with human papillomavirus DNA testing and HPV-16,18 vaccination. *J Natl Cancer Inst*;100:308-20. Epub 2008
- Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Helzlsouer KJ, Schiffman M (2003). A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;12:477-484.
- Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P, Tommasino M, Zehbe I (2006). Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 15:820-822.

- Guimaraes MC, Goncalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG (2005). Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem*; 53:509-16.
- Guo M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson MD (2004). The predictive value of p16(INK4a) and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*; 122:894-901.
- Haidopoulos D, Partsinevelos GA, Vlachos GD, Rodolakis A, Markaki S, Voulgaris Z, Diakomanolis E, Antsaklis A (2009). p16^{INK4a} Is a Strong Biomarker for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Carcinoma: A Reappraisal. *Reprod Sci*; 16. [Epub ahead of print]
- Halloush RA, Akpolat I, Jim Zhai Q, Schwartz MR, Mody DR (2008). Comparison of ProEx C with p16^{INK4a} and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material: a pilot study. *Cancer*. 25;114:474-80
- Hariri J, Oster A (2007). The negative predictive value of p16^{INK4a} to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int.J.Gynecol.Pathol.*;26:223-28.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Mosciki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 367:1247-1255.
- Harris TG, Burk RD, Palefsky JM, Massad LS, Bang JY, Anastos K, Minkoff H, Hall CB, Bacon MC, Levine AM, Watts DH, Silverberg MJ, Xue X, Melnick SL, Strickler HD (2005). Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV serostatus, CD4 cell counts, and human papillomavirus test results. *JAMA*. 23;293:1471-6.

Hesselink AT, van Ham MA, Heideman DA, Groothuismink ZM, Rozendaal L, Berkhof J, van Kemenade FJ, Massuger LA, Melchers WJ, Meijer CJ, Snijders PJ (2008). Comparison of GP5+/6+-PCR and SPF10-line blot assays for detection of high-risk human papillomavirus in samples from women with normal cytology results who develop grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol*;46:3215-21. Epub 2008.

Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338:423–428.

Hogewoning CJA, Bleeker MCG, van den Brule, AJC Voorhorst FJ, Snijders PJF, Berkhof J, Westenend PJ, Meijer CJ. (2003) Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer* ;107: 811-816.

Hoffman MS, Martino MA. (2004) 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*;191:1049

Hopfl R (2000). Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet*; 356:1985-6.

Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC (2005) HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer*; 115: 419-428.

Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, Rassmussen OF, Bjelkenkrantz K, Christiansen P, Eck M, Lorey T, Skovlund VR, Ruediger T, Schneider V, Schmidt D (2008). Immunostaining for p16^{INK4a} used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*;32:502-12.

- Huang LW, Chao SL, Chen TJ (2003) Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecol Oncol* 90:331–337
- Iftner T, Germ L, Swoyer R, Kjaer SK, Breugelmans JG, Munk C, Stubenrauch F, Antonello J, Bryan JT, Taddeo FJ (2009). A comparison study between HPV Real-Time multiplex PCR and Hybrid Capture II Inno-Lipav2 hvp genotyping PCR assays. *J Clin Microbiol*. May 6. [Epub ahead of print]
- Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon HJ, Kimura H, Yamada K, Song SY (2003). Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem.*;270(6):1089-101
- Jakobsson M, Gissler M, Sainio S, Paavonen J, Tapper AM. Preterm Delivery After Surgical Treatment for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstetrics & Gynecology* 2007;119:309-313
- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sørensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllensten UB (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 24;355:2189-93.
- Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001) Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol*; 10: 46-54.
- Kalliala I, Anttila A, Pukkala E, Nieminen P (2005). Risk of cervical and other cancers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: retrospective cohort study. *BMJ* 19;331:1183-5.
- Kane MA, Sherris J, Coursaget P, Aguado T, Cutts F (2006) Chapter 15: HPV vaccine use in the developing world. *Vaccine* 24 (S3): S132-S139.
- Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP (2001). Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are

complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol*;25:884-91

Kelley MJ, Otterson GA, Kaye FJ, Popescu NC, Johnson BE, Dipaolo JA (1995). CDKN2 in HPV-positive and HPV-negative cervical-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*;63:226-30

Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M (2005). 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*.20;97:1072-9.

Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM (2001). Inhibition of cyclin D–CDK4/CDK6 activity is associated with E2F-mediated induction of cyclin-kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*;93:4350–4.

Kirwan JM, Herrington CS (2001). Human papillomavirus and cervical cancer: where are we now? *Br J Obstet Gynaecol*;108:1204–13.

Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ (2002) Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 325:572

Klaes R, Woerner SM, Ridder R Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*. 1999; 59:6132–6136

Klaes R, Friedrich T, Spitkowsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16INK4a

as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*.2001; 92:276–284

Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M (2002) p16^{INK4a} immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*; 26: 1389-1399.

Klinkhamer PJ, Meerding WJ, Rosier PF, Hanselaar AG (2003) Liquid-based cervical cytology. *Cancer*; 99: 263-271.

Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003). Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol*; 162:747-53.

Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, Longacre TA (2007). p16^{INK4a} immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol*;31:33-43.

Kong CS, Narasimhan B, Cao H, Kwok S, Erickson JP, Koong A, Pourmand N, Le QT (2009). The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.1;74:553-61

Kotaniemi-Talonen L, Anttila A, Malila N, Tarkkanen J, Laurila P, Hakama M, Nieminen P (2008). Screening with a primary human papillomavirus test does not increase detection of cervical cancer and intraepithelial neoplasia 3. *Eur J Cancer*;44:565-71. Epub 2008.

Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA Bol MG, Kjellevoid KH, Fianne B, Lovslett K, Bergh J. Low- and high-risk CIN 1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables. *J Pathol*. 2003; 199:462–470

Kyrgiou M, Tsoumpou I, Vrekoussis T, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Mitrou S, Koliopoulos G, Dalkalitsis N, Stamatopoulos P, Paraskevaïdis E (2006). The up-to-date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: the Cochrane colposcopy & cervical cytopathology collaborative group (C5 group) approach. *Cancer Treat Rev*;32:516-23. Epub 2006.

Lars-Christian Horn, Anja Reichert, Anne Oster, Sanne Frost Arndal, Marcus J. Trunk, Ruediger Ridder, Ole Feldballe Rasmussen, Kaj Bjelkenkrantz, Pernille Christiansen, Matthias Eck, Thomas Lorey, Vibeke Ravn Skovlund, Thomas Ruediger, Volker Schneider and Dietmar Schmidt (2008). Immunostaining for p16INK4a Used as a Conjunctive Tool Improves Interobserver Agreement of the Histologic Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol*;32:502–512.

Lehtovirta P, Paavonen J, Heikinheimo O (2008). Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *Int J STD AIDS*;19:37-41.

Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. (1994). Transcriptional repression of the D-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res*;54:6078–82.

Lörincz AT, Richart RM (2003) Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med.*;127:959-68. Review.

Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL (2003) Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *Mod Pathol*;16: 692-699.

Massad LS, Collins YC, Meyer PM. (2001). Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol Oncol*;82:516-22.

Massad LS, Fazzari MJ, Anastos K, Klein RS, Minkoff H, Jamieson DJ, Duerr A, Celentano D, Gange S, Cu-Uvin S, Young M, Watts DH, Levine AM, Schuman P, Harris TG, Strickler HD (2007). Outcomes after treatment of cervical intraepithelial neoplasia among women with HIV. *J Low Genit Tract Dis*;11:90-7.

McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, Skegg DC. (2008) Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*;9:425-34. Epub 2008.

Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 1;124:516-20.

Meisels A, Fortin R (1976) Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol*; 20: 505-509.

Melnikow J, McGahan C, Sawaya GF, Ehlen T, Coldman A (2009). Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study. *J Natl Cancer Inst* 20;101:721-8.

Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Pöppinghaus A, Riethdorf L, Löning T (2001). Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch*;439:55-61.

Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards KR. (1998) Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: A meta-analysis. *Obstet Gynecol* 91: 626-631.

Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U (2004) Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* ;112: 854–859.

- Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U (2005) High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer*; 92:891-894.
- Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, Meijer CJ, Munoz N, Franceschi S; HPV Study Group (2003) Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol*; 158:486-494.
- Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al (2002) Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*; 359:1085–1092.
- Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, et al (1998) The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*; 132: 277-284.
- Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. (2001) Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*.20;285:2995-3002.
- Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton KL, Farhat S, Broering JM, Darragh TM. (2004) Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet*; 364: 1678-1683.
- Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S, et al (1992) The causal link between human papillomavirus and invasive cancer : a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer*; 52:743-749.
- Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al (2002) Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*; 359: 1093–1101.

- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003). International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 6;348:518-27
- Murphy N, Ring M, Heffron CCBB, King B, Killalea AG, Hughes C, Martin CM, McGuinness E, Sheils O, O'Leary JJ (2005). p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*;58:525–534
- Nanda K, McCrory DC, Myers ER et al (2000) Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*;132:810-819.
- Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G (2005). Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1;121:226-32. Epub 2005.
- Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K, Rådberg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J (2007). Human Papillomavirus and Papanicolaou Tests to Screen for Cervical Cancer. *N Engl J Med*;357:1589-97
- Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C (2003). p16^{INK4A} is a useful marker for diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursor: an immunohistochemical study with immunohistochemical correlations. *Am J Surg Pathol*; 27:187-193.
- Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I, Petry U, Baur S, Kirchmayr R, Michels W, Schneider A. (1998). Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol*; 10:49-56.

- Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E, Gau CH (2005). Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol*;97:35-40.
- Nobbenhuis M, Helmerhorst T, van den Brule A, Rozendaal L, Voorhorst F, Bezemer P, Verheijen R, Meijer C (2001a). Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *The Lancet* 358: 1782-1783
- Nobbenhuis M, Meijer C, van den Brule A, Rozendaal L, Voorhorst F, Risse E, et al (2001b) Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 84: 796-801.
- Ostor AG (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*; 12: 186-192.
- Ozalp SS, Yalcin OT, Tanir HM, Dundar E, Yildirim S (2002) Bcl-2 expression in preinvasive and invasive cervical lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 23:419-422
- Palefsky JM, Holly EA (2003) Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 31: 41-46.
- Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, Olsen CH, Miyazawa K, O'Connor DM. (2002) Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. *Obstet Gynecol*; 100: 277-280.
- Paternoster DM, Cester M, Resente C, Pascoli I, Nanhorngue K, Marchini F, Boccagni P, Cillo U, Ribaldone R, Amoroso E, Cocca N, Cuccolo V, Bertolino M, Surico N, Stratta P (2008). Human papilloma virus infection and cervical intraepithelial neoplasia in transplanted patients. *Transplant Proc.*;40:1877-80.
- Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsagué X, de Carvalho NS, Skinner SR,

- Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 369:2162-2170.
- Peter M, Rosty C, Couturier C, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X (2006) MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 25, 5985-5993.
- Pinto AV, Crum CP (2000) Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequences. *Clin Obstet Gynecol* 43, 352-362.
- Puig-Tintoré LM (2003) Neoplasia Intraepitelial del Cèrvix (CIN). Diagnòstico, Tratamiento y Seguimiento. En Cabero Roura L. Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción. SEGO Editorial Médica Panamericana ISBN 84-7903-755-5. Cap 189, 1544-1558.
- Puig-Tintoré LM, Corté X, Castellsagué X, Torné A, Ordi J, de Sanjosé S, Alonso I, Cararach M, Vidart JA, Alba A, Martínez-Escoriza JC, Coll C, Vilaplana E, Hardisson D, Bosch X (2006) Prevenció del càncer de coll uterino ante la vacunació frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol* 49 Supl: 5-62.
- Purola E, Savia E (1977) Cytology of gynecologic condiloma acuminatum. *Acta Cytol* 21: 26-31.
- Qi YM, Peng SW, Hengst K, Evander M, Park DS, Zhou J, Frazer IH. (1996) Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein. *Virology*; 216: 35–45.
- Raffle AE (2007) Challenges of implementing human papillomavirus (HPV) vaccination policy. *BMJ* 335:375-377.

- Riethmuller D, Gabelle C, Ramanah R, Sautière JL, Prétet JL, Schaal JP, Kantelip B, Mougin C, Maillet R. (2008) Importance of human papillomavirus (HPV) screening in the follow-up after CIN2-3 treatment. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.*; 37: 329-37
- Roden RB, Kirnbauer R, Jenson AB et al (1994) Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol*; 68: 7260–7266.
- Ronco G, Brezzi S, Carozzi F, Dalla Palma P, Giorgi-Rossi P, Minucci D, Naldoni C, Segnan N, Zappa M, Zorzi M, Cuzick J; NTCC study group (2007). The New Technologies for Cervical Cancer Screening randomised controlled trial. An overview of results during the first phase of recruitment. *Gynecol Oncol*;107(1 Suppl 1):S230-2. Epub 2007.
- Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, Minucci D, Naldoni C, Rizzolo R, Schincaglia P, Volante R, Zappa M, Zorzi M, Cuzick J, Segnan N (2008). New Technologies for Cervical Cancer Screening Working Group. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst.*;100:492-501. Epub 2008.
- Robinson WR, Freeman D (2002). Improved outcome of cervical neoplasia in HIV-infected women in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Patient Care STDS*;16:61-5
- Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al (2001) Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol*; 159: 1211-1218.
- Sahebali S, Depuydt CE, Segers K, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Mark E, Bogers J (2004) p16^{INK4a} as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology. *Int J Cancer*; 108: 871–876.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T (1998a) Expression status of p16 protein is associated with human papilloma virus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 153:1741–1748

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T (1998b). Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int*;48:580–585.

