



ABRIR CAPÍTULO III

IV. RESULTADOS

IV.1. CLASIFICACION DE LAS LESIONES.

Tras el estudio histopatológico de todas las muestras se obtuvieron los siguientes resultados, separados en muestras de vulva y cérvix uterino.

IV.1.1. BIOPSIAS DE VULVA.

Todas las piezas de vulva presentaron lesiones asociadas a HPV y se clasificaron en tres grupos:

A) **Lesiones benignas:**

- Condiloma acuminado (n=31).

B) **Lesiones displásicas, con potencialidad de evolución maligna (n=6):**

- VIN I (n=3).
- VIN II (n=3)

C) **Lesiones invasivas:**

- Carcinoma escamoso bien diferenciado (n=3).

En la tabla IV.1 y en las figuras IV.1 y IV.2 se detallan la clasificación y distribución porcentual de las biopsias de vulva según su procedencia, las lesiones diagnosticadas y el criterio histopatológico de compatibilidad con infección por HPV.

| | <u>AVILA</u> ¹ | <u>SALAMANCA</u> ² | <u>GUADALAJARA</u> ³ | <u>MADRID (CPF)</u> ⁴ | <u>TOTAL</u> |
|---|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|
| LESIONES BENIGNAS HPV (condiloma acuminado) | 14 | 8 | 2 | 7 | 31 |
| LESIONES DISPLASICAS | --- | 2 | 1 | 3 | 6 |
| VIN I | --- | 1 | --- | 2 | 3 |
| Compatible HPV | --- | --- | --- | 2 | 2 |
| No compatible HPV | --- | 1 | --- | --- | 1 |
| VIN II | --- | 1 | 1 | 1 | 3 |
| Compatible HPV | --- | --- | 1 | 1 | 2 |
| No compatible HPV | --- | 1 | --- | --- | 1 |
| LESIONES INVASIVAS (Carcinoma escamoso bien diferenciado) | --- | 3 | --- | --- | 3 |
| T O T A L | 14 | 13 | 3 | 10 | 40 |

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.⁴ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.**Tabla IV.I.** Clasificación de las biopsias de vulva según su procedencia y la lesión diagnosticada.

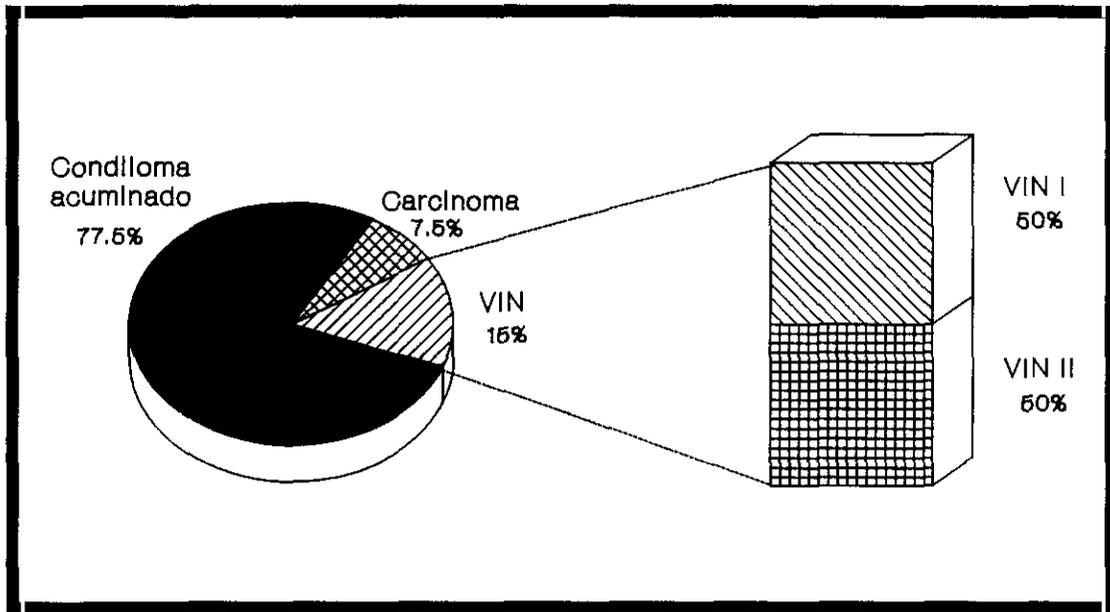


Figura IV.1. Distribución porcentual de los distintos tipos de lesión encontrados en las biopsias de vulva. (n=40).

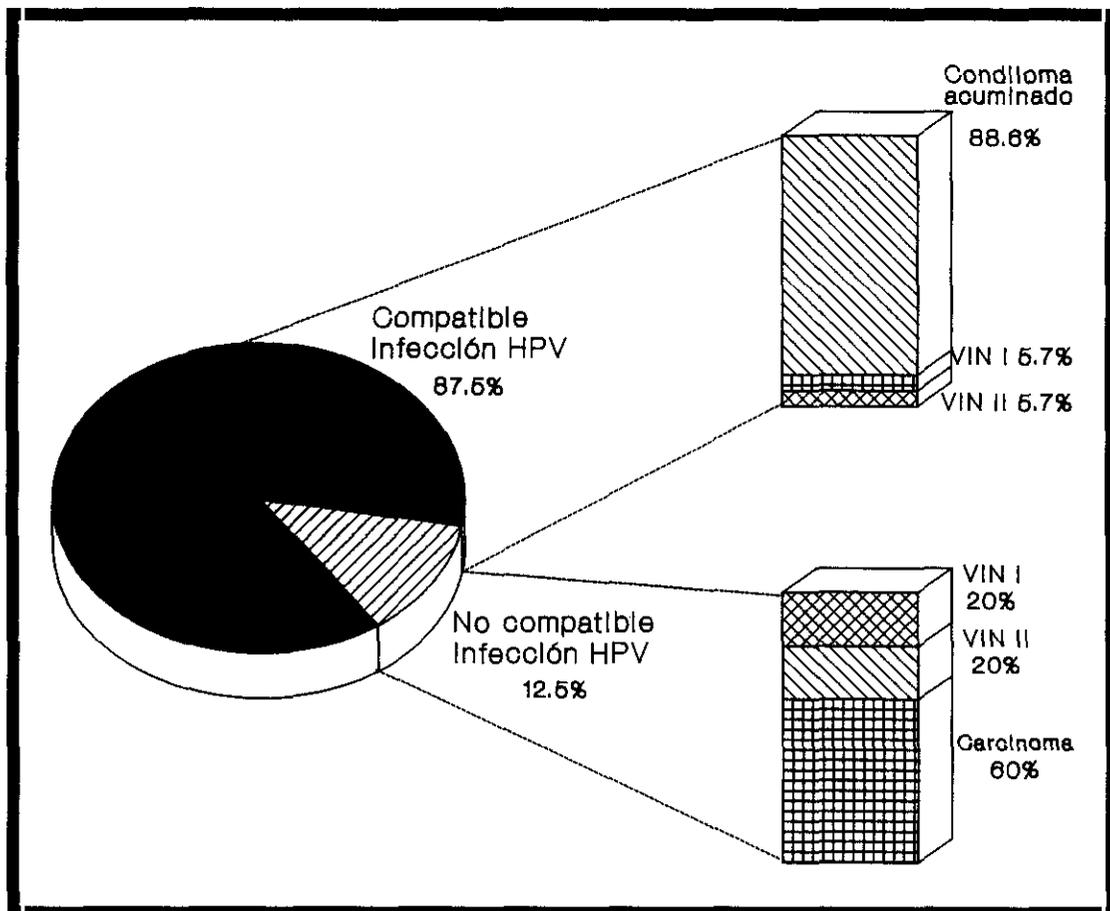


Figura IV.2. Distribución porcentual de las biopsias de vulva con hallazgos histopatológicos compatibles o no compatibles con infección por HPV según la lesión diagnosticada (n=40).

IV.1.2. BIOPSIAS DE CERVIX UTERINO.

Las biopsias de cérvix se clasificaron, según las lesiones encontradas, en dos grandes grupos:

A) Lesiones no asociadas a HPV (n=24):

- Hiperqueratosis (n=8).
- Cervicitis crónica (n=8).
- Pólipo cervical (n=8).

B) Lesiones asociadas a HPV (n=180):

1. Lesiones benignas:

- Condiloma acuminado (n=26).

2. Lesiones displásicas, con potencialidad de evolución maligna (n=142):

- LSIL (n=90).
- HSIL (n=52).

3. Lesiones invasivas:

- Carcinoma escamoso (n=12), dividido en bien diferenciado (n=9) y pobremente diferenciado (n=3).

En la tabla IV.II y en las figuras IV.3 y IV.4 se detallan la clasificación y distribución porcentual de las biopsias de cérvix uterino con lesiones asociadas a HPV según su procedencia, la lesión diagnosticada y el criterio histopatológico de compatibilidad con infección por HPV.

| | <u>AVILA</u> ¹ | <u>SALAMANCA</u> ² | <u>GUADALAJARA</u> ³ | <u>MADRID (CPF)</u> ⁴ | <u>MADRID (Av.)</u> ⁵ | <u>TOTAL</u> |
|---|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| LESIONES BENIGNAS HPV (condiloma acuminado) | 3 | 3 | 6 | 10 | 4 | 26 |
| LESIONES DISPLASICAS | 66 | 11 | 23 | 30 | 12 | 142 |
| LSIL | 39 | 5 | 17 | 24 | 5 | 90 |
| Compatible HPV | 34 | 4 | 16 | 24 | 5 | 83 |
| No compatible HPV | 5 | 1 | 1 | --- | --- | 7 |
| HSIL | 27 | 6 | 6 | 6 | 7 | 52 |
| Compatible HPV | 24 | 3 | 4 | 6 | 5 | 42 |
| No compatible HPV | 3 | 3 | 2 | --- | 2 | 10 |
| LESIONES INVASIVAS (Carcinoma escamoso) | 2 | 10 | --- | --- | --- | 12 |
| Bien diferenciado | 2 | 7 | --- | --- | --- | 9 |
| Pobremente dif. | --- | 3 | --- | --- | --- | 3 |
| T O T A L | 71 | 24 | 29 | 40 | 16 | 180 |

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.

⁴ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.

⁵ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

Tabla IV.II. Clasificación de las biopsias de cérvix uterino con lesiones asociadas a HPV, según su procedencia.

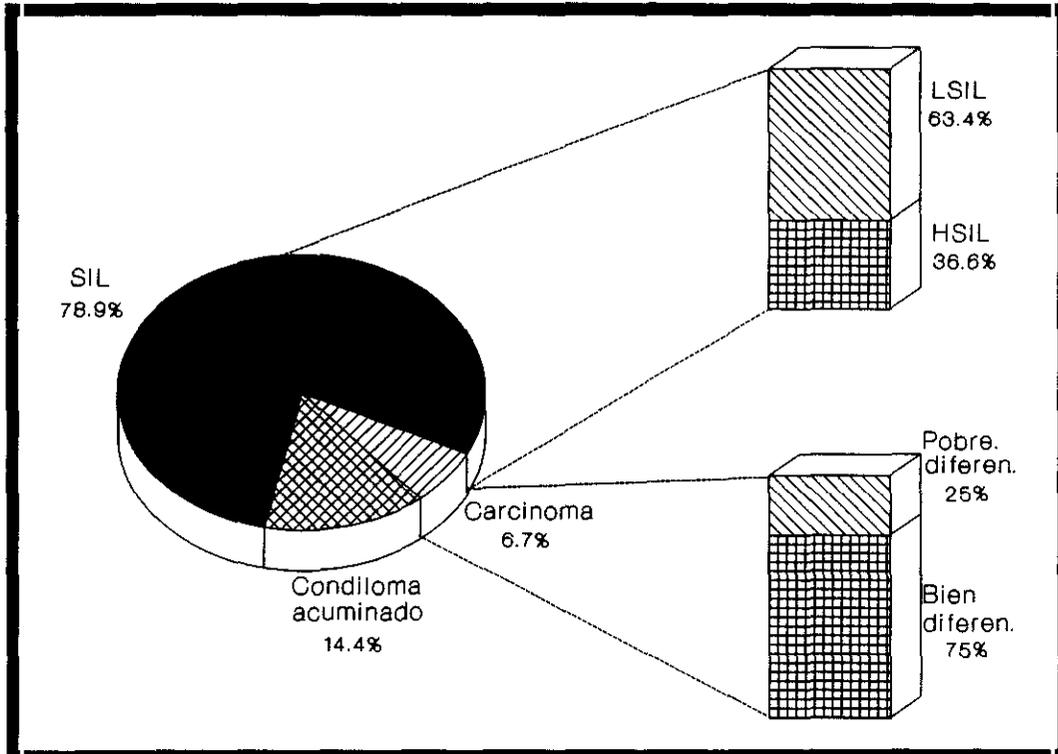


Figura IV.3. Distribución porcentual de las lesiones asociadas a HPV diagnosticadas en biopsias de cérvix uterino (n=180).

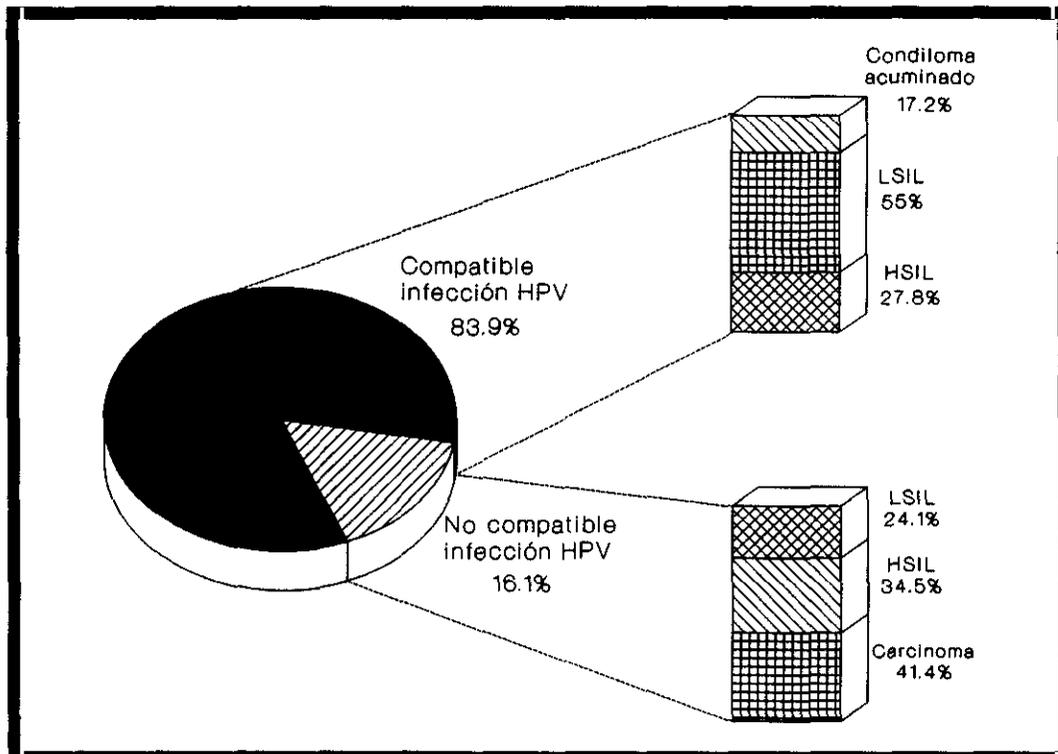


Figura IV.4. Distribución porcentual de lesiones cervicales con hallazgos histopatológicos compatibles o no compatibles con infección por HPV (n=180).

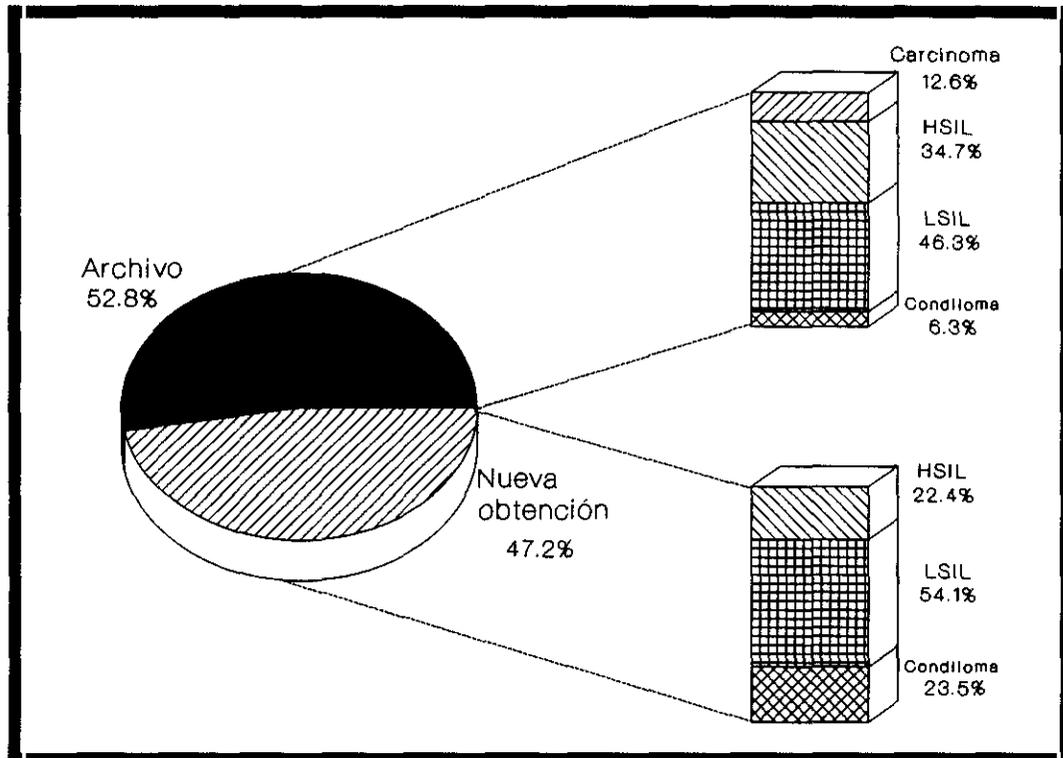


Figura IV.5. Distribución porcentual por lesiones de las biopsias de cérvix uterino según que procedan de archivo o sean de nueva obtención (n=180).

En la figura IV.5 se ilustra porcentualmente la clasificación de las biopsias cervicales con lesiones asociadas a HPV según que las muestras sean de archivo o de nueva obtención.

IV.2. LONGITUD DE EPITELIO.

Las 229 piezas en las que se midió la longitud del epitelio con análisis de imagen se dividieron en dos grupos:

A) Biopsias con lesiones no asociadas a HPV (n=24):

La longitud del epitelio fue superior a 10 mm en todas las piezas.

B) Biopsias con lesiones asociadas a HPV (n=205):

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla IV.III. En las tablas IV.IV y IV.V se resume la clasificación de las biopsias de vulva y cérvix según su longitud de epitelio, en relación con las lesiones diagnosticadas.

| LONGITUD DE EPITELIO (MM) | BIOPSIA | |
|------------------------------|-----------------|-------------------|
| | VULVA (n=37) | CERVIX (n=168) |
| <2 | --- | 9 (5.4%) |
| 2-3 | 1 (2.7%) | 15 (8.9%) |
| 3-4 | 1 (2.7%) | 11 (6.6%) |
| 4-5 | --- | 15 (8.9%) |
| 5-6 | 1 (2.7%) | 15 (8.9%) |
| 6-7 | 2 (5.4%) | 11 (6.6%) |
| 7-8 | 7 (18.9%) | 7 (4.2%) |
| 8-9 | 4 (10.8%) | 14 (8.3%) |
| 9-10 | 2 (5.4%) | 10 (6.0%) |
| >10 | 19 (51.4%) | 61 (36.3%) |

Tabla IV.III. Clasificación de las biopsias de vulva y cérvix con lesiones no invasivas asociadas a HPV, según la longitud de su epitelio.

| LONGITUD DE EPITELIO (mm) | LESION | | |
|---------------------------|------------------|-------------|--------------|
| | Condiloma (n=31) | VIN I (n=3) | VIN II (n=3) |
| <2 | --- | --- | --- |
| 2-3 | 1 (3.2%) | --- | --- |
| 3-4 | 1 (3.2%) | --- | --- |
| 4-5 | --- | --- | --- |
| 5-6 | --- | 1 | --- |
| 6-7 | 2 (6.5%) | --- | --- |
| 7-8 | 5 (16.1%) | --- | 2 |
| 8-9 | 4 (12.9%) | --- | --- |
| 9-10 | 1 (3.2%) | 1 | --- |
| >10 | 17 (54.8%) | 1 | 1 |

Tabla IV.IV. Clasificación de las biopsias de vulva en relación con las lesiones no invasivas diagnosticadas y la longitud de epitelio.

| LONGITUD DE EPITELIO (mm) | LESION | | |
|---------------------------|------------------|-------------|-------------|
| | Condiloma (n=26) | LSIL (n=90) | HSIL (n=52) |
| <2 | --- | 7 (7.8%) | 2 (3.8%) |
| 2-3 | 1 (3.8%) | 4 (4.4%) | 4 (7.7%) |
| 3-4 | 2 (7.7%) | 2 (2.2%) | 5 (9.6%) |
| 4-5 | --- | 20 (22.2%) | 3 (5.8%) |
| 5-6 | 1 (3.8%) | 9 (10.0%) | 5 (9.6%) |
| 6-7 | 3 (11.5%) | 5 (5.6%) | 3 (5.8%) |
| 7-8 | 1 (3.8%) | 4 (4.4%) | 2 (3.8%) |
| 8-9 | 2 (7.7%) | 5 (5.6%) | 7 (13.5%) |
| 9-10 | 3 (11.5%) | 3 (3.3%) | 4 (7.7%) |
| >10 | 13 (50.0%) | 31 (34.4%) | 17 (32.7%) |

Tabla IV.V. Clasificación de las biopsias de cérvix uterino en relación con las lesiones no invasivas asociadas a HPV diagnosticadas y la longitud de epitelio.

En los casos diagnosticados de carcinoma, tanto en vulva como en cérvix, y dada la naturaleza invasiva de este tipo de lesión, no pudo medirse la longitud del epitelio, al no estar conservada la capa basal de células. Sin embargo, todas las piezas tenían una cantidad de epitelio suficientemente representativa (más de 7 campos de 100 aumentos), equivalente a una longitud superior a 10 mm en las demás lesiones (el diámetro de un campo de 100 aumentos en el microscopio utilizado es de 1.6 mm).

IV.3. INMUNOHISTOQUIMICA.

Las tres líneas celulares estudiadas dieron un resultado negativo por inmunohistoquímica para el antígeno estructural común de HPV.

Todas las biopsias con lesiones no asociadas a HPV dieron igualmente un resultado negativo con esta técnica.

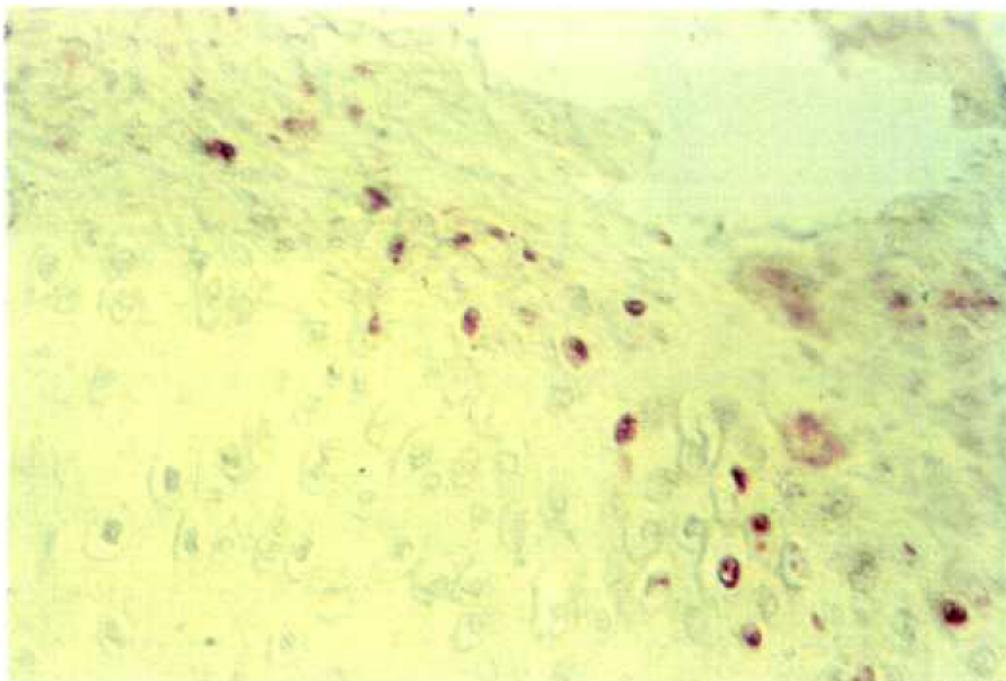


Figura IV.6. Condiloma acuminado de vulva positivo para HPV por inmunohistoquímica. El marcaje (núcleos de color rojo) afecta sólo a células superficiales del epitelio. (x 320).

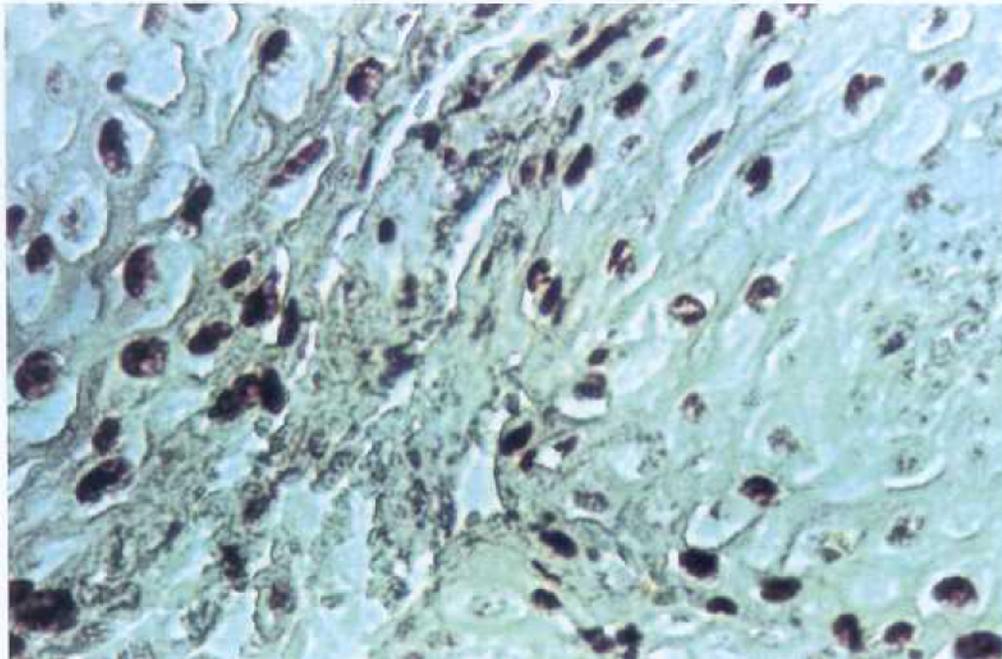


Figura IV.7. Detalle de coilocitos con reacción positiva para HPV por inmunohistoquímica (núcleos de color rojo). (x 640).

Por lo que respecta a las piezas con lesiones asociadas a HPV, se obtuvo un resultado positivo en 52 biopsias (23.6%). En todos los casos el marcaje afectó de forma casi exclusiva a coilocitos y células disqueratósicas, situadas siempre en el tercio superior del epitelio (figs. IV.6 y IV.7).

Para tabular los resultados obtenidos por lesiones conviene distinguir entre piezas de vulva y de cérvix uterino.

IV.3.1. BIOPSIAS DE VULVA.

De las 40 biopsias estudiadas, 21 fueron positivas para HPV por inmunohistoquímica (52.5%). La distribución de los casos positivos por lesiones se especifica en la tabla IV.VI.

| | Condiloma (n=31) | VIN I (n=3) | VIN II (n=3) | Carcinoma (n=3) | Total (n=40) |
|----------|---------------------|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Positivo | 18 (58.1%) | 1 | 1 | 1 | 21 (52.5%) |
| Negativo | 13 (41.9%) | 2 | 2 | 2 | 19 (47.5%) |

Tabla IV.VI. Resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica para HPV en biopsias de vulva, según las distintas lesiones.

En la biopsia diagnosticada de carcinoma epidermoide la reacción positiva se observó en dos células superficiales de una región de epitelio displásico adyacente a la masa tumoral.

IV.3.2. BIOPSIAS DE CERVIX UTERINO.

De los 180 casos estudiados, 30 fueron positivos para HPV por inmunohistoquímica (16.7%). En la tabla IV.VII se especifican los resultados obtenidos por lesiones y su distribución porcentual.

| | Condiloma (n=26) | LSIL (n=90) | HSIL (n=52) | Carcinoma (n=12) | Total (n=180) |
|----------|---------------------|----------------|----------------|---------------------|------------------|
| Positivo | 14 (53.8%) | 10 (11.1%) | 6 (11.5%) | --- | 30 (16.7%) |
| Negativo | 12 (46.2%) | 80 (88.9%) | 46 (88.5%) | 12 (100%) | 150 (83.3%) |

Tabla IV.VII. Resultados obtenidos con la técnica de inmunohistoquímica para HPV en biopsias de cérvix uterino con lesiones asociadas a HPV.

Si se consideran sólo las biopsias con lesiones no asociadas a HPV y aquellas diagnosticadas de condiloma acuminado, la inmunohistoquímica tiene, con respecto a los criterios histológicos, una sensibilidad de 53.8%, 100% de especificidad, un valor predictivo positivo de 100% y un valor predictivo negativo de 66.7%.

IV.4. HIBRIDACION *IN SITU*.

IV.4.1. TECNICA DE DETECCION.

Las líneas celulares CaSki y HeLa dieron resultado positivo por esta técnica. En las células CaSki la positividad consistió en un marcaje de tipo puntual de color violáceo en el núcleo de las células, variando el número de puntos y su tamaño de unas células a otras, llegando a ocupar en algunas ocasiones la casi totalidad del núcleo (fig. IV.8). En las células HeLa, en cambio, la positividad consistió en uno o dos puntos pequeños intranucleares (fig. IV.9).

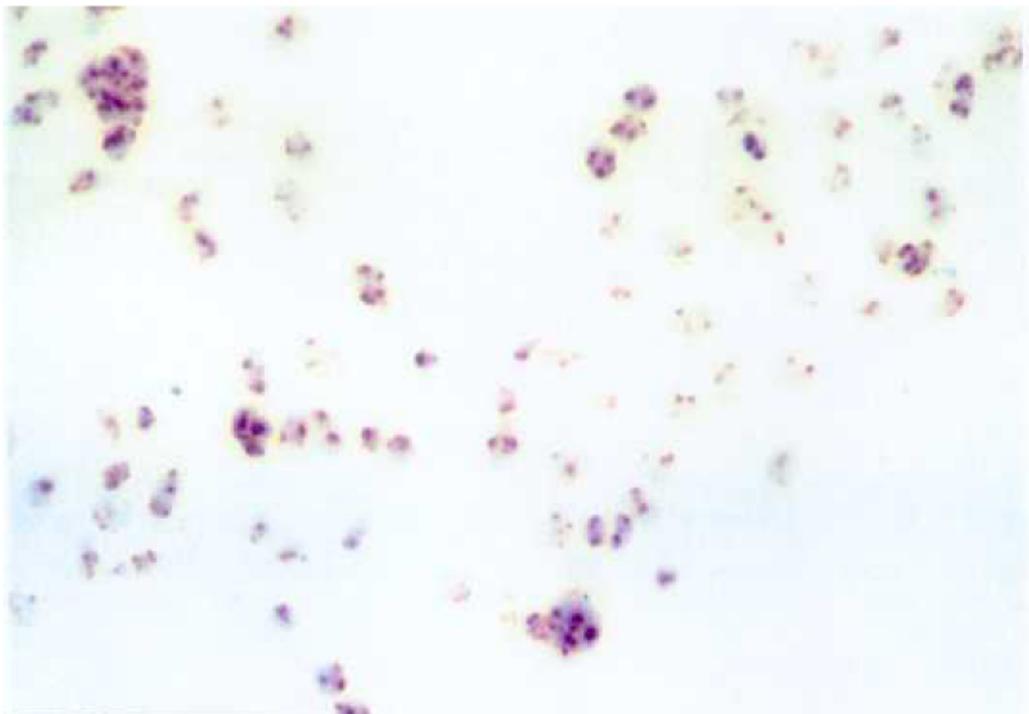


Figura IV.8. Extensión de células CaSki positivas para HPV por HIS-detección. (x 320).

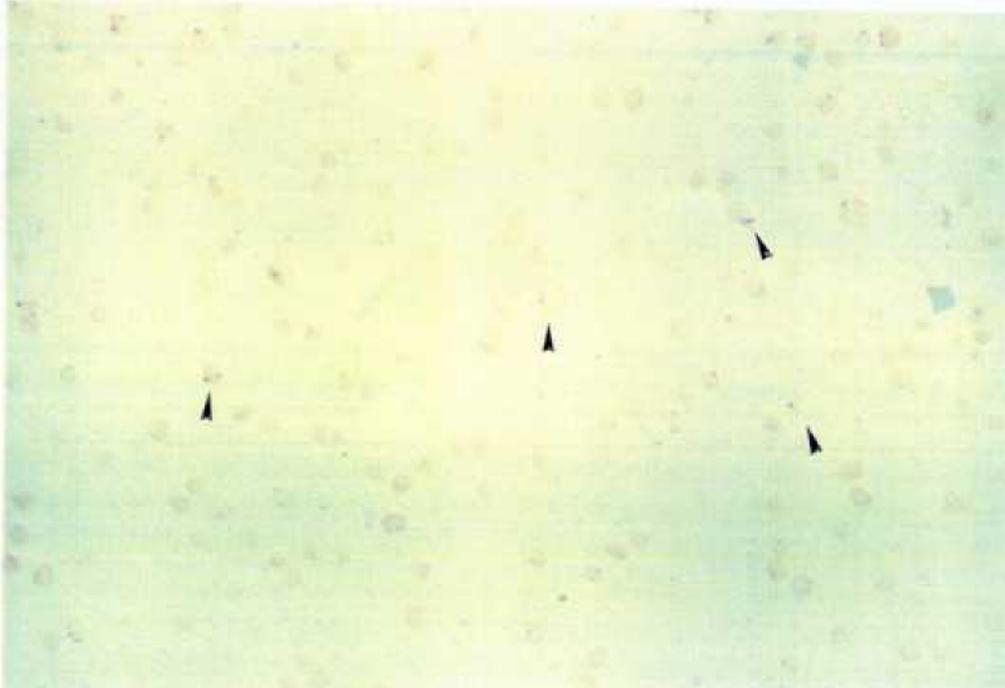


Figura IV.9. Extensión de células HeLa con una reacción positiva para HPV por HIS-detección, consistente en uno o dos puntos morados intranucleares (flechas). (x 160).

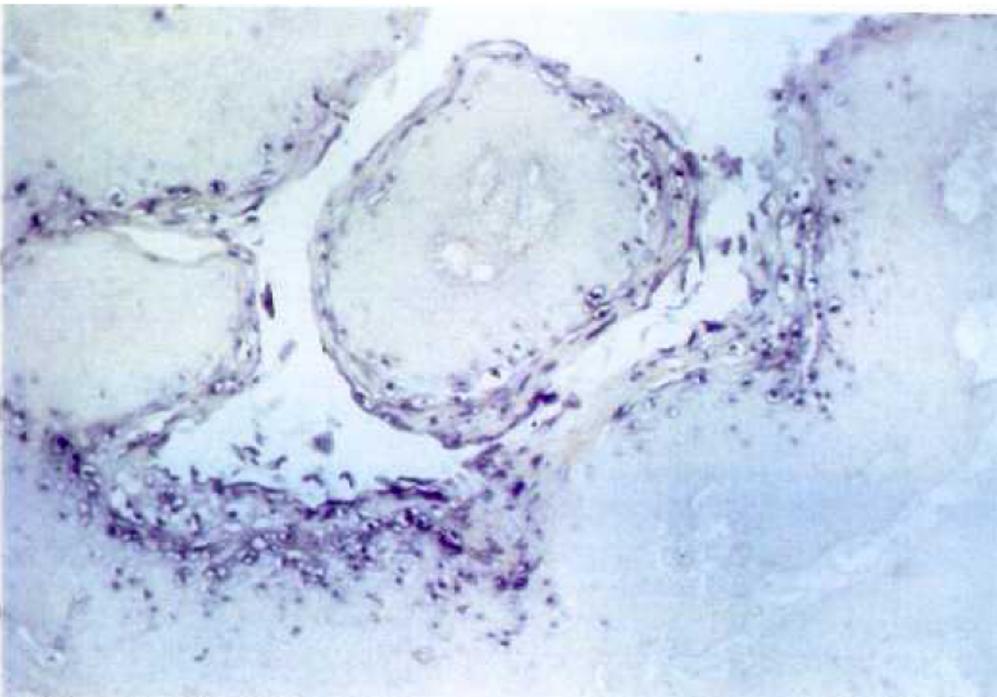


Figura IV.10. Condiloma acuminado de vulva positivo para HPV por HIS-detección. Los núcleos de las células positivas presentan una intensa coloración violácea.

Las células SiHa fueron negativas con la técnica de HIS-detección, al igual que todas las biopsias cervicales con lesiones no asociadas a HPV.

Por lo que respecta a las piezas con lesiones asociadas a HPV, 155 (70.5%) fueron positivas (fig. IV.10). Los resultados por lesiones se detallan a continuación, divididos en vulva y cérvix.

IV.4.1.1. Biopsias de vulva.

Treinta y tres biopsias de las 40 estudiadas resultaron positivas para HPV por HIS-detección (82.5%). Los resultados obtenidos por lesiones se especifican en la tabla IV.VIII.

| | Condiloma (n=31) | VIN I (n=3) | VIN II (n=3) | Carcinoma (n=3) | Total (n=40) |
|----------|---------------------|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Positivo | 25 (80.7%) | 2 | 3 | 3 | 33 (82.5%) |
| Negativo | 6 (19.4%) | 1 | --- | --- | 7 (17.5%) |

Tabla IV.VIII. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias de vulva.

IV.4.1.2. Biopsias de cérvix uterino.

De las 180 biopsias estudiadas, 122 resultaron positivas con la técnica de HIS-detección (67.8%). La distribución de las biopsias positivas por lesiones se detalla en la tabla IV.IX.

| | Condiloma (n=26) | LSIL (n=90) | HSIL (n=52) | Carcinoma (n=12) | Total (n=180) |
|----------|---------------------|----------------|----------------|---------------------|------------------|
| Positivo | 24 (92.3%) | 47 (52.2%) | 40 (76.9%) | 11 (91.7%) | 122 (67.8%) |
| Negativo | 2 (7.7%) | 43 (47.8%) | 12 (23.1%) | 1 (8.3%) | 58 (32.2%) |

Tabla IV.IX. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias cervicales con lesiones asociadas a HPV.

La sensibilidad de esta técnica respecto de los criterios histopatológicos en biopsias diagnosticadas de condiloma acuminado es de 92.3%, la especificidad y el valor predictivo positivo de 100% y el valor predictivo negativo de 92.3%.

IV.4.1.3. Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias.

En la tabla IV.X y en la figura IV.11 se detallan los resultados globales obtenidos en biopsias de vulva y cérvix con lesiones no invasivas asociadas a HPV en relación con la longitud del epitelio presente en las mismas. En la tabla IV.XI y en la figura IV.12 se representan estos mismos resultados en biopsias cervicales desglosados por lesiones.

En la figura IV.13 se ilustran los resultados porcentuales obtenidos con esta técnica en biopsias de cérvix, con una longitud de epitelio inferior a 5 mm, entre 5 y 9 mm y superior a 9 mm. Las diferencias entre estos tres porcentajes de positividad son estadísticamente significativas ($p < 10^{-6}$) cuando se consideran globalmente. La diferencia es también significativa entre las biopsias con menos de 5 mm de epitelio y aquellas con epitelio entre 5 y 9 mm ($p < 0.0002$) o superior a 9 mm ($p < 10^{-6}$). Por el contrario, no es significativa la diferencia entre los resultados obtenidos en biopsias con un epitelio comprendido entre 5 y 9 mm y aquellas con más de 9 mm.

| LONGITUD DE EPITELIO (mm) | BIOPSIA | |
|---------------------------|---|--|
| | VULVA (HIS + ¹ / total ²) | CERVIX (HIS + ¹ / total ²) |
| <2 | --- / --- | 1 / 9 |
| 2-3 | --- / 1 | 6 / 15 |
| 3-4 | --- / 1 | 4 / 11 |
| 4-5 | --- / --- | 6 / 15 |
| 5-6 | 1 / 1 | 12 / 15 |
| 6-7 | 2 / 2 | 8 / 11 |
| 7-8 | 7 / 7 | 4 / 7 |
| 8-9 | 2 / 4 | 10 / 14 |
| 9-10 | 1 / 2 | 8 / 10 |
| >10 | 17 / 19 | 52 / 61 |

¹ Número de biopsias positivas por la técnica de HIS-detección para HPV.

² Número total de biopsias incluidas en cada clase según la longitud de su epitelio.

Tabla IV.X. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias de vulva y cérvix en relación con la longitud de su epitelio.