Santos M, Montagut C, Mellado B, García A, Ramón y Cajal S, Cardesa A, Puig-Tintoré LM, Ordi J. (2004). Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *Int J Gynecol Pathol*; 23:206-14.

Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suárez H, Alòs L, Puig-Tintoré LM, Campo E, Ordi J. (2006). p16 Overexpression Identifies HPV-positive Vulvar Squamous Cell Carcinomas. *Am J Surg Pathol*; 30:1347-56.

Sasieni P, Castanon A, Parkin DM (2009) How many cervical cancers are prevented by treatment of screen-detected disease in young women? *Int J Cancer*.15;124:461-4.

Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon HE, Komoto Y, Oue T, Kusafuka T, Okada A, Matsuda H (1996). Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer*;65:442–5.

Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K (2005) Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*; 15: 727-746.

Shew ML, Fortenberry JD, Tu W, Juliar BE, Batteiger BE, Qadadri B, Brown DR (2006) Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted

infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. *Arch Pediatr Adolesc Med*; 160: 151-156.

Schiller JT, Castellsagué X, Villa L, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26(S) K53-K61.

Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, Ashfaq R (2004). P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol*; 190:668-73.

Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Tornberg S, Hansson BG, Wang X, Arnheim L, Dahl V, Bremell D, Persson K, Dillner J, Rylander E (2005) Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer*; 116: 110-115.

Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsague X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R; International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group (2002) Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Nat Cancer Inst*; 94: 1604–1613.

Schneider V (2003). CIN prognostication: will molecular techniques do the trick? *Acta Cytol*;47:115-6.

Shin Nieh, Su-Feng Chen, Tang-Yuan Chu, Hung-Cheng Lai, and Earl Fuc (2003). Expression of p16INK4A in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecologic Oncology.*; 91: 201–208.

Solomon D. The 2001 Bethesda system Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*; 287:2114-2119

Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. (2004) Detection of high-risk human papillomavirus

E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol*;74:107-16

Soutter WP, de Barros LA, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaidis E, Kitchener HC. (1997) Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 5; 349: 978-80.

Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T (2006). Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 15;118:2048-55.

Strander B, Andersson-Ellstrom A, Milsom I, Sparen P (2007). Long term risk of invasive cancer after treatment for cervical intraepithelial neoplasia grade 3: population based cohort study. *BMJ* 24;335:1077.

Spence A, Goggin P, Franco E (2007). Process of care failures in invasive cervical cancer: Systematic review and meta-analysis. *Prev Med*;45(2-3):93-106. Epub 2007.

Spitzer M, Apgar BS, Brotzman GL. (2006) Management of histologic abnormalities of the cervix. *Am Fam Physician* 1;73:105-12

Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Hall C, Bacon M, Levine AM, Watts DH, Silverberg MJ, Xue X, Schlecht NF, Melnick S, Palefsky JM (2005). Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst.* 20;97:577-86.

Sun CA, Lai HC, Chang CC, Nieh S, Yu CP, Chu TY (2001). The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol Oncol*;83:95-9.

Suwannarurk K, Bhamarapravati S, Thaweekul Y, Mairaing K, Poomtavorn Y, Pattaraarchachai J (2009). The accuracy of cervical cancer and cervical

intraepithelial neoplasia diagnosis with loop electrosurgical excisional procedure under colposcopic vision. *J Gynecol Oncol*;20:35-8. Epub 2009.

Szarewski A, Cuzick J (1998) Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *J Epidemiol Biostat*; 3: 229–256.

Tam SW, Shay JW, Pagano M (1994). Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin dependent kinase inhibitor p16INK4A. *Cancer Res*;54:5816–20.

Tan L, Pepra E, Haloob RK. The outcome of pregnancy after large loop excision of the transformation zone of the cervix. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 24;1: 25- 27

Thomas DB, Qin Q, Kuypers J, Kiviat N, Ashley RL, Koetsawang A, Ray RM, Koetsawang S (2001) Human papillomavirus and cervical cancer in Bangkok. II. Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. *Am J Epidemiol* 153, 732–739.

Thomas DB, Ray RM, Qin Q, WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives (2002) Risk factors for progression of squamous cell cervical carcinoma in-situ to invasive cervical cancer: results of a multinational study. *Cancer Causes Control*; 13: 683-690.

Torné A, Ordi J, Puig-Tintoré LM, Jou P, Sánchez E, Muntané J, Iglesias X. (1997). The detection of papillomavirus by in situ hybridization. Clinico-pathological and virological correlation in patients with squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Med Clin (Barc)*. 22;109:691-5.