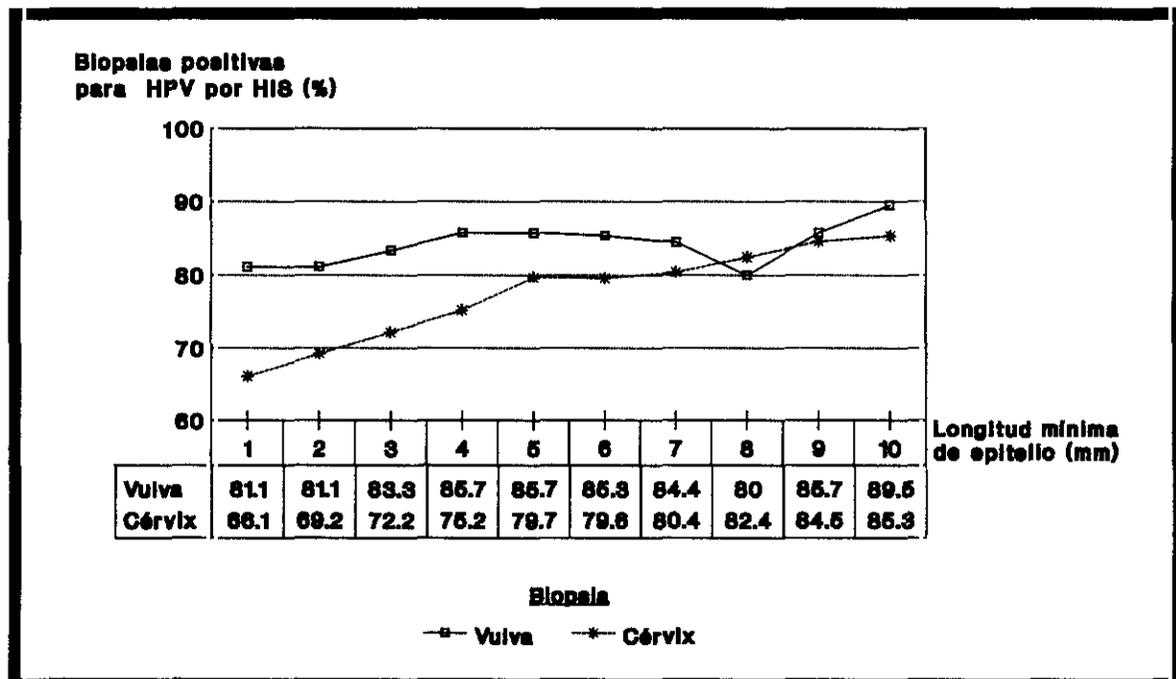


Figura IV.11. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección en biopsias de vulva y cérvix con lesiones no invasivas asociadas a HPV según el tamaño mínimo de las mismas.

| LONGITUD DE EPITELIO (mm) | BIOPSIA | | |
|---------------------------|--|---|---|
| | CONDILOMA (HIS + ¹ / total ²) | LSIL (HIS + ¹ / total ²) | HSIL (HIS + ¹ / total ²) |
| <2 | --- / --- | 1 / 7 | --- / 2 |
| 2-3 | --- / 1 | 3 / 4 | 3 / 4 |
| 3-4 | 2 / 2 | --- / 2 | 2 / 5 |
| 4-5 | --- / --- | 4 / 20 | 2 / 3 |
| 5-6 | 1 / 1 | 7 / 9 | 4 / 5 |
| 6-7 | 3 / 3 | 4 / 5 | 1 / 3 |
| 7-8 | 1 / 1 | 1 / 4 | 2 / 2 |
| 8-9 | 2 / 2 | 3 / 5 | 5 / 7 |
| 9-10 | 3 / 3 | 1 / 3 | 4 / 4 |
| >10 | 12 / 13 | 23 / 31 | 17 / 17 |

¹ Número de biopsias positivas por la técnica de HIS-detección para HPV.

² Número total de biopsias incluidas en cada clase según la longitud de su epitelio.

Tabla IV.XI. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias cervicales en relación con la longitud de su epitelio y la lesión diagnosticada.

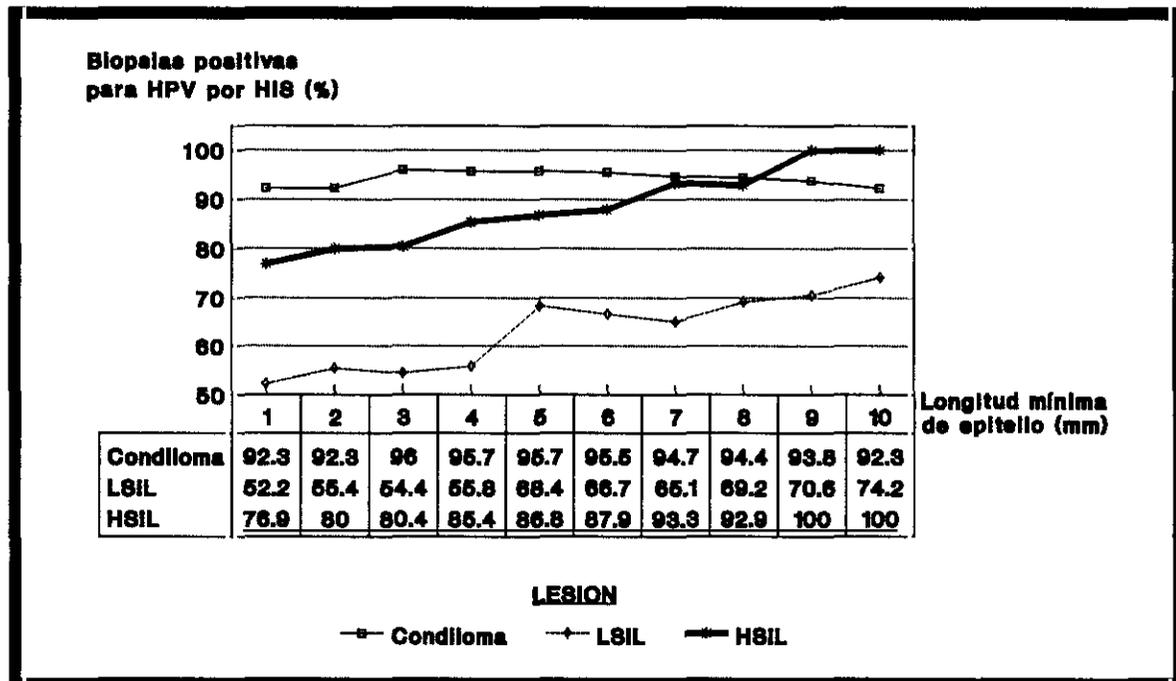


Figura IV.12. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección en biopsias cervicales con lesiones no invasivas asociadas a HPV, según longitudes mínimas de epitelio.

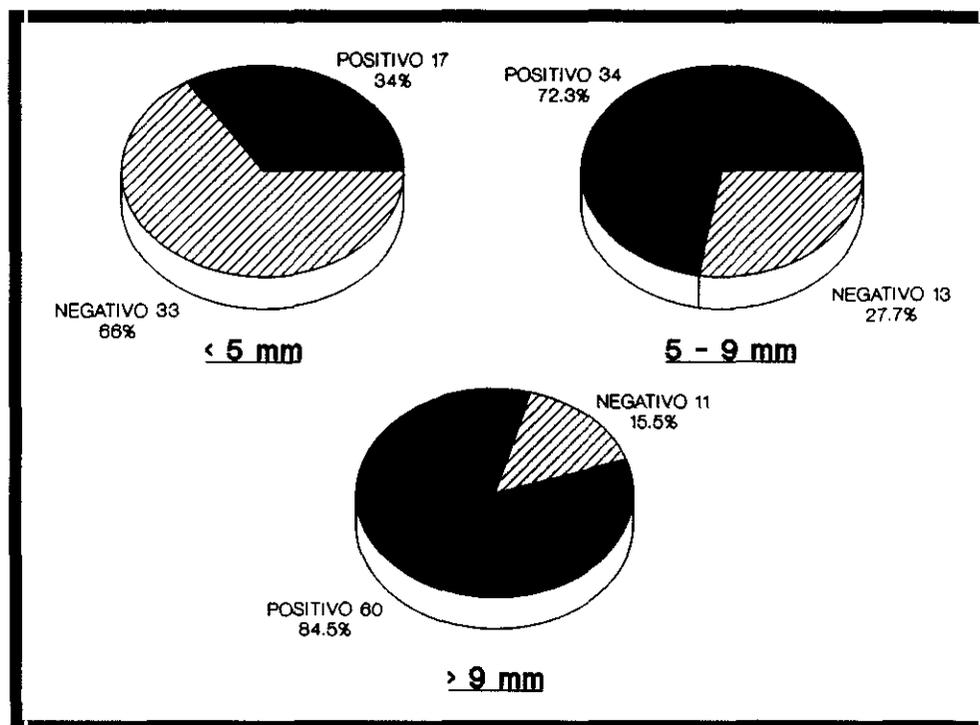


Figura IV.13. Resultados porcentuales obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias de cérvix con una longitud de epitelio inferior a 5 mm, entre 5 y 9 mm y superior a 9 mm.

Finalmente, en la figura IV.14 se comparan los porcentajes de positividad para HPV por hibridación *in situ* en las distintas lesiones no invasivas diagnosticadas en piezas de cérvix según que la longitud del epitelio presente en las mismas sea inferior a 5 mm, esté comprendida entre 5 y 9 mm o sea superior a 9 mm. Las diferencias observadas en condilomas acuminados no son estadísticamente significativas. Sí lo son, en cambio, en LSIL ($p < 0.0003$) y HSIL ($p < 0.003$) cuando se consideran globalmente. En LSIL la diferencia es significativa entre biopsias con menos de 5 mm de epitelio y aquellas con 5-9 mm o más de 9 mm; no es significativa entre biopsias con 5-9 mm de epitelio y más de 9 mm. En HSIL hay diferencia estadísticamente significativa entre biopsias con menos de 5 mm y más de 9 mm y entre biopsias con 5-9 mm y más de 9 mm; no es significativa la diferencia observada entre biopsias con menos de 5 mm y con 5-9 mm de epitelio.

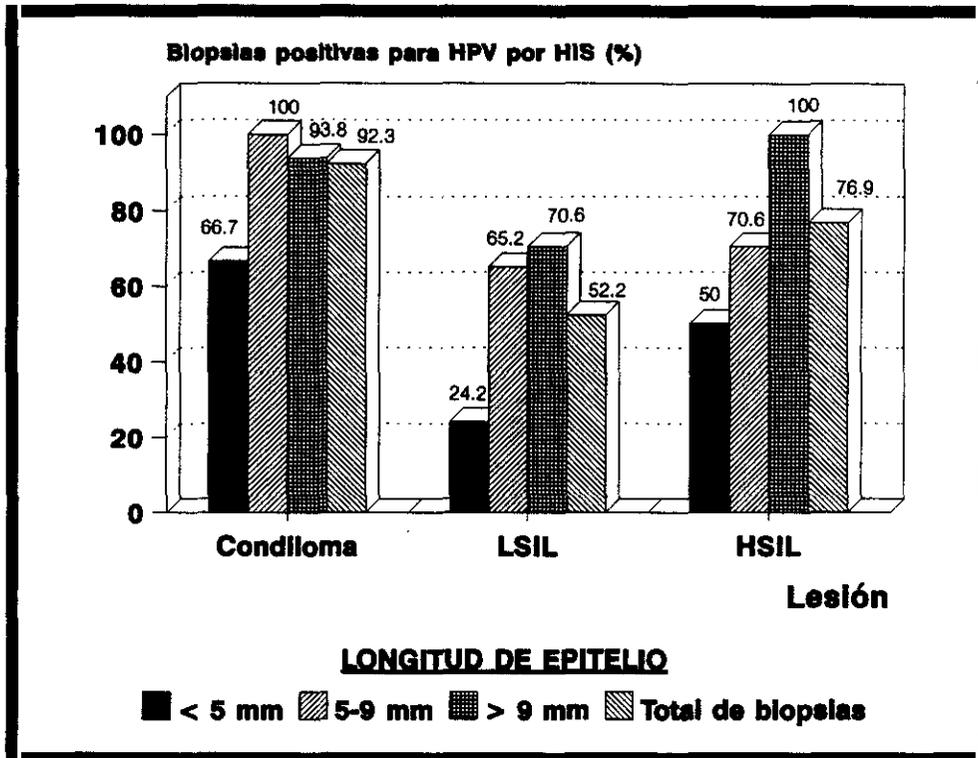


Figura IV.14. Comparación de resultados de la técnica de HIS-detección para HPV por lesiones en biopsias de cérvix con longitud de epitelio menor de 5 mm, entre 5-9 mm y mayor de 9 mm.

IV.4.2. TECNICA DE TIPADO.

Las dos líneas celulares positivas por la técnica de HIS-detección (CaSki y HeLa) dieron un resultado positivo con la sonda específica para los tipos 16/18 de HPV. El tipo de marcaje observado en cada una de ellas fue similar al obtenido por HIS-detección. Ambas líneas celulares fueron negativas con las sondas específicas para los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos en las biopsias positivas por HIS-detección, conviene separar nuevamente las biopsias de vulva y cérvix.

IV.4.2.1. Biopsias de vulva.

De las 33 biopsias HPV positivas por la técnica de detección, 25 fueron positivas para los tipos 6/11 de HPV (75.8%), 3 para los tipos 16/18 de HPV (9.1%), 6 para los tipos 31/33/51 de HPV (18.2%) y 3 resultaron negativas para las tres sondas (9.1%). En la tabla IV.XII se muestran los resultados por lesiones.

| LESION | TIPO VIRAL | | | |
|------------------|------------|-------|----------|-------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| Condiloma (n=25) | 23 | 2 | 3 | 1 |
| VIN I (n=2) | 1 | 1 | --- | --- |
| VIN II (n=3) | 1 | --- | 2 | --- |
| Carcinoma (n=3) | --- | --- | 1 | 2 |

Tabla IV.XII. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias de vulva HPV-positivas en relación con las lesiones diagnosticadas.

Tres biopsias dieron un resultado positivo con más de una sonda (7.5% del total de muestras de vulva estudiadas y 9.1% de las biopsias positivas por HIS-detección): una fue positiva para los tipos 6/11 y 16/18 de HPV, otra para los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV y la tercera dio un resultado positivo con las tres sondas utilizadas. Los tres casos habían sido diagnosticados de condiloma acuminado y en todos ellos el marcaje obtenido con cada sonda afectó a zonas distintas del epitelio no superpuestas.

IV.4.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

De las 122 biopsias en las que se obtuvo un resultado positivo con HIS-detección, 34 fueron positivas para los tipos 6/11 de HPV con la técnica de HIS-

tipado (27.9%), 40 para los tipos 16/18 de HPV (32.8%), 51 para los tipos 31/33/51 de HPV (41.8%) y 9 fueron negativos para las tres sondas (7.4%).

En 10 piezas (1 condiloma acuminado, 6 LSIL y 3 HSIL) se obtuvo un resultado positivo con 2 sondas (5.6% del total de biopsias de cérvix y 8.2% de las biopsias positivas por HIS-detección): 1 (LSIL) fue positiva para los tipos 6/11 y 16/18 de HPV, 4 (1 condiloma acuminado y 3 LSIL) para los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV y 5 (2 LSIL y 3 HSIL) para los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV. Una biopsia, diagnosticada de LSIL, dio un resultado positivo con las tres sondas. En todos estos casos el marcaje obtenido con cada sonda afectó a zonas distintas del epitelio no superpuestas.

En la tabla IV.XIII y en la figura IV.15 se muestran los resultados obtenidos con esta técnica, por lesiones, en el total de biopsias cervicales HPV-positivas por HIS-detección. Finalmente, en la tabla IV.XIV se detallan estos mismos resultados eliminando aquellas biopsias que fueron positivas para dos o más sondas.

| LESION | TIPO VIRAL | | | |
|------------------|------------|-------|----------|-------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| Condiloma (n=24) | 17 | --- | 8 | --- |
| LSIL (n=47) | 13 | 16 | 21 | 5 |
| HSIL (n=40) | 4 | 20 | 16 | 3 |
| Carcinoma (n=11) | --- | 4 | 6 | 1 |

Tabla IV.XIII. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias cervicales HPV-positivas en relación con las lesiones diagnosticadas.

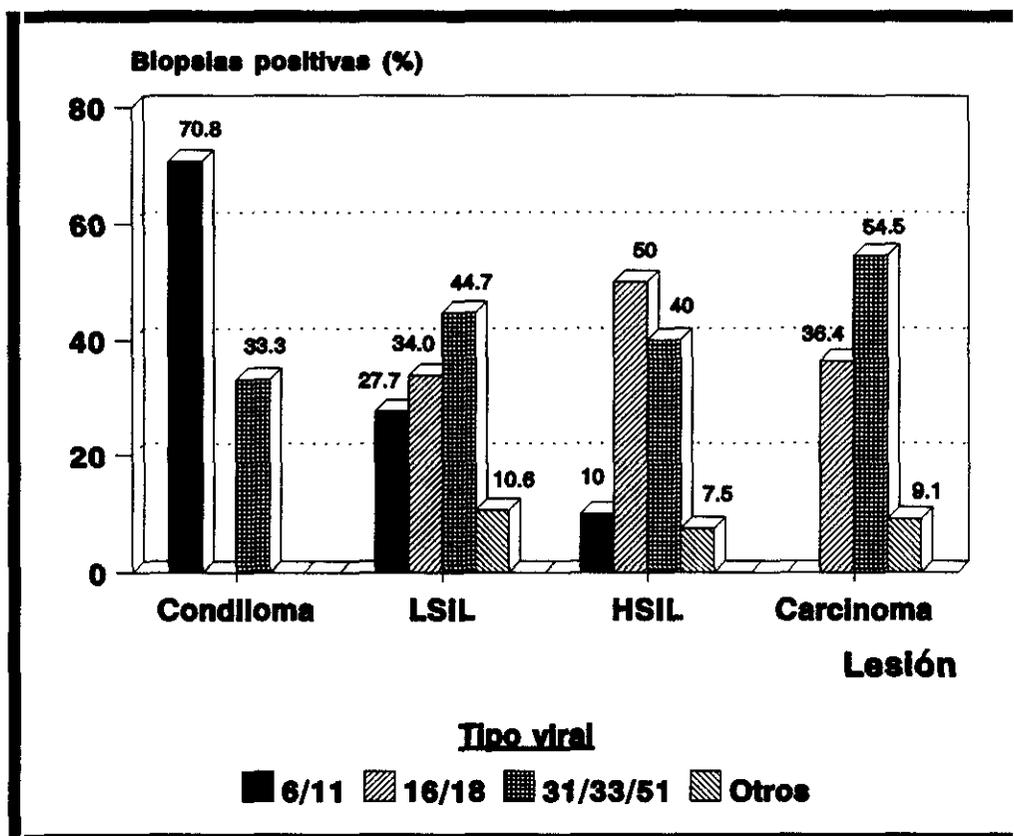


Figura IV.15. Representación gráfica de los resultados porcentuales obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias de cérvix, por lesiones.

| LESION | TIPO VIRAL | | | |
|-----------|------------|-------|----------|-------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| Condiloma | 16 | --- | 7 | --- |
| LSIL | 8 | 12 | 15 | 5 |
| HSIL | 4 | 17 | 13 | 3 |
| Carcinoma | --- | 4 | 6 | 1 |

Tabla IV.XIV. Resultados de la técnica de HIS-tipado para HPV, por lesiones, en biopsias cervicales sin infección múltiple.

La prueba de χ^2 para probar la hipótesis de independencia de estas dos variables (tipo viral y lesión), aplicada a los datos de la tabla IV.XIV, refleja una diferencia estadísticamente significativa ($p < 2 \times 10^{-5}$) entre los resultados obtenidos en cada tipo de lesión.

IV.5. PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION *IN SITU*.

Para la evaluación de los tres parámetros morfológicos asociados a la hibridación *in situ* que se han estudiado, sólo se consideraron las biopsias que dieron resultado positivo con una única sonda por HIS-tipado y aquellas positivas por HIS-detección y negativas por HIS-tipado. En consecuencia, el número total de biopsias consideradas ha sido de 141: 30 de vulva y 111 de cérvix uterino.

IV.5.1. PATRON DE MARCAJE.

A nivel celular se observaron dos tipos distintos de reacción positiva con la técnica de hibridación *in situ*: uniforme, de manera que la coloración afecta por igual a la totalidad del núcleo (fig. IV.16), o puntual, de manera que el color se distribuye en forma de puntos variables en número y tamaño (fig. IV.17).

Según el tipo de reacción positiva predominante en cada biopsia HPV-positiva por hibridación *in situ* se distinguieron tres patrones de marcaje:

1. Uniforme: predominan las células positivas con una reacción de tipo uniforme y ,normalmente, de gran intensidad (fig. IV.16).
2. Puntual: la mayoría de las células positivas presentan una reacción de tipo puntual, independientemente del número, tamaño e intensidad de los puntos de color en cada núcleo (fig. IV.17).
3. Mixto: se observan células positivas con ambos tipos de marcaje, uniforme y puntual, en proporciones similares (fig. IV.18).

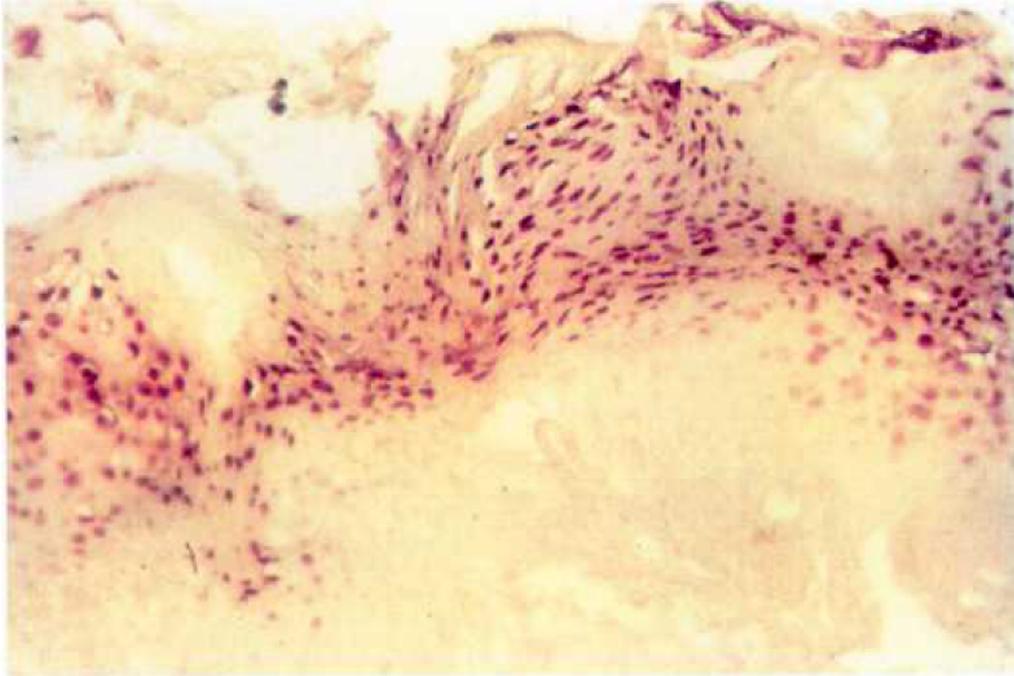


Figura IV.16. Biopsia de vulva positiva para los tipos 6/11 de HPV por HIS-tipado con un patrón de marcaje uniforme. (x 160)

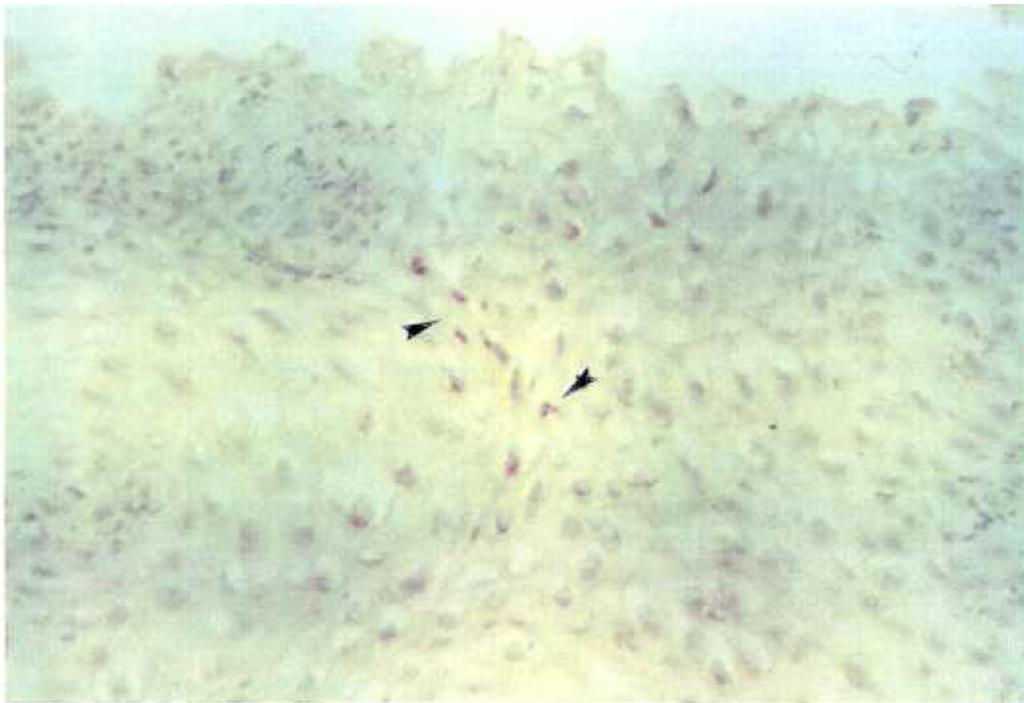


Figura IV.17. Patrón de marcaje puntual (flechas) obtenido por hibridación *in situ* en una biopsia de cérvix uterino positiva para los tipos 16/18 de HPV. (x 320).

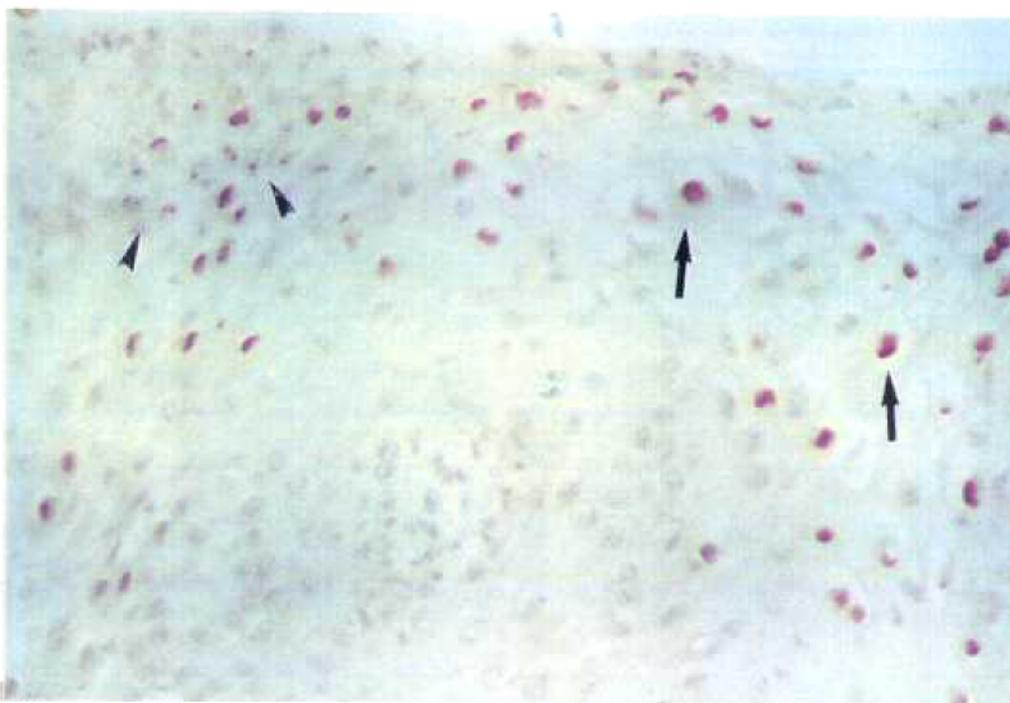


Figura IV.18. Patrón de marcaje mixto obtenido con hibridación *in situ* en una biopsia cervical positiva para los tipos 31/33/51 de HPV. Obsérvese la presencia simultánea de células con marcaje puntual (flecha corta) y uniforme (flecha larga). (x 320).

IV.5.1.1. Biopsias de vulva.

La distribución de los tres patrones de marcaje por lesiones y tipos virales detectados se detalla en las tablas IV.XV y IV.XVI, respectivamente.

En la figura IV.18 se ilustra la relación existente entre el patrón de marcaje y los tipos virales detectados en condilomas acuminados de vulva.

| PATRON DE MARCAJE | LESION | | | |
|-------------------|-----------|-------|--------|-----------|
| | Condiloma | VIN I | VIN II | Carcinoma |
| Uniforme | 20 | 2 | 1 | --- |
| Puntual | 1 | --- | 2 | 3 |
| Mixto | 1 | --- | --- | --- |

Tabla IV.XV. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de marcaje observado y la lesión diagnosticada.

| PATRON DE MARCAJE | TIPO VIRAL | | | |
|-------------------|------------|-------|----------|-------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| Uniforme | 21 | 1 | --- | 1 |
| Puntual | --- | --- | 4 | 2 |
| Mixto | 1 | --- | --- | --- |

Tabla IV.XVI. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de marcaje observado y el tipo viral detectado.

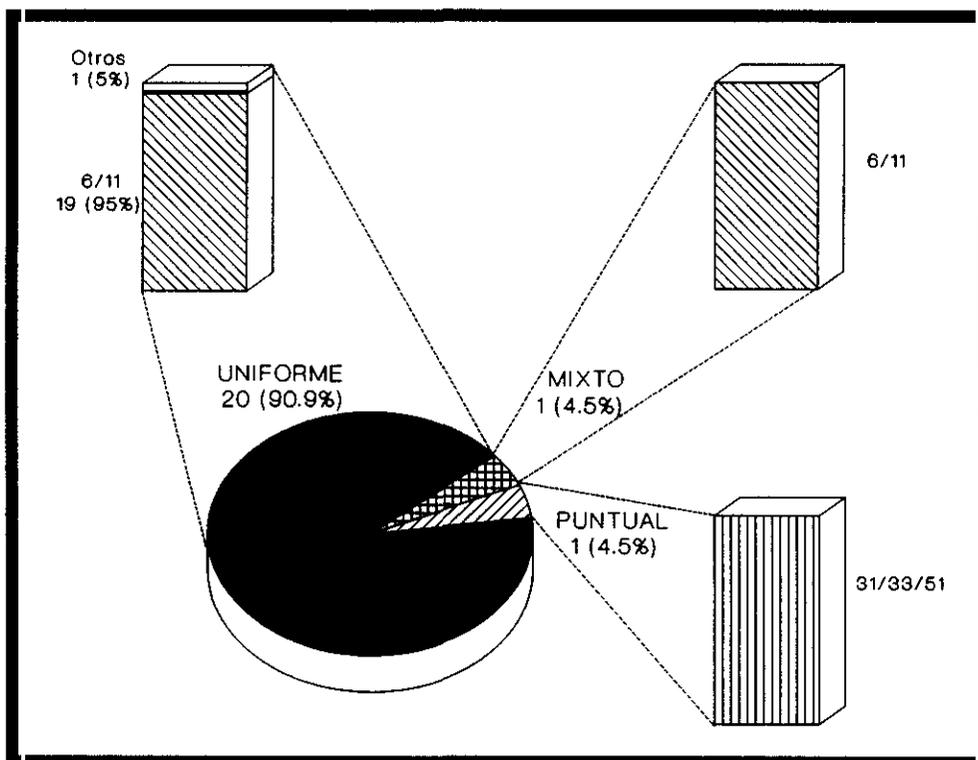


Figura IV.19. Distribución de patrones de marcaje en condilomas acuminados de vulva en relación con los tipos de HPV detectados.

IV.5.1.2. Biopsias de cérvix uterino.

La clasificación de las biopsias cervicales según el patrón de marcaje observado por hibridación *in situ*, en relación con la lesión diagnosticada y los tipos virales detectados se refleja en las figuras IV.20 y IV.21.

Estadísticamente la distribución de patrones de marcaje en los distintos tipos de lesión no difiere de forma significativa. Sí se demuestra, en cambio, diferencia significativa en la distribución de patrones de marcaje en relación con los tipos virales detectados, tanto cuando se consideran globalmente ($p < 10^{-6}$), como cuando se consideran por parejas ($p < 10^{-4}$ entre los tipos 6/11 y 16/18 de HPV, $p < 10^{-6}$ entre los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV y $p < 0.05$ entre los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV).

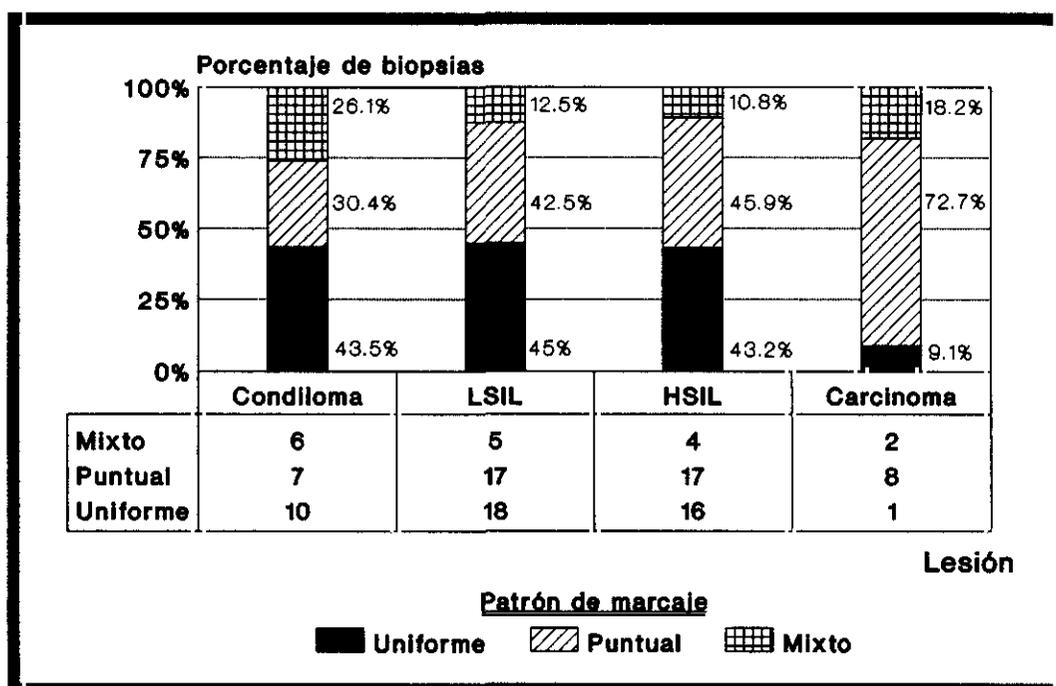


Figura IV.20. Clasificación de las biopsias cervicales en relación con la lesión diagnosticada y el patrón de marcaje observado por hibridación *in situ*.

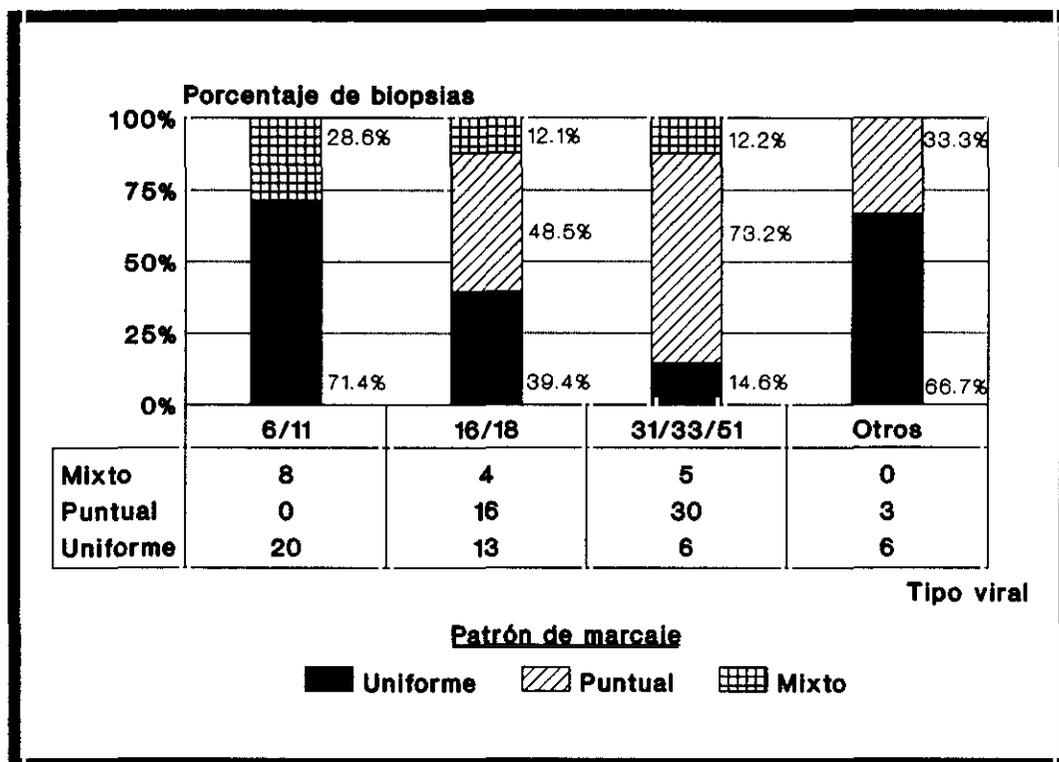


Figura IV.21. Clasificación de las biopsias cervicales según el tipo viral detectado y el patrón de marcaje observado por hibridación *in situ*.

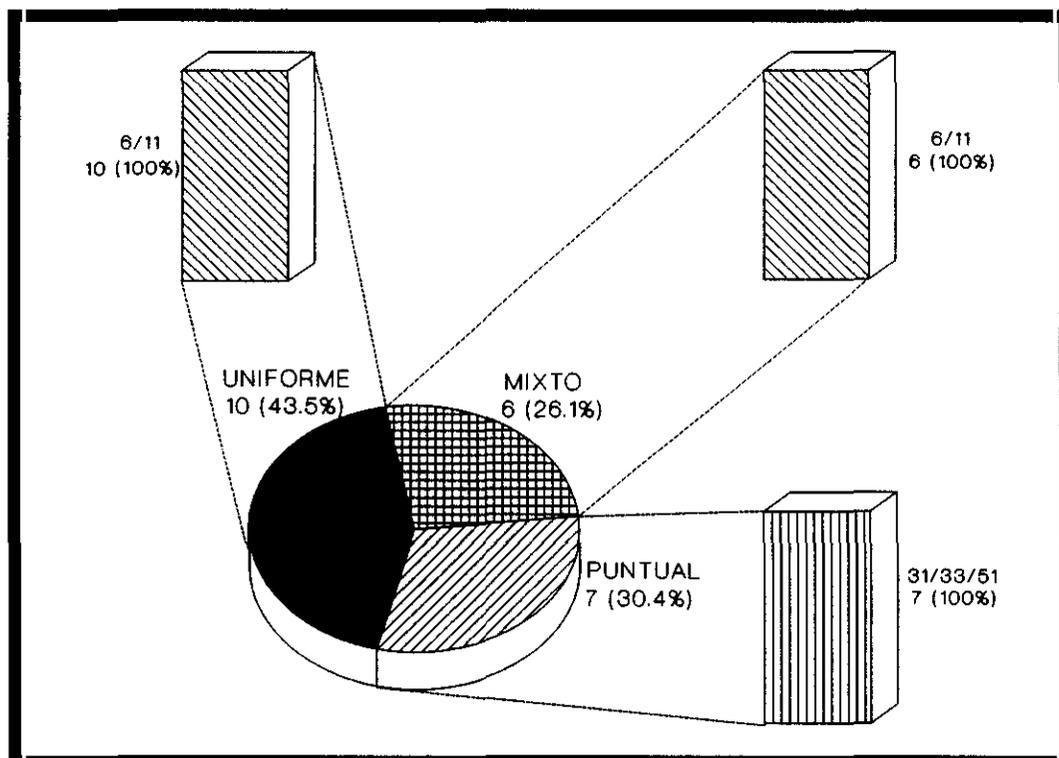


Figura IV.22. Distribución de patrones de marcaje en condilomas acuminados de cervix en relación con los tipos de HPV detectados.

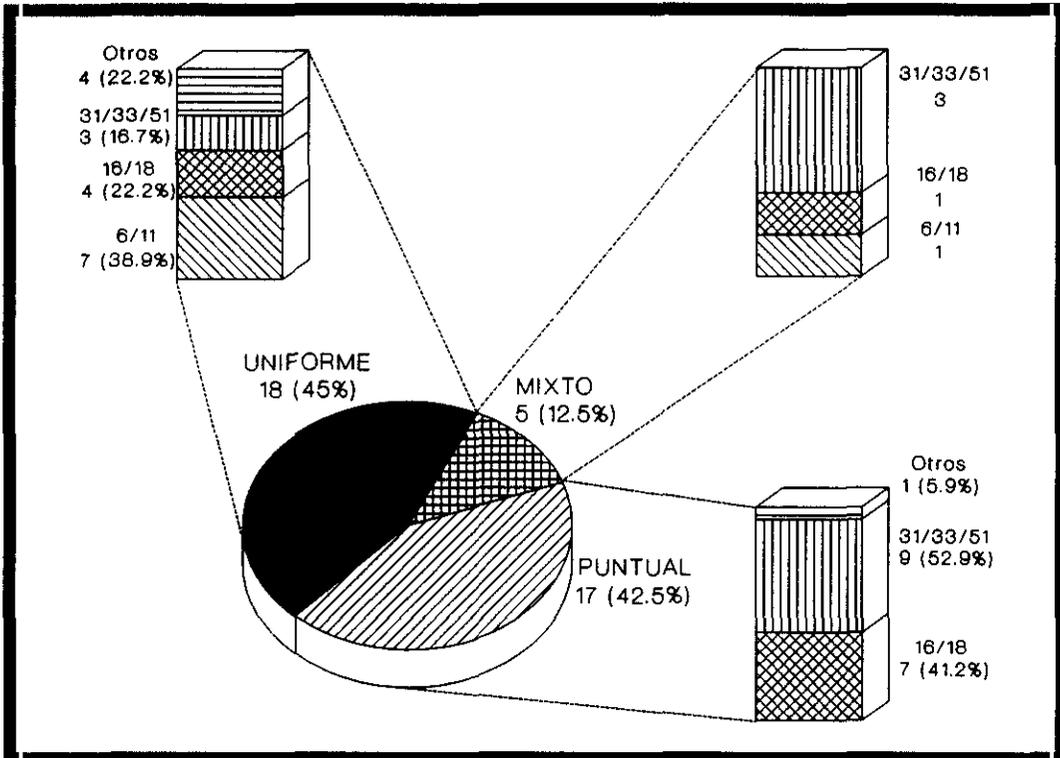


Figura IV.23. Distribución de patrones de marcaje en biopsias de cérvix diagnosticadas de LSIL en relación con los tipos de HPV detectados.