Torné A (2006). Hallazgos anormales. Cambios menores y mayores. En Puig-Tintoré LM. Andia Ortiz (eds) *Patología Cervical y Colposcopia en España en 2005*. Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (ISBN 84-609-7825-7): 27-31

Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, Shroyer KR (2004). Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol*; 35:689-96.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL (2006). Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;15:1274-80

Ueda J, Enomoto T, Miyatake T, Ozaki K, Yoshizaki T, Kanao H, Ueno Y, Nakashima R, Shroyer KR, Murata Y (2003) Monoclonal expansion with integration of high-risk human papillomavirus is an initial step for cervical carcinogenesis:

association of clonal status and human papillomavirus infection with clinical outcome in cervical intraepithelial neoplasia. *Lab Invest* 83:1517–1527

USPSTF 2006. US Preventive Services Task Force (USPSTF) Screening for Cervical Cancer Recommendations and Rationale. Publicat en *www.ahrq.gov*.

USPSTF 2009. A Cervical Cancer Decision Model to Inform Recommendations About Preventive Services: Perspective of the Decision Modeler. Publicat en *www.ahrq.gov*.

Van Duin M, Snujders PJ, Schrijnamakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbeenhuis MA, Van Der Brule AJ, Verheijen RH, Helerhorst TJ, Meijer CJ (2002). Human Papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN2/3 . *Int J Cancer*. 1;98:590-5

Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Speich N, Schmitt C, Griefingholt H, Kovács K, Klozoris C, Bollmann R (2008). Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep*;19:457-65.

Veroux M, Corona D, Scalia G, Garozzo V, Gagliano M, Giuffrida G, Costanzo CM, Giaquinta A, Palermo I, Zappalà D, Tallarita T, Zerbo D, Russo R, Cappellani A, Franchina C, Scriffignano V, Veroux P (2009). Surveillance of human papilloma virus infection and cervical cancer in kidney transplant recipients: preliminary data. *Transplant Proc*;41:1191-4

Visioli CB. (2004). Increasing trends of cervical adenocarcinoma incidence in Central Italy despite extensive screening programme 1985-2000. *Cancer Detect Prev* 28:461-464

von Knebel Doeberitz M (2002) New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 38:2229–2242

Walker J, Wang S, Schiffman M, Solomon, D, for the ASCUS LSIL Triage Study (ALTS) Groupy (2006). Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: Results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Am J Obstet Gynecol*; 195: 341–8

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*; 189: 12-19.

Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti MC, Wright T, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M (2004). Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;13:1355-60.

WHO 2009. Weekly epidemiological Record. No 15. April 2009

Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N (1998). Improved cervical smear assessment using

antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8;95:14932-7.

Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA. (2005). Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *The Journal of Infectious Diseases.*;191:731–738.

Winer R, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, Koutsky LA (2006) Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med*; 354: 2645-2654.

Wright J, Massad LS, Dunton C, Spitzer M, Wilkinson E, Solomon D, for the 2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology–sponsored Consensus Conference (2007). 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol*;197:346-55

Wright TC, Gagnon S, Richart RM, Ferenczy A (1992). Treatment of cervical intraepithelial neoplasia using the loop electrosurgical excision procedure. *Obstet Gynecol*; 79:173-8.

Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ (2003). American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*;189:295-304.

Wollscheid V, Kuhne-Heid R, Stein I, Jansen L, Kollner S, Schneider A, Durst M (2002) Identification of a new proliferation- associated protein NET-1C4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 99:771–775

Woodman CBJ., Collins S., Young LS (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.*;7:11-22. Review.

Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T (2004). Usefulness of liquid-based cytology specimens for immunocytochemical study

of p16 expression and human papillomavirus testing: comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer Cytopathol*;102:100–108.

Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T (2008). Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions. *Cancer*. 25;114:83-8.

Yoshinouchi M, Hongo A, Takamoto N, Ono Y, Nagao S, Miyagi Y, Kudo T, Kodama J (2000). Alteration of the CDKN2/P16 gene is not required for HPV-positive uterine cervical cell lines. *Int J Oncol*;16:537–41

Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, van der Linden HC, Runsink AP, de Schipper FA, Meijer CJ (2001) HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer*; 85: 398-404.

Zielinsky GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Van der Linden JC, Runsink AP, De Schpper FA, Meijer CJ (2001). HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer*; 85:398-404

zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974) Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: nucleic acid hybridations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13, 650-656.

zur Hausen H (1976) Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36, 794.