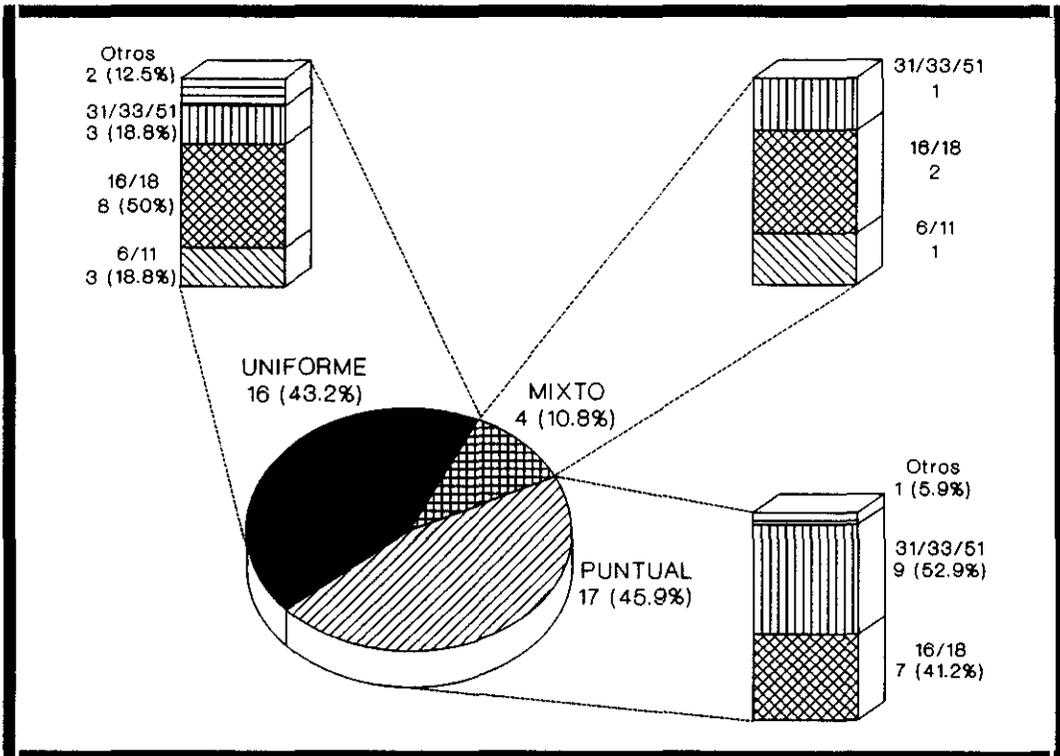


Figura IV.24. Distribución de patrones de marcaje en biopsias de cérvix diagnosticadas de HSIL en relación con los tipos de HPV detectados.

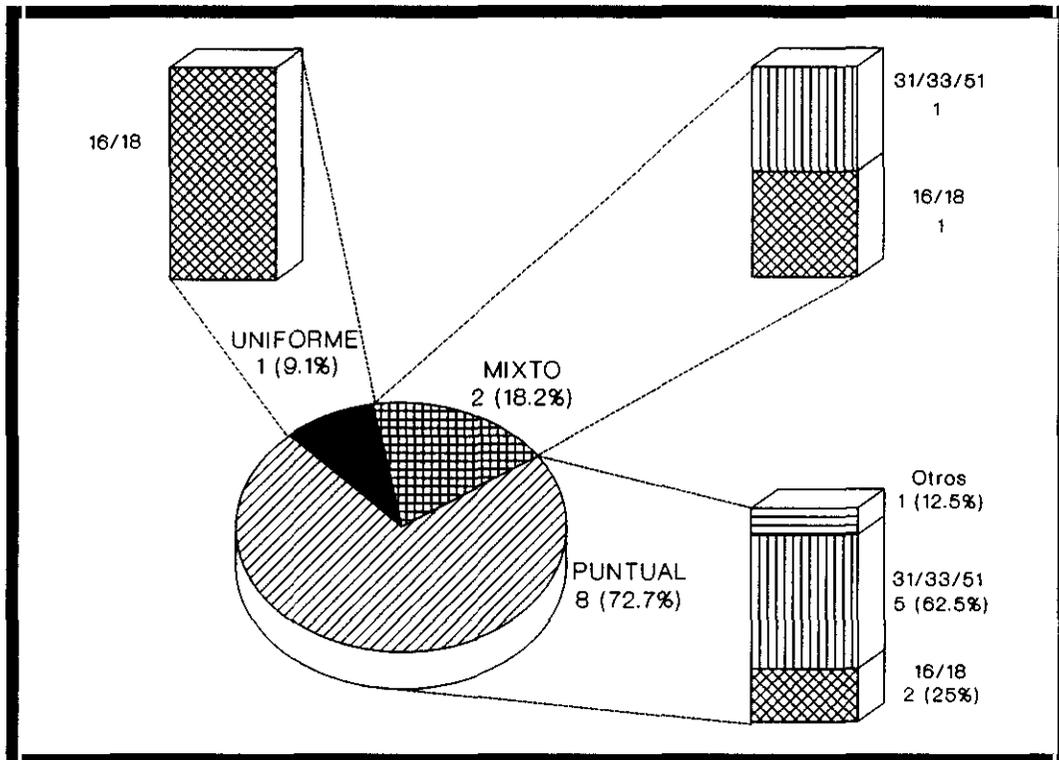


Figura IV.25. Distribución de patrones de marcaje en carcinomas de cérvix en relación con los tipos de HPV detectados.

La relación entre patrón de marcaje y tipos virales en cada lesión se ilustra en las figuras IV.22 (condilomas acuminados), IV.23 (LSIL), IV.24 (HSIL) y IV.25 (carcinomas).

Por último, en la tabla IV.XVII se detalla la relación entre el resultado obtenido con inmunohistoquímica y el patrón de marcaje.

| PATRON DE MARCAJE | INMUNOHISTOQUIMICA | |
|-------------------|--------------------|----------|
| | Positivo | Negativo |
| Uniforme | 21 | 24 |
| Puntual | 2 | 47 |
| Mixto | 3 | 14 |

Tabla IV.XVII. Clasificación de biopsias cervicales según el resultado obtenido con inmunohistoquímica y el patrón de marcaje.

IV.5.1.3. Resultados globales.

Al considerar conjuntamente los resultados obtenidos en vulva y cérvix uterino, también se encuentra diferencia significativa en la distribución de patrones de marcaje por lesiones, tanto cuando se consideran estos resultados globalmente ($p < 0.003$), como cuando se consideran las lesiones por parejas ($p < 0.02$ entre condiloma y SIL y $p < 0.03$ entre SIL y carcinomas).

Para poder estudiar tablas de contingencia de 2x2, los resultados globales se agruparon como se muestra en las tablas IV.XVIII y IV.XIX.

| PATRON DE MARCAJE | LESION | | |
|-------------------|-----------|---------|-----------|
| | Condiloma | VIN/SIL | Carcinoma |
| Puntual | 8 | 36 | 11 |
| Uniforme + Mixto | 37 | 46 | 3 |

Tabla IV.XVIII. Clasificación conjunta de biopsias de vulva y cérvix uterino HPV-positivas según el tipo puntual de patrón de marcaje y la lesión diagnosticada.

| PATRON DE MARCAJE | LESION | | |
|-------------------|-----------|---------|-----------|
| | Condiloma | VIN/SIL | Carcinoma |
| Puntual + Mixto | 15 | 45 | 13 |
| Uniforme | 30 | 37 | 1 |

Tabla IV.XIX. Clasificación conjunta de biopsias de vulva y cérvix uterino HPV-positivas según el tipo uniforme de patrón de marcaje y la lesión diagnosticada.

Del análisis global de la tabla IV.XVIII se deduce una diferencia estadística significativa entre los patrones de marcaje observados en las distintas lesiones ($p < 10^{-4}$). Considerando las lesiones por parejas se obtienen los siguientes resultados:

1. VIN-SIL/Condiloma acuminado:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.004$).
- Razón de ventaja de riesgo: 3.62
Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $1.40 < 3.62 < 9.64$

2. Carcinoma/VIN-SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$).
- Razón de ventaja de riesgo: 4.69
Límites exactos de confianza al 95%: $1.11 < 4.69 < 27.66$
- Riesgo relativo: 3.82
Intervalo de confianza al 95% (series de Taylor): $1.14 < 3.82 < 12.85$

El análisis global de la tabla IV.XIX señala igualmente una diferencia significativa entre los patrones de marcaje observados en los distintos tipos de lesión ($p < 0.0004$). Por parejas se obtienen los siguientes resultados:

1. VIN-SIL/Condiloma acuminado:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.03$).
- Razón de ventaja de riesgo: 2.43
Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $1.07 < 2.43 < 5.68$

2. Carcinoma/VIN-SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.008$).
- Razón de ventaja de riesgo: 10.69
Límites exactos de confianza al 95%: $1.45 < 10.69 < 466.27$
- Riesgo relativo: 8.52
Intervalo de confianza al 95% (series de Taylor): $1.16 < 8.52 < 62.46$

IV.5.2. PATRON DE DISTRIBUCION DE LAS CELULAS POSITIVAS.

Se han considerado dos patrones de distribución de células positivas a lo largo del epitelio:

1. **Multifocal:** se observan grupos de células positivas alternando con zonas de epitelio en las que no aparecen células marcadas (fig. IV.26).
2. **Aislado:** se observan pocas células positivas y aisladas unas de otras (fig. IV.27).

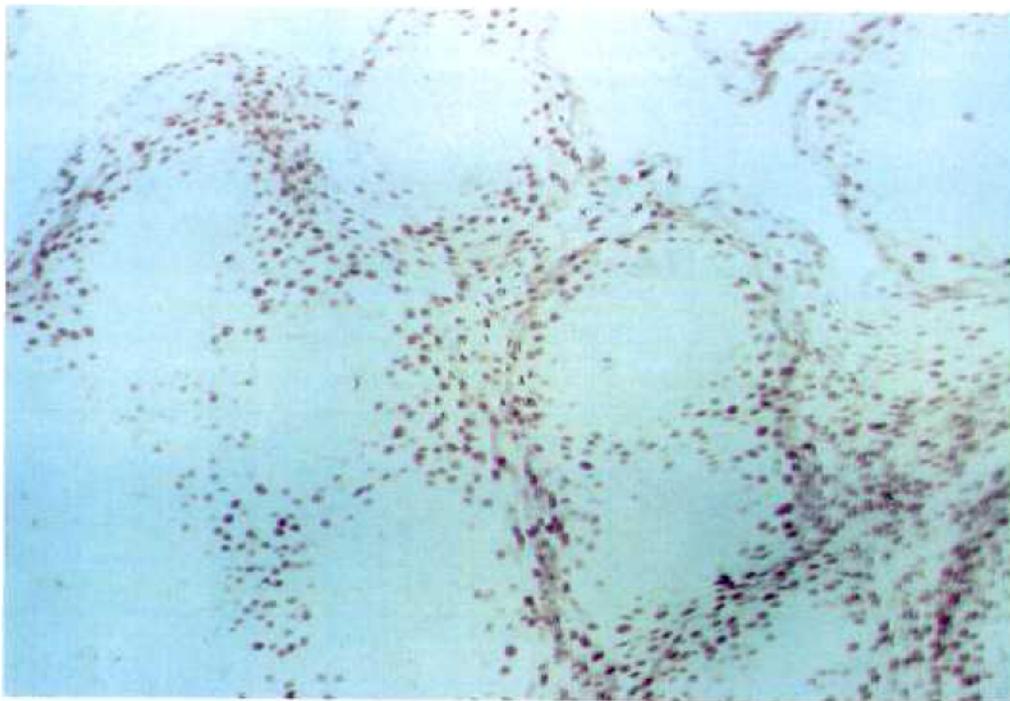


Figura IV.26. Patrón de distribución multifocal de células positivas por hibridación *in situ* en un condiloma de vulva positivo para los tipos 6/11 de HPV. (x 100).

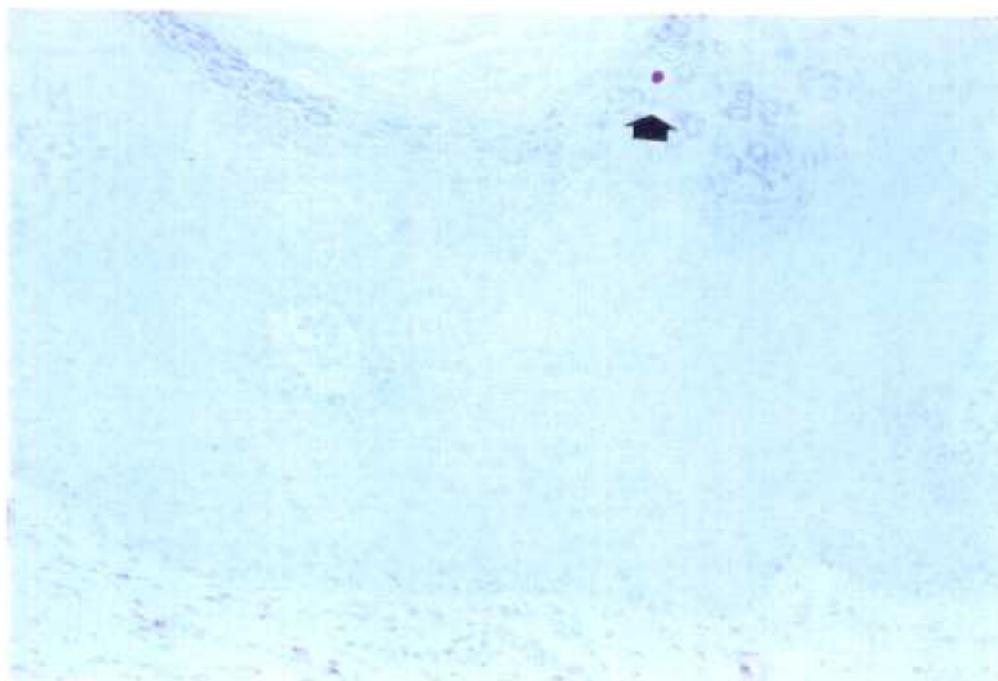


Figura IV.27. Condiloma acuminado de vulva positivo para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ* con patrón de distribución aislado. Se observa sólo una célula claramente positiva (flecha). (x 160).

IV.5.2.1. Biopsias de vulva.

En las tablas IV.XX y IV.XXI se muestra la clasificación de las piezas de vulva según este parámetro histológico, en relación con las lesiones diagnosticadas y los tipos de HPV detectados. En la figura IV.28 se ilustra la relación existente entre el patrón de distribución y los tipos virales detectados en condilomas acuminados de vulva.

| PATRON DE DISTRIBUCION | LESION | | | |
|------------------------|-----------|-------|--------|-----------|
| | Condiloma | VIN I | VIN II | Carcinoma |
| Multifocal | 14 | 2 | 1 | --- |
| Aislado | 8 | --- | 2 | 3 |

Tabla IV.XX. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de distribución observado y la lesión diagnosticada.

| PATRON DE DISTRIBUCION | TIPO VIRAL | | | |
|------------------------|------------|-------|----------|-------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| Multifocal | 15 | --- | 1 | 1 |
| Aislado | 7 | 1 | 3 | 2 |

Tabla IV.XXI. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de distribución observado y el tipo viral detectado.

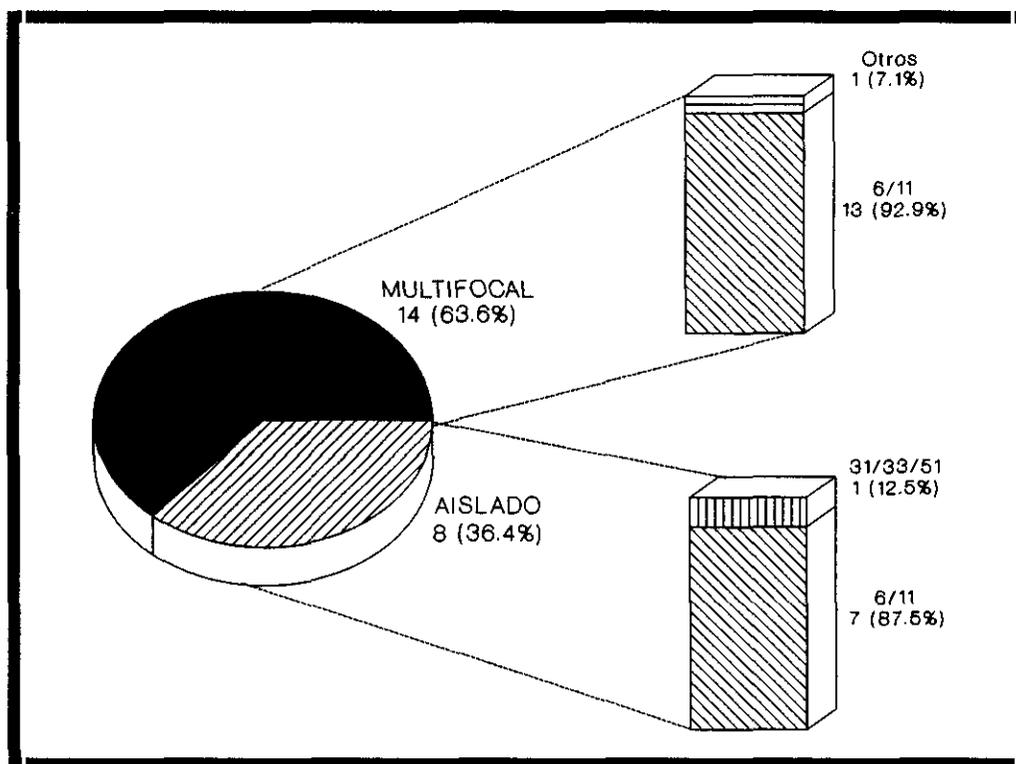


Figura IV.28. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado en condilomas acuminados de vulva.

IV.5.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

La clasificación de las biopsias cervicales según las lesiones diagnosticadas y los tipos virales detectados, en relación con los dos patrones de distribución de células positivas por hibridación *in situ*, se representa gráficamente en las figuras IV.29 y IV.30.

La prueba de χ^2 aplicada globalmente a los datos de la figura IV.29 indica que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en cada tipo de lesión; sin embargo, cuando este test estadístico se aplica a los resultados obtenidos en condilomas acuminados y SIL, las diferencias halladas entre los porcentajes para cada patrón de distribución sí son significativas ($p < 0.02$; razón de ventaja de riesgo: 3.25). También son significativas estas diferencias cuando se consideran conjuntamente los resultados obtenidos en vulva y cérvix uterino, tanto globalmente ($p < 0.005$), como entre condilomas y SIL ($p < 0.003$; razón de ventaja de riesgo: 3.42); sin embargo, no hay diferencia significativa entre SIL y carcinomas.

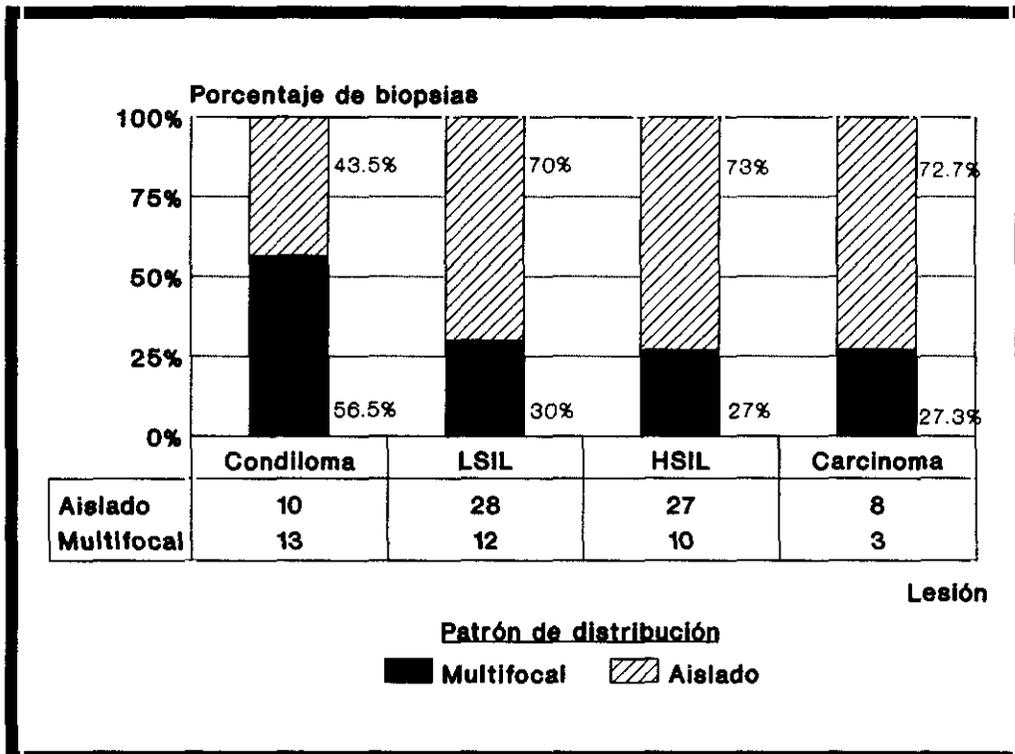


Figura IV.29. Clasificación de biopsias cervicales según la lesión diagnosticada y el patrón de distribución de células positivas por hibridación *in situ*.

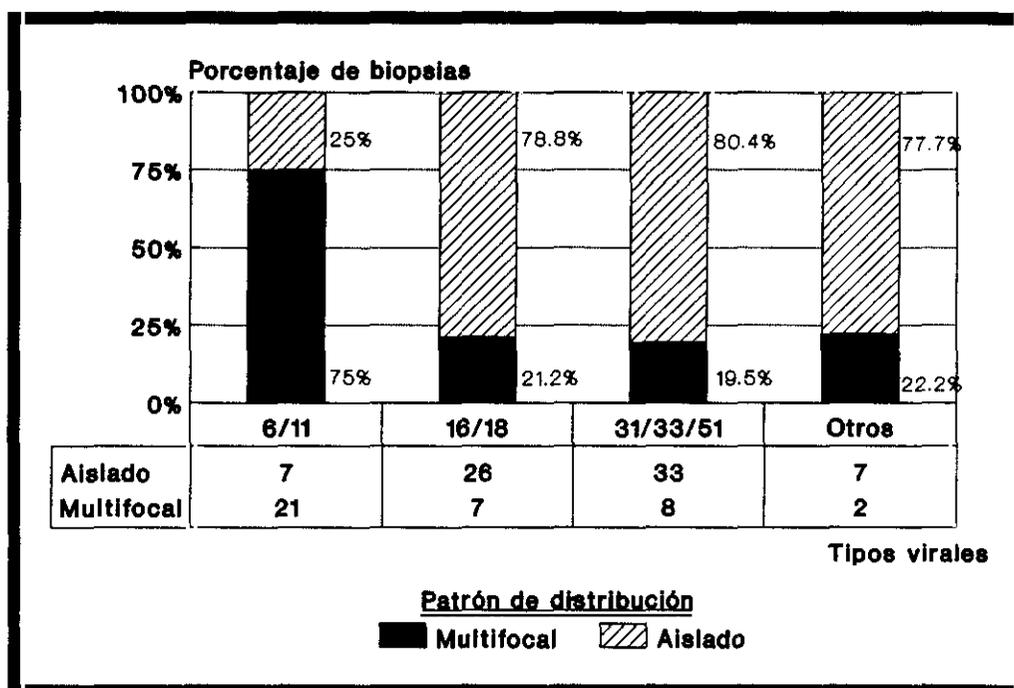


Figura IV.30. Clasificación de biopsias de cérvix según los tipos virales detectados y el patrón de distribución de células positivas por HIS.

Por lo que respecta a los datos representados en la figura IV.30, hay una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos cuando se consideran globalmente ($p < 4 \times 10^{-6}$); esta diferencia es también significativa cuando se consideran sólo las biopsias positivas para los tipos de HPV 6/11 y 16/18 ($p < 9 \times 10^{-5}$) ó 6/11 y 31/33/51 ($p < 2 \times 10^{-5}$). No hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en biopsias positivas para los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

La relación entre ambos patrones de distribución de células positivas y los tipos virales detectados en cada lesión se detallan en las figuras IV.31 (condilomas acuminados), IV.32 (LSIL), IV.33 (HSIL) y IV.34 (carcinomas).

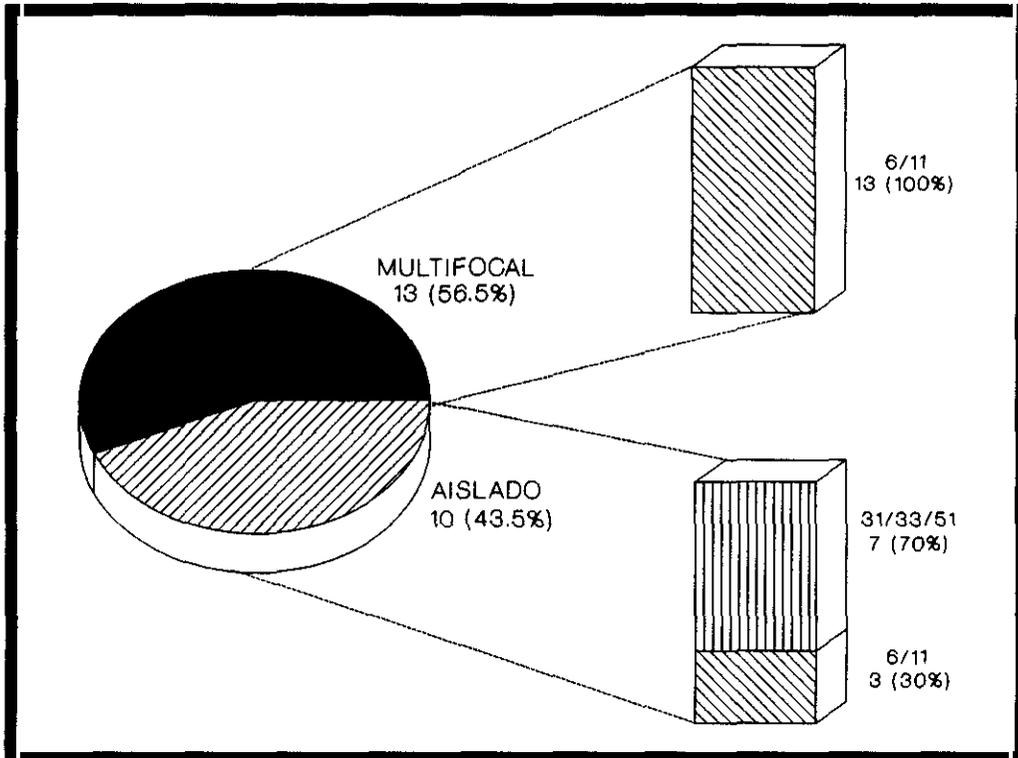


Figura IV.31. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en condilomas acuminados de cérvix.

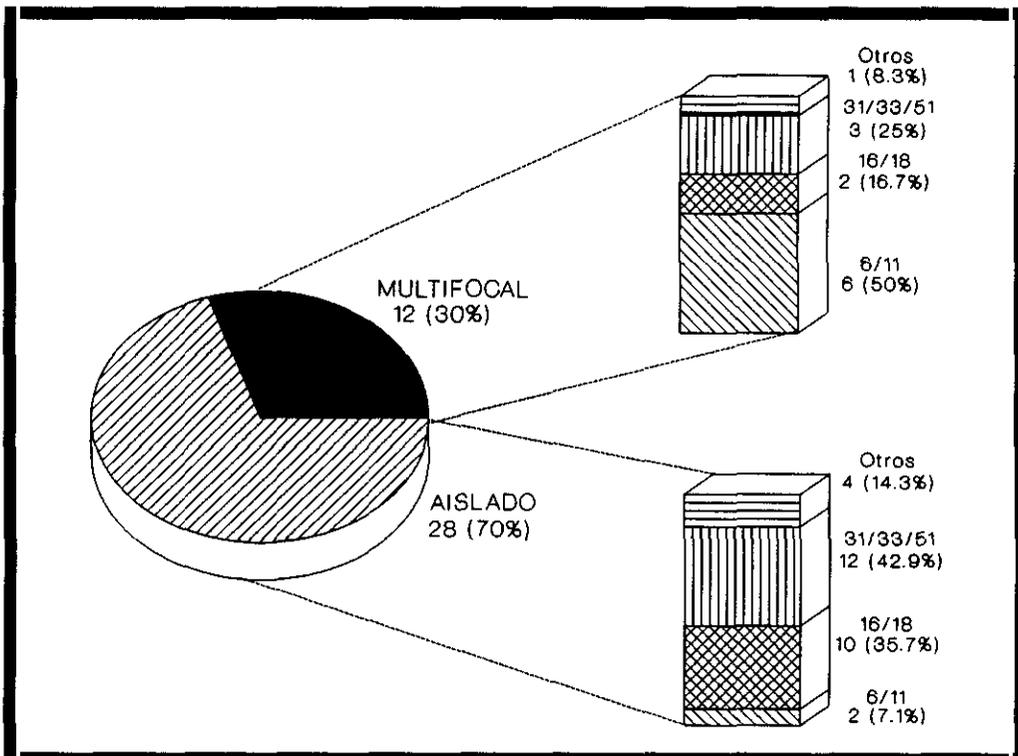


Figura IV.32. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en lesiones de cérvix diagnosticadas de LSIL.

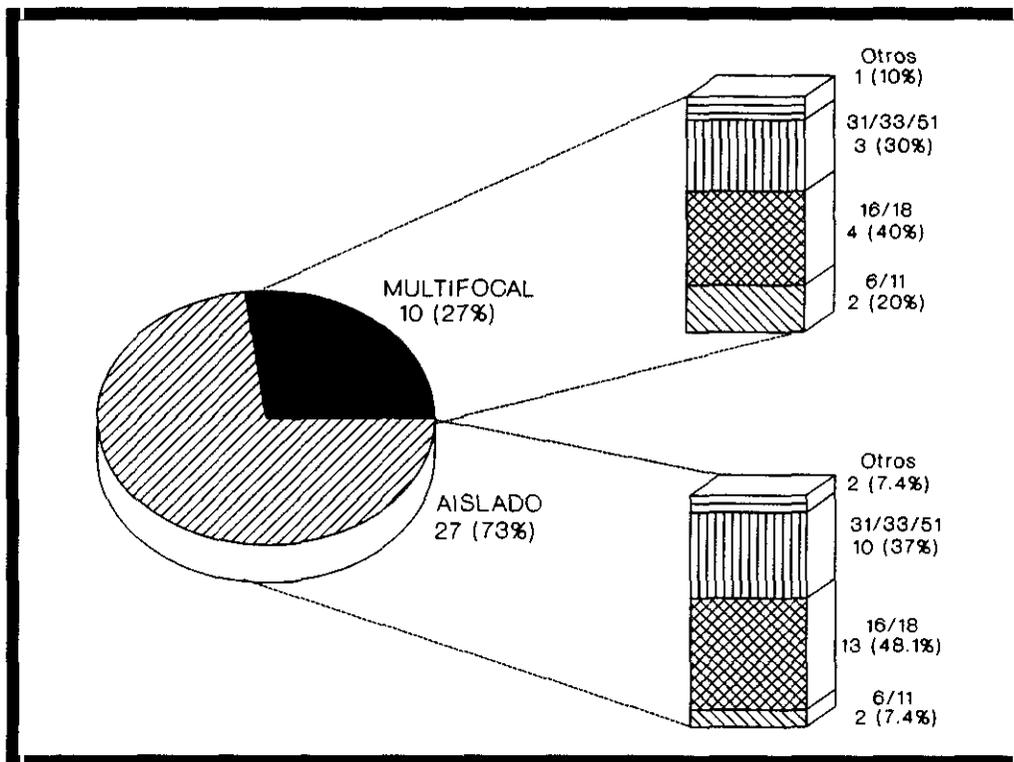


Figura IV.33. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en biopsias de cérvix diagnosticadas de HSIL.

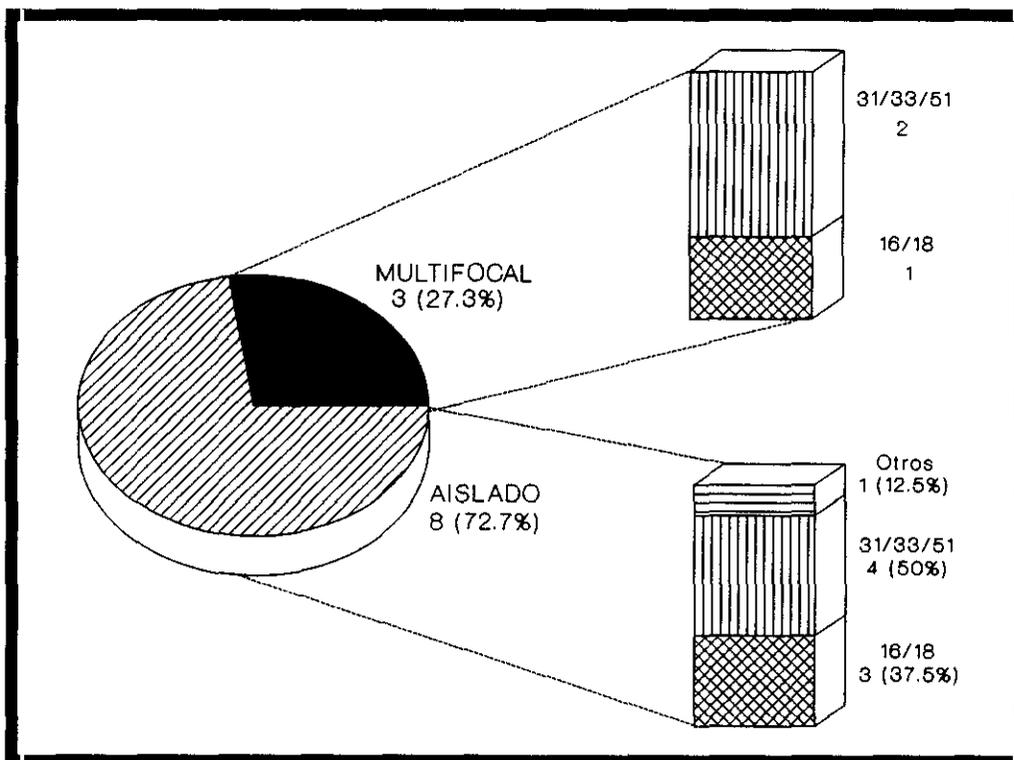


Figura IV.34. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en carcinomas de cérvix.

Para finalizar, en la tabla IV.XXII se muestra la relación entre los resultados inmunohistoquímicos y el patrón de distribución.

| PATRON DE DISTRIBUCION | INMUNOHISTOQUIMICA | |
|------------------------|--------------------|----------|
| | Positivo | Negativo |
| Multifocal | 21 | 17 |
| Aislado | 5 | 68 |

Tabla IV.XXII. Clasificación de biopsias cervicales según los resultados inmunohistoquímicos y el patrón de distribución.

IV.5.3. POSICION RELATIVA DE LAS CELULAS POSITIVAS EN EL GROSOR DEL EPITELIO.

Las biopsias HPV-positivas por hibridación *in situ* se dividieron en tres grupos dependiendo de la altura del epitelio en la que aparecen células marcadas:

1. Superior: sólo aparecen células positivas en el tercio superior del epitelio (fig. IV.35).
2. Medio: se observan células positivas en los tercios superior y medio del epitelio (fig. IV.36).
3. Inferior: se observan células positivas en los tres tercios del epitelio, incluyendo en ocasiones las capas de células basales y parabasales (fig. IV.37).

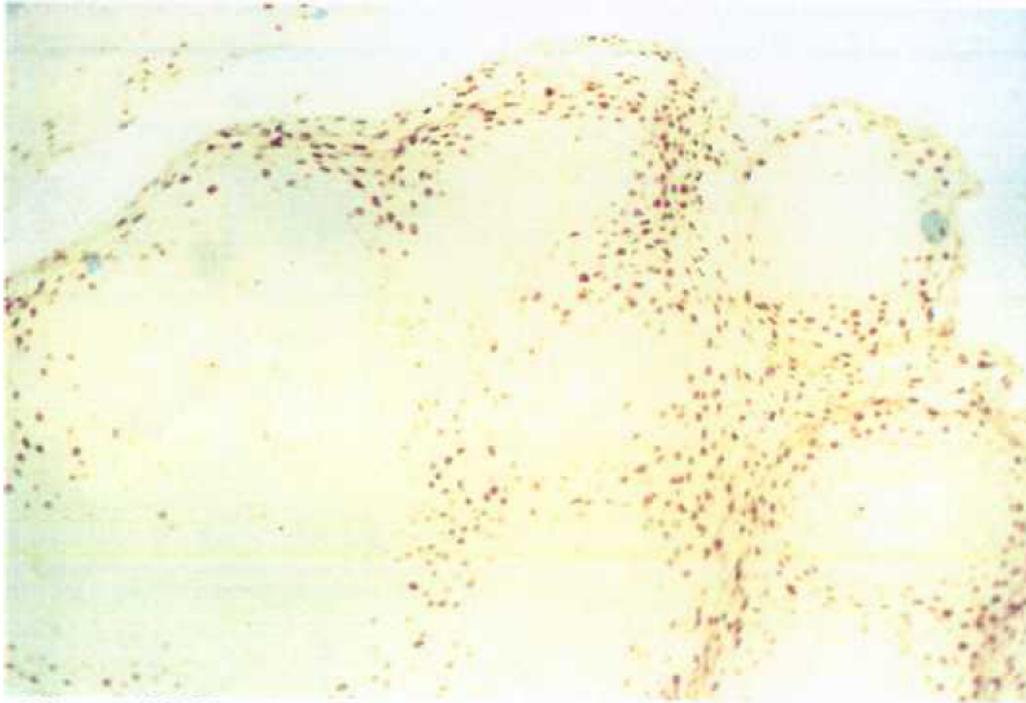


Figura IV.35. Corte transversal de un condiloma acuminado de vulva positivo para los tipos 6/11 de HPV. La reacción positiva se aprecia en células del tercio superior del epitelio. (x 100).

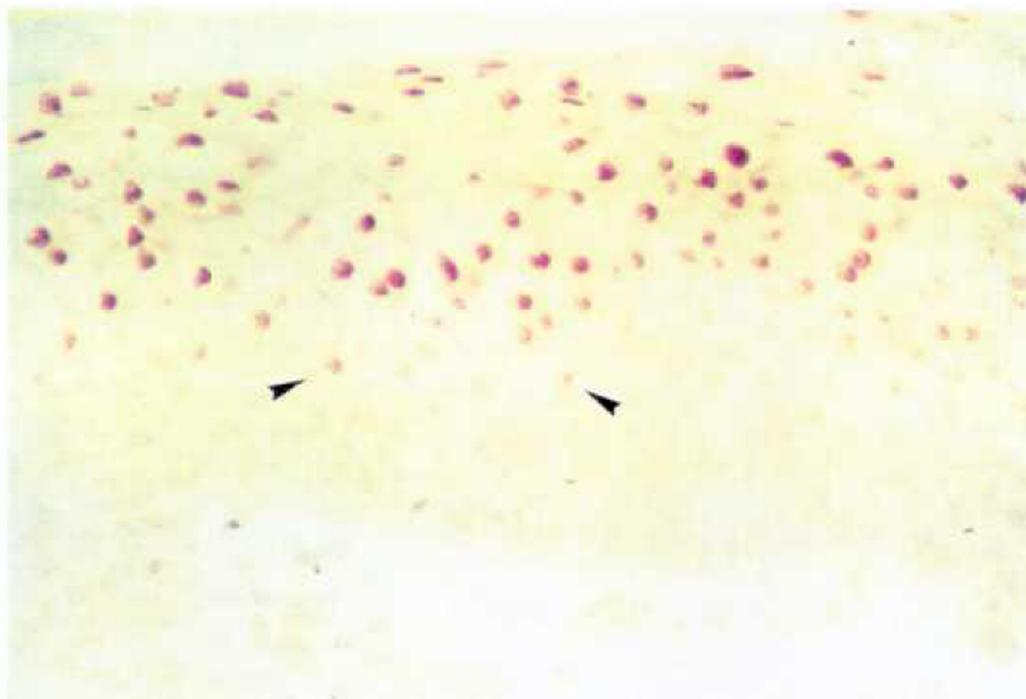


Figura IV.36. Biopsia cervical positiva para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ*. Se observan células marcadas en el tercio medio del epitelio (flecha). (x 320)

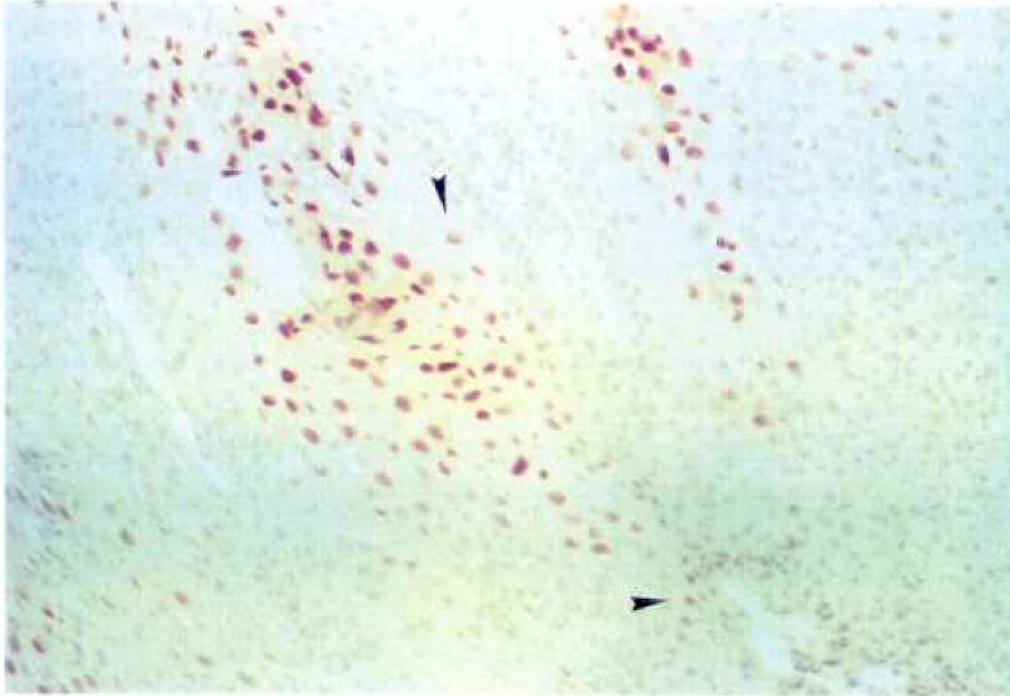


Figura IV.37. Reacción positiva para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ*. Obsérvese la presencia de células marcadas en el tercio inferior del epitelio (flechas). (x 200).

A diferencia de los patrones de marcaje y distribución de células positivas, en este caso no se han considerado las biopsias diagnosticadas de carcinoma, ya que al perderse la arquitectura del tejido no es posible distinguir la posición relativa de las células marcadas en el grosor del epitelio. En consecuencia el número total de biopsias consideradas ha sido de 127: 100 de cérvix y 27 de vulva.

IV.5.3.1. Biopsias de vulva.

La clasificación de las biopsias de vulva según esta característica en relación con las lesiones diagnosticadas y los tipos virales detectados se especifica en las tablas IV.XXIII y IV.XXIV, respectivamente.

| TERCIO DE EPITELIO | LESION | | |
|--------------------|-----------|-------|--------|
| | Condiloma | VIN I | VIN II |
| Superior | 3 | --- | 1 |
| Medio | 17 | 2 | 2 |
| Inferior | 2 | --- | --- |

Tabla IV.XXIII. Clasificación de las biopsias de vulva según la posición relativa en el grosor del epitelio de las células positivas por hibridación *in situ*.

| TERCIO DE EPITELIO | TIPO VIRAL | | | |
|--------------------|------------|-------|----------|-------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| Superior | 2 | --- | 1 | 1 |
| Medio | 18 | 1 | 2 | --- |
| Inferior | 2 | --- | --- | --- |

Tabla IV.XXIV. Relación entre el tipo viral y la posición relativa en el grosor del epitelio de las células positivas por hibridación *in situ* en biopsias de vulva.

IV.5.3.2. Biopsias de cérvix uterino.

La clasificación de las biopsias cervicales por lesiones y por tipos virales, en relación con la posición relativa ocupada por las células positivas por hibridación *in situ* en el grosor del epitelio se especifica en las figuras IV.38 y IV.39.

El análisis estadístico de las correspondientes tablas de contingencia demuestra la independencia entre las variables estudiadas. Es decir, no existe una asociación significativa entre la posición relativa en el grosor del epitelio de las células positivas por hibridación *in situ* y el tipo de lesión o el tipo de HPV detectado.

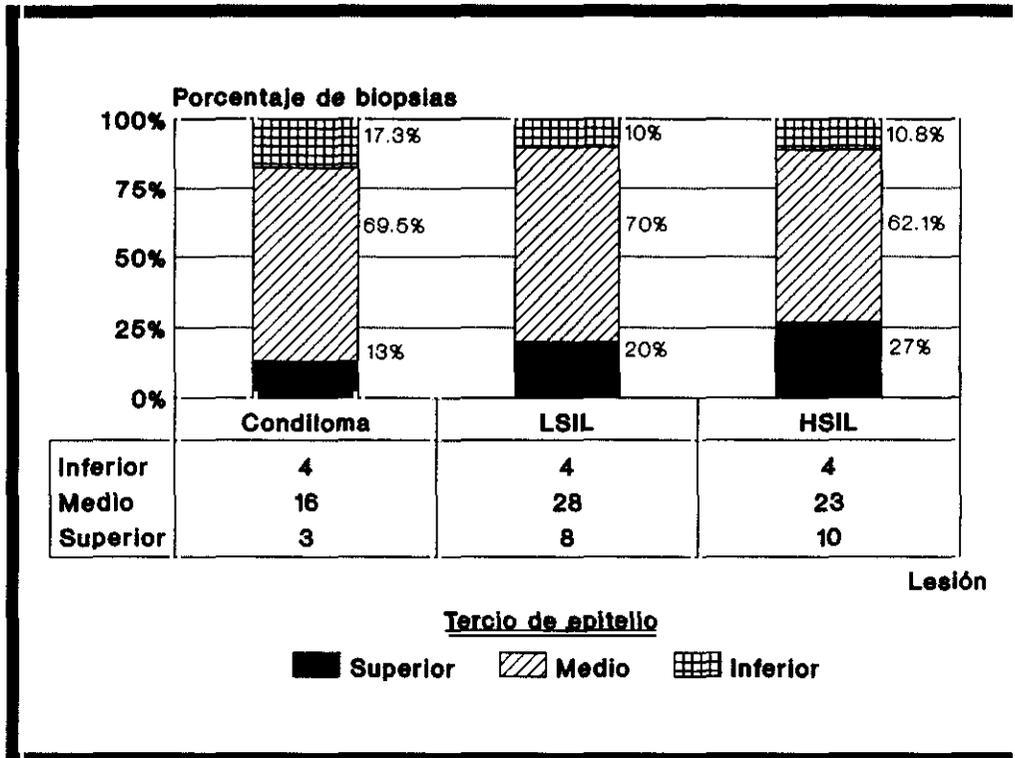


Figura IV.38. Clasificación de biopsias cervicales según la posición relativa de las células positivas por hibridación *in situ* en el grosor del epitelio.

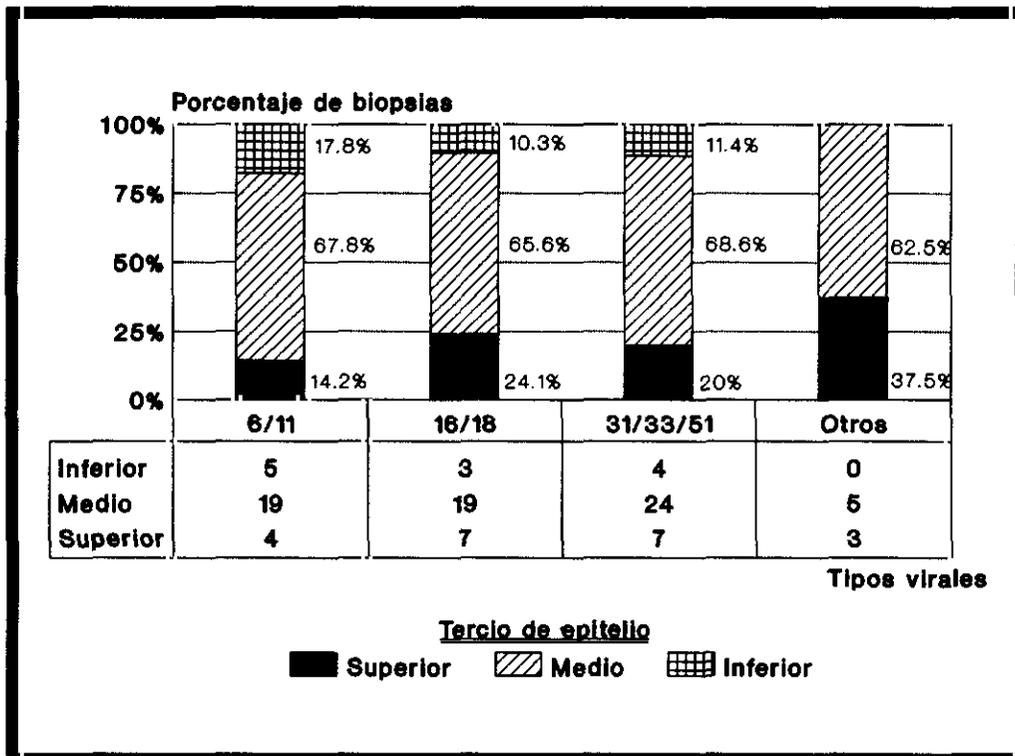


Figura IV.39. Relación entre el tipo viral y la posición relativa de las células positivas por hibridación *in situ* en el grosor del epitelio en biopsias cervicales.

IV.5.4. RELACION ENTRE EL PATRON DE MARCAJE Y EL PATRON DE DISTRIBUCION.

En las tablas IV.XXV y IV.XXVI se detalla la clasificación de biopsias de cérvix HPV-positivas por hibridación *in situ*, en relación con el patrón de marcaje, el patrón de distribución de células positivas y el tipo de lesión diagnosticado o el tipo de HPV detectado, respectivamente. El análisis estadístico global de ambas tablas indica que hay una diferencia significativa en los resultados obtenidos por cada tipo de lesión ($p < 0.04$) y por cada grupo de virus ($p < 10^{-6}$). Sin embargo, cuando el análisis se realiza comparando las lesiones y los grupos virales por parejas no se observa una diferencia significativa entre LSIL y HSIL ni entre los tipos virales 16/18 y 31/33/51.

| PATRON DE MARCAJE | PATRON DE DISTRIBUCION | LESION | | | |
|-------------------|------------------------|-----------|------|------|-----------|
| | | CONDILOMA | LSIL | HSIL | CARCINOMA |
| UNIFORME | MULTIFOCAL | 9 | 10 | 6 | --- |
| | AISLADO | 1 | 8 | 10 | 1 |
| PUNTUAL | MUTIFOCAL | --- | 2 | 3 | 1 |
| | AISLADO | 7 | 15 | 14 | 7 |
| MIXTO | MULTIFOCAL | 4 | --- | 1 | 2 |
| | AISLADO | 2 | 5 | 3 | --- |

Tabla IV.XXV. Clasificación de biopsias de cérvix HPV-positivas por hibridación *in situ* según la lesión diagnosticada y los patrones de marcaje y distribución.

| PATRON DE MARCAJE | PATRON DE DISTRIBUCION | TIPO VIRAL | | | |
|-------------------|------------------------|------------|-------|----------|-------|
| | | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| UNIFORME | MULTIFOCAL | 16 | 4 | 3 | 2 |
| | AISLADO | 4 | 9 | 3 | 4 |
| PUNTUAL | MULTIFOCAL | --- | 2 | 4 | --- |
| | AISLADO | --- | 14 | 26 | 3 |
| MIXTO | MULTIFOCAL | 5 | 1 | 1 | --- |
| | AISLADO | 3 | 3 | 4 | --- |

Tabla IV.XXVI. Clasificación de biopsias de cérvix HPV-positivas por hibridación *in situ* según el tipo viral detectado y los patrones de marcaje y distribución.

| PATRONES DE MARCAJE Y DISTRIBUCION | LESION | | |
|------------------------------------|-----------|---------|-----------|
| | CONDILOMA | VIN/SIL | CARCINOMA |
| PUNTUAL/AISLADO | 8 | 31 | 10 |
| RESTO | 37 | 51 | 4 |

Tabla IV.XXVII. Distribución de biopsias de vulva y cérvix positivas por hibridación *in situ* según la lesión diagnosticada y los patrones de marcaje y distribución.

Para poder estudiar tablas de contingencia de 2x2, se consideraron globalmente los resultados de vulva y cérvix y se agruparon como se muestra en la tabla IV.XXVII. El análisis global de esta tabla arroja una diferencia estadísticamente significativa ($p < 8 \times 10^{-4}$). Al considerar las lesiones por parejas se obtuvieron los siguientes resultados:

1. VIN-SIL/Condiloma:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$).
- Razón de ventaja de riesgo: 2.81
- Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $1.08 < 2.81 < 7.5$

2. Carcinoma/VIN-SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$).
- Razón de ventaja de riesgo: 4.11
Límites exactos de confianza al 95%: $1.06 < 4.11 < 19.25$
- Riesgo relativo: 3.35
Intervalo de confianza al 95% (series de Taylor): $1.13 < 3.35 < 9.94$

IV.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS.

Para la realización de estudios comparativos se han tenido en cuenta sólo los resultados obtenidos en biopsias con una longitud de epitelio superior a 5 mm, para minimizar en lo posible el sesgo en los cálculos estadísticos debido a falsos negativos por tamaño inadecuado de la pieza. Se han incluido también los casos diagnosticados de carcinoma, pues todos ellos tenían un tamaño suficientemente representativo. Por lo tanto, el número total de biopsias incluidas en estos estudios ha sido de 168: 130 de cérvix y 38 de vulva.

IV.6.1. COMPARACION ENTRE INMUNOHISTOQUIMICA E HIBRIDACION *IN SITU*.

De las 168 biopsias consideradas, 138 fueron positivas para HPV con la técnica de HIS-detección (82.1%), mientras que sólo 49 dieron un resultado positivo con la técnica de inmunohistoquímica (29.2%). Ninguna biopsia fue positiva por inmunohistoquímica y negativa por hibridación *in situ*.

La distribución de casos positivos por cada técnica en piezas de vulva y

cérvix por separado, agrupados según las lesiones diagnosticadas, se detalla en las tablas IV.XXVIII y IV.XXIX. En ellas se incluye, además, la sensibilidad de la inmunohistoquímica frente a la hibridación *in situ* en cada tipo de lesión. En ambos casos las diferencias entre los resultados obtenidos con ambas técnicas son estadísticamente significativas ($p < 0.006$ en piezas de vulva y $p < 10^{-6}$ en piezas de cérvix uterino).

| TECNICA | LESION | | | | Total (n=38) |
|----------------------|---------------------|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | Condiloma (n=29) | VIN I (n=3) | VIN II (n=3) | Carcinoma (n=3) | |
| IHQ + ¹ | 18 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| HIS + ² | 25 | 2 | 3 | 3 | 33 |
| IHQ/HIS ³ | 72% | --- | --- | --- | 63.6% |

¹ Número de biopsias positivas por inmunohistoquímica.

² Número de biopsias positivas por hibridación *in situ*.

³ Sensibilidad de la inmunohistoquímica respecto de la hibridación *in situ*.

Tabla IV.XXVIII. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva, con expresión de la sensibilidad de una técnica con respecto de otra.

| TECNICA | LESION | | | | Total (n=130) |
|----------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------------|------------------|
| | Condiloma (n=23) | LSIL (n=57) | HSIL (n=38) | Carcinoma (n=12) | |
| IHQ + ¹ | 14 | 10 | 4 | --- | 28 |
| HIS + ² | 22 | 39 | 33 | 11 | 105 |
| IHQ/HIS ³ | 63.6% | 25.6% | 12.1% | --- | 26.7% |

¹ Número de biopsias positivas por inmunohistoquímica.

² Número de biopsias positivas por hibridación *in situ*.

³ Sensibilidad de la inmunohistoquímica respecto de la hibridación *in situ*.

Tabla IV.XXIX. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix, con expresión de la sensibilidad de una técnica respecto de la otra.

Si consideramos cada técnica por separado, el análisis de la tabla IV.XXIX muestra una diferencia significativa entre los resultados obtenidos en cada lesión, tanto con inmunohistoquímica ($p < 5 \times 10^{-6}$), como con HIS-detección ($p < 0.02$). Sin embargo, en el caso de la hibridación *in situ*, las diferencias no son significativas si no se consideran las LSIL o si se consideran conjuntamente LSIL y HSIL.

También hay diferencia significativa entre las sensibilidades de la inmunohistoquímica con respecto a la hibridación *in situ* en las distintas lesiones cervicales ($p < 5 \times 10^{-5}$), cuando éstas se consideran globalmente. El análisis estadístico por parejas de lesiones arroja los siguientes resultados:

1. Condiloma/SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 8 \times 10^{-5}$).
- Razón de ventaja de riesgo: 7.25
Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $2.28 < 7.25 < 23.79$

2. SIL/Carcinoma:

- Diferencia estadísticamente no significativa.

En las figuras IV.40 y IV.41 se ilustran de forma comparativa los resultados porcentuales de positividad obtenidos con ambas técnicas en las distintas lesiones, según la procedencia anatómica de las biopsias.

Por lo que respecta a la sensibilidad de la inmunohistoquímica frente a la hibridación *in situ* en relación con los tipos virales detectados con esta última técnica, de las 56 biopsias positivas para los tipos 6/11 de HPV, 41 (73.2%) fueron positivas por inmunohistoquímica; de las 34 muestras positivas para los tipos 16/18 de HPV, 8 (23.5%) fueron positivas por inmunohistoquímica; finalmente, de las 52 piezas positivas para los tipos 31/33/51 de HPV, 8 (15.4%) fueron positivas por inmunohistoquímica. Estas diferencias de sensibilidad de la inmunohistoquímica en relación con los tipos virales detectados por HIS-tipado son estadísticamente significativas ($p < 10^{-6}$) cuando se consideran globalmente, pero no lo son cuando se consideran sólo los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

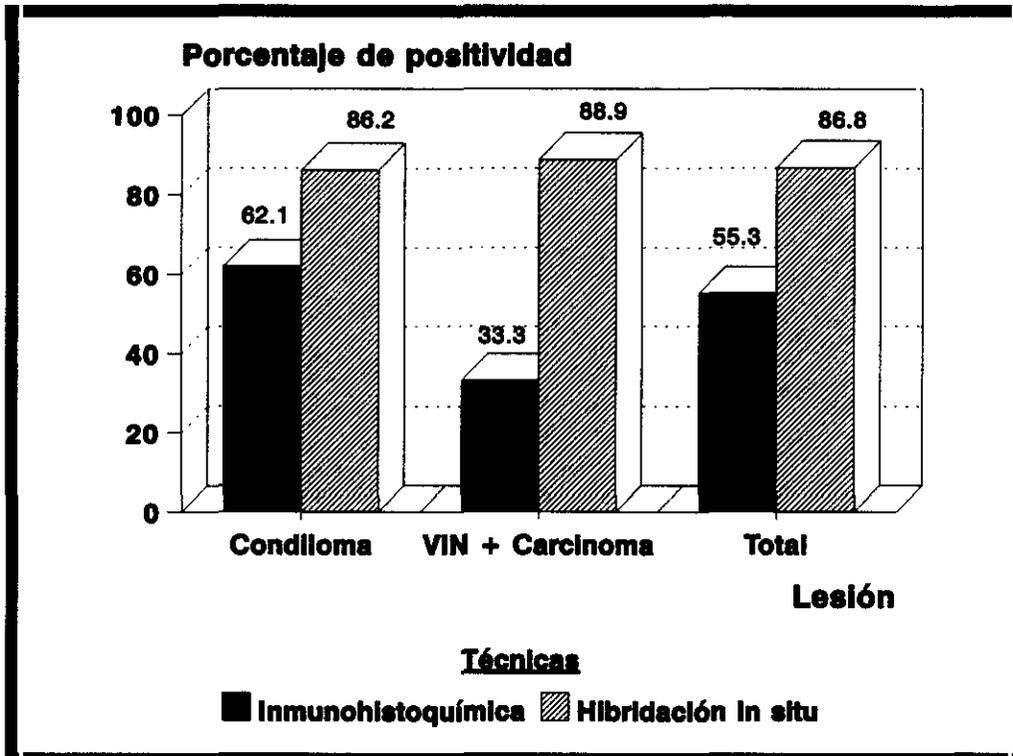


Figura IV.40. Resultados porcentuales de positividad con inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva.

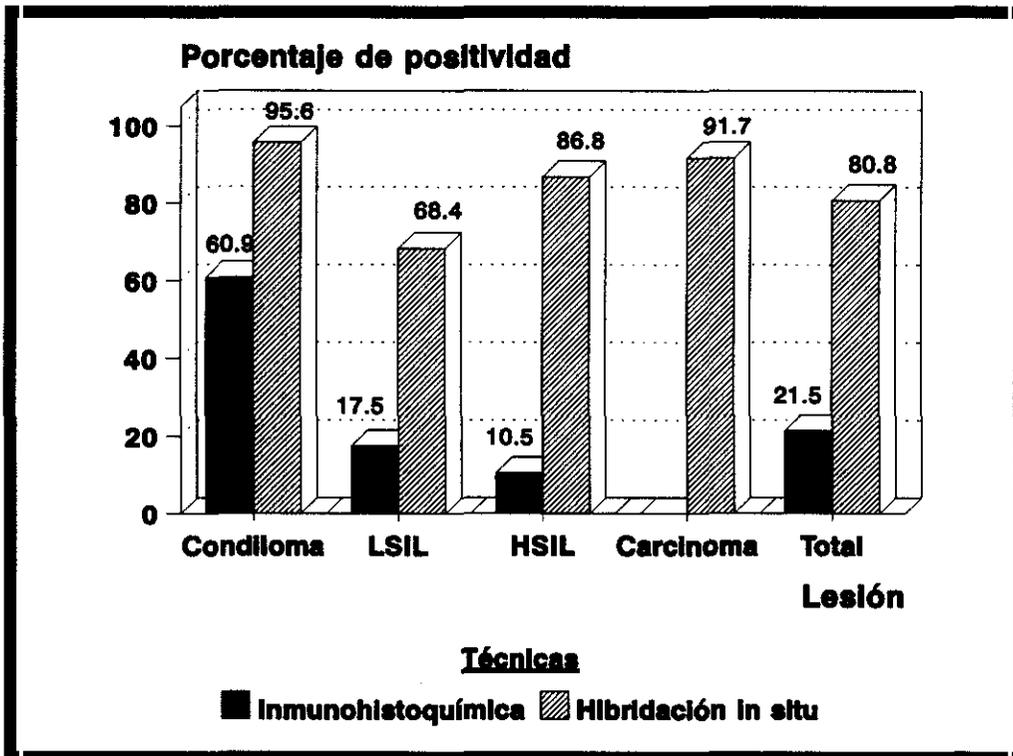


Figura IV.41. Resultados porcentuales de positividad con inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix.

Hay también una clara diferencia entre ambas técnicas cuando se comparan las reacciones positivas obtenidas sobre una misma pieza, ya que el número de células positivas por hibridación *in situ* es en todos los casos mucho mayor que el de células positivas por inmunohistoquímica (fig.42).

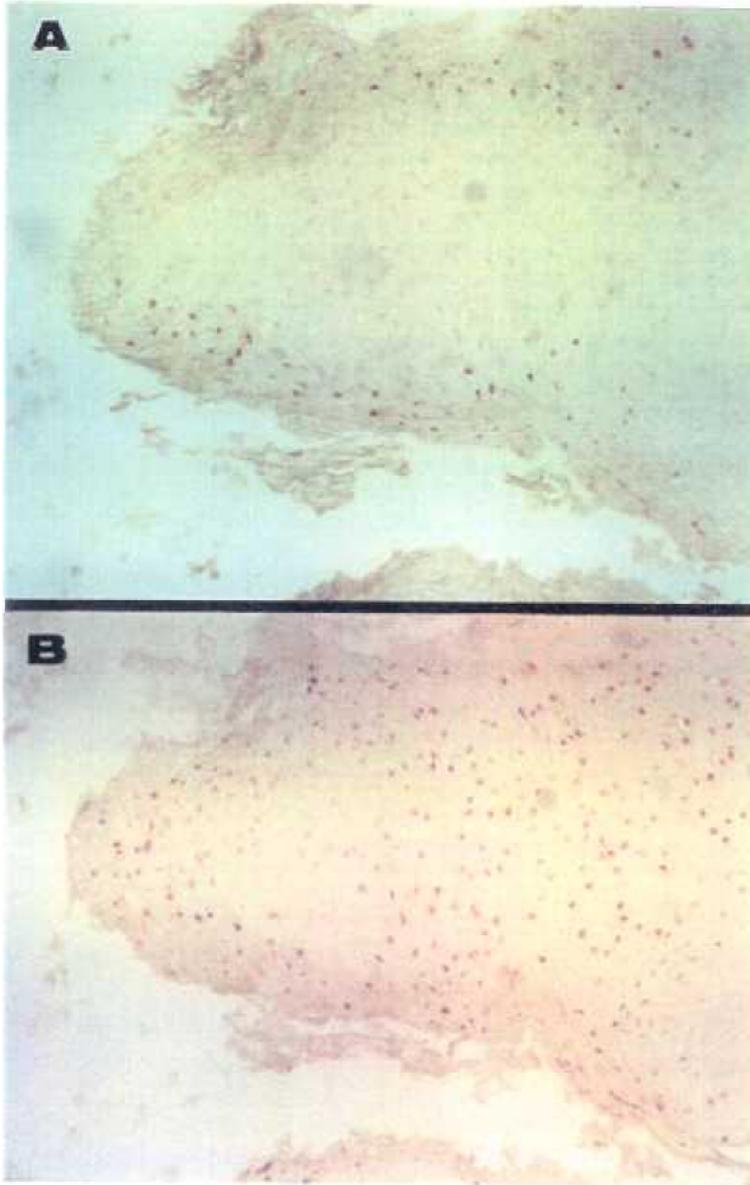


Figura IV.42. Comparación de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para HPV en un condiloma acuminado de vulva.

A) Reacción positiva con inmunohistoquímica que afecta exclusivamente a células coilocíticas del tercio superior del epitelio.

B) Reacción positiva para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ*. El número de células positivas es muy superior al detectado con inmunohistoquímica.

IV.6.2. COMPARACION ENTRE BIOPSIAS COMPATIBLES Y NO COMPATIBLES HISTOPATOLOGICAMENTE CON INFECCION POR HPV.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica e HIS-detección, por lesiones, en piezas de vulva y cérvix, histopatológicamente compatibles o no compatibles con infección por HPV, se reflejan en las tablas IV.XXX y IV.XXXI. La prueba de χ^2 aplicada a los totales obtenidos en cérvix uterino indica que no hay diferencia significativa en los resultados obtenidos con hibridación *in situ* en ambos tipos de muestras; sí es, en cambio, significativa la diferencia observada en los resultados de inmunohistoquímica ($p < 0.04$).

Los resultados obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias cervicales según esta característica histológica se muestran en la tabla IV.XXXII; y en las figuras IV.43 y IV.44 se comparan los resultados obtenidos con hibridación *in situ* en relación con los patrones de marcaje y distribución de células positivas, respectivamente. Estadísticamente hay diferencia significativa ($p < 0.04$) en la distribución de los grupos de HPV estudiados en ambos tipos de muestras (compatibles y no compatibles histopatológicamente con infección por HPV), así como en los porcentajes de patrones de marcaje ($p < 0.04$). Por el contrario, no hay diferencia significativa cuando se consideran los patrones de distribución de células positivas por hibridación *in situ*.

| TECNICA | LESION | | | | | | | | | |
|---------|----------------------------|------------------------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|
| | Condiloma | | VIN I | | VIN II | | Carcinoma | | Total | |
| | HPV ¹ (n=29) | No HPV ² (---) | HPV (n=2) | No HPV (n=1) | HPV (n=2) | No HPV (n=1) | HPV (---) | No HPV (n=3) | HPV (n=33) | No HPV (n=5) |
| IHQ + | 18 (62.1%) | --- | 1 | --- | 1 | --- | --- | 1 | 20 (60.6%) | 1 |
| HIS + | 25 (86.2%) | --- | 1 | 1 | 2 | 1 | --- | 3 | 28 (84.8%) | 5 |

¹ Compatible histopatológicamente con infección por HPV.

² No compatible histopatológicamente con infección por HPV.

Tabla IV.XXX. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva según el criterio histológico de compatibilidad con infección por HPV.

| TECNICA | LESION | | | | | | | | | |
|---------|----------------------------|------------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|--------------|------------------|----------------|------------------|
| | Condiloma | | LSIL | | HSIL | | Carcinoma | | Total | |
| | HPV ¹ (n=23) | No HPV ² (---) | HPV (n=54) | No HPV (n=3) | HPV (n=34) | No HPV (n=4) | HPV (---) | No HPV (n=12) | HPV (n=111) | No HPV (n=19) |
| IHQ + | 14 (60.8%) | --- | 10 (18.5%) | --- | 4 (11.7%) | --- | --- | --- | 28 (36.9%) | --- |
| HIS + | 22 (95.6%) | --- | 37 (68.5%) | 2 | 30 (88.2%) | 3 | --- | 11 (91.7%) | 89 (80.1%) | 16 (84.2%) |

¹ Compatible histopatológicamente con infección por HPV.

² No compatible histopatológicamente con infección por HPV.

Tabla IV.XXXI. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix según el criterio histológico de compatibilidad con infección por HPV.

| COMPATIBILIDAD CON INFECCION POR HPV | TIPO VIRAL | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| Compatible (n=89) | 31 (34.8%) | 26 (29.2%) | 36 (40.4%) | 6 (6.7%) |
| No compatible (n=16) | --- | 5 (31.2%) | 10 (62.5%) | 2 (12.5%) |

Tabla IV.XXXII. Resultados de la técnica de HIS-tipado para HPV en biopsias cervicales, según el criterio histopatológico de compatibilidad con infección por HPV.

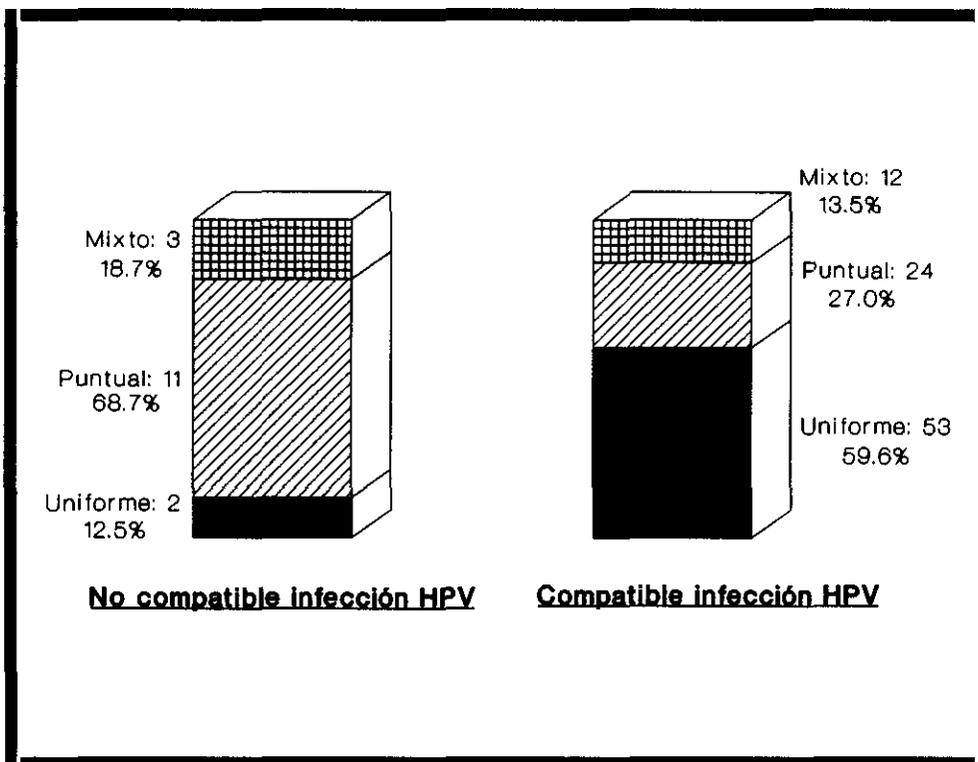


Figura IV.43. Distribución de patrones de marcaje por hibridación *in situ* en biopsias cervicales compatibles y no compatibles con infección por HPV.

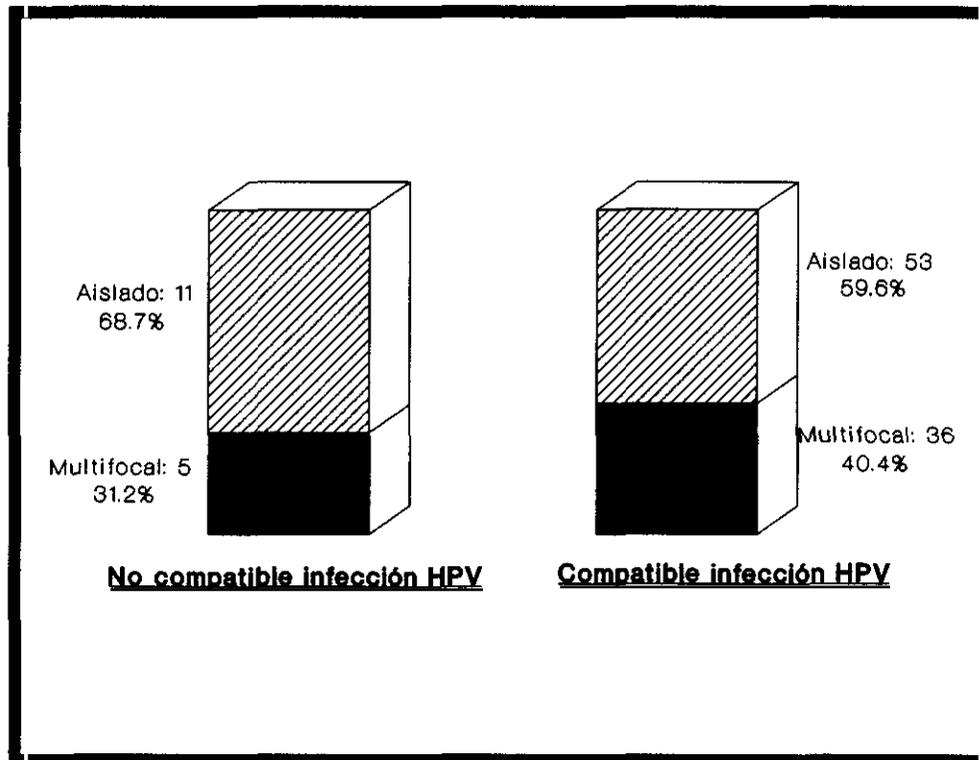


Figura IV.44. Relación entre compatibilidad histológica con infección por HPV y patrón de distribución por hibridación *in situ* en biopsias cervicales.

IV.6.3. COMPARACION ENTRE MUESTRAS DE ARCHIVO Y MUESTRAS DE NUEVA OBTENCION.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en piezas de vulva y cérvix, según que éstas procedan de un archivo de anatomía patológica o sean de nueva obtención, se detallan en las tablas IV.XXXIII y IV.XXXIV. En ningún caso hay diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, tanto cuando se consideran los totales como cuando se consideran los tipos de lesión por separado (condiloma acuminado en vulva y condiloma acuminado, LSIL y HSIL en cérvix uterino).

| TECNICA | LESION | | | | | | | | | |
|---------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|--------|-------------------|------------------|
| | Condiloma | | VIN I | | VIN II | | Carcinoma | | Total | |
| | Archivo (n=21) | Nuevas (n=8) | Archivo (n=1) | Nuevas (n=2) | Archivo (n=1) | Nuevas (n=2) | Archivo (n=3) | Nuevas | Archivo (n=26) | Nuevas (n=12) |
| IHQ + | 13 (61.9%) | 5 (62.5%) | --- | 1 | --- | 1 | 1 | --- | 14 (53.8%) | 7 (58.3%) |
| HIS + | 19 (90.4%) | 6 (75%) | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | --- | 24 (92.3%) | 9 (75%) |

Tabla IV.XXXIII. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva según que procedan de archivo o sean de nueva obtención.

| TECNICA | LESION | | | | | | | | | |
|---------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------|-------------------|------------------|
| | Condiloma | | LSIL | | HSIL | | Carcinoma | | Total | |
| | Archivo (n=6) | Nuevas (n=17) | Archivo (n=26) | Nuevas (n=31) | Archivo (n=25) | Nuevas (n=13) | Archivo (n=11) | Nuevas | Archivo (n=69) | Nuevas (n=61) |
| IHQ + | 5 (83.3%) | 9 (52.9%) | 5 (19.2%) | 5 (16.1%) | 2 (8%) | 2 (15.3%) | --- | --- | 12 (17.4%) | 16 (26.2%) |
| HIS + | 6 (100%) | 16 (94.1%) | 20 (76.9%) | 19 (61.2%) | 21 (84%) | 12 (92.3%) | 11 (91.7%) | --- | 58 (84.1%) | 47 (77%) |

Tabla IV.XXXIV. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix uterino según que procedan de archivo o sean de nueva obtención.

IV.6.4. PROCEDENCIA GEOGRAFICA.

En las tablas IV.XXXV, IV.XXXVI y IV.XXXVII se muestran, respectivamente, los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, HIS-detección e HIS-tipado para HPV en biopsias cervicales según su procedencia geográfica. No hay diferencia significativa entre los porcentajes de positividad obtenidos con ambas técnicas ni entre las distribuciones de los distintos grupos virales por procedencias.

| PROCEDENCIA | LESION | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------|-----|------|----|------|----|-----------|-----|-------|----|
| | Condiloma | | LSIL | | HSIL | | Carcinoma | | Total | |
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| AVILA ¹ | 3 | --- | 5 | 16 | 2 | 18 | --- | 2 | 10 | 36 |
| SALAMANCA ² | 2 | 1 | --- | 5 | --- | 5 | --- | 10 | 2 | 21 |
| GUADALAJARA ³ | --- | 4 | 1 | 8 | 1 | 4 | --- | --- | 2 | 16 |
| AY. MADRID ⁴ | 2 | 1 | --- | 2 | --- | 2 | --- | --- | 2 | 5 |
| CPF MADRID ⁵ | 7 | 3 | 4 | 16 | 1 | 5 | --- | --- | 12 | 24 |

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.

⁴ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

⁵ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.

Tabla IV.XXXV. Resultados de inmunohistoquímica para HPV en biopsias cervicales según la procedencia de la pieza y la lesión diagnosticada.

| PROCEDENCIA | LESION | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------|-----|------|---|------|-----|-----------|-----|-------|---|
| | Condiloma | | LSIL | | HSIL | | Carcinoma | | Total | |
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| AVILA ¹ | 3 | --- | 16 | 5 | 16 | 4 | 2 | --- | 37 | 9 |
| SALAMANCA ² | 3 | --- | 4 | 1 | 5 | --- | 9 | 1 | 21 | 2 |
| GUADALAJARA ³ | 4 | --- | 6 | 3 | 4 | 1 | --- | --- | 14 | 4 |
| AY. MADRID ⁴ | 3 | --- | 1 | 1 | 2 | --- | --- | --- | 6 | 1 |
| CPF MADRID ⁵ | 9 | 1 | 12 | 8 | 6 | --- | --- | --- | 27 | 9 |

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.

⁴ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

⁵ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.

Tabla IV.XXXVI. Resultados de HIS-detección para HPV en biopsias cervicales según la procedencia de la pieza y la lesión diagnosticada.

| PROCEDENCIA | TIPO VIRAL | | | |
|--------------------------|------------|-------|----------|-------|
| | 6/11 | 16/18 | 31/33/51 | Otros |
| AVILA ¹ | 11 | 8 | 15 | 5 |
| SALAMANCA ² | 5 | 8 | 10 | --- |
| GUADALAJARA ³ | 3 | 5 | 6 | 1 |
| AY. MADRID ⁴ | 3 | 1 | 2 | --- |
| CPF MADRID ⁵ | 9 | 9 | 13 | 1 |

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.

⁴ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

⁵ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.

Tabla IV.XXXVII. Resultados de la técnica de HIS-tipado para HPV en biopsias cervicales, según la procedencia geográfica de las piezas.

IV.7. TECNICA DE DOBLE MARCAJE.

Tras la realización de la técnica se pueden observar en el tejido tres tipos celulares (figs. IV.45 y IV.46):

1. Células con núcleos de color negro, positivas por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. En la mayoría de estas células, el color negro debido al oro coloidal amplificado con plata enmascara el color rojo de la reacción positiva por hibridación. Las células con una positividad débil por inmunohistoquímica presentan núcleos con un punteado negro sobre fondo rojizo.
2. Células con núcleos rojos, negativas por inmunohistoquímica y positivas por hibridación *in situ*.
3. Células con núcleos azul pálido, negativas por ambas técnicas. La coloración es debida al colorante de contraste (hematoxilina de Harris).

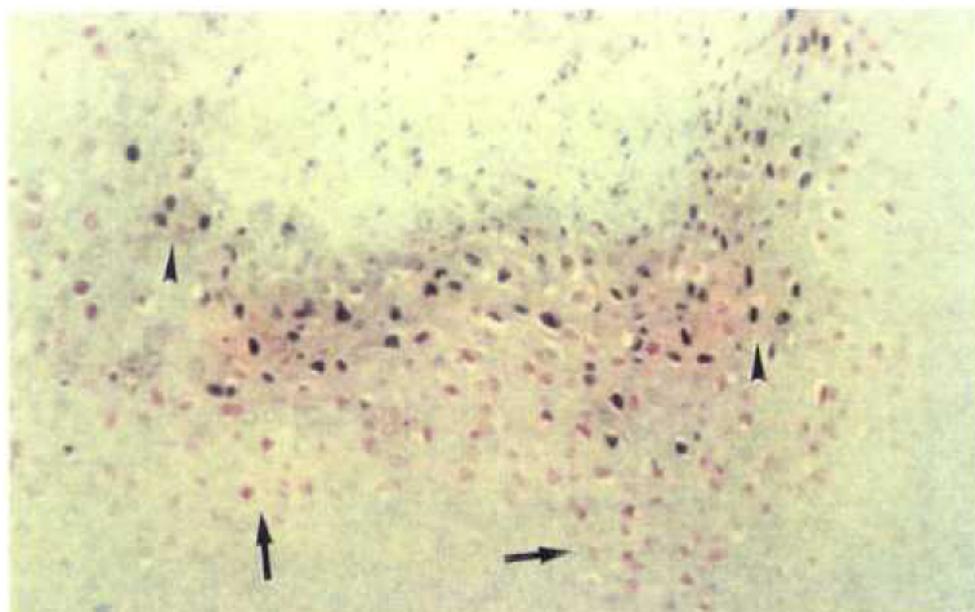


Figura IV.45. Combinación de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para HPV en una biopsia de cérvix. Las células positivas por inmunohistoquímica presentan los núcleos de color negro (flecha corta). Las células con núcleos de color rojo son positivas para los tipos 31/33/51 de HPV por hibridación *in situ* (flecha larga). (x 200).

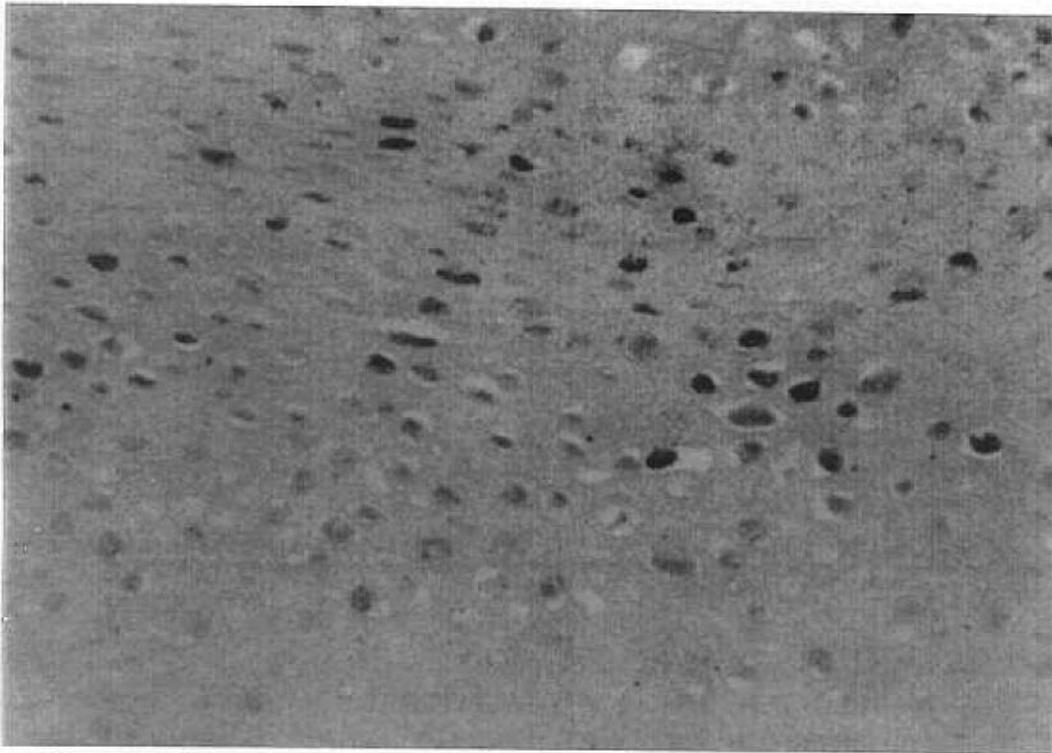


Figura IV.46. Detalle del doble marcaje obtenido al realizar secuencialmente las técnicas de inmunohistoquímica e HIS-tipado para los tipos 6/11 de HPV en un condiloma acuminado de vulva.

V. DISCUSSION

Antes de pasar a comentar en profundidad los resultados obtenidos conviene hacer dos consideraciones previas:

* La primera hace referencia al establecimiento de la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas. La forma más directa de calcularlas es la comparación con una técnica de referencia. En nuestro caso esto hubiese supuesto un grave inconveniente, ya que la técnica considerada de referencia en el diagnóstico de la infección por HPV es el Southern blot⁷² y en un laboratorio de anatomía patológica no hay infraestructura para realizarla. Además, la supremacía del Southern blot como técnica de referencia empieza a cuestionarse por varios motivos:

- El desarrollo de técnicas más sensibles, como la PCR²⁸⁷.
- La obtención de resultados contradictorios en varios laboratorios con experiencia en Southern blot utilizando las mismas muestras.³¹³
- La existencia de muestras positivas para HPV por hibridación *in situ* y negativas por Southern blot, debido a la presencia de muy pocas células infectadas pero con un elevado número de copias^{276,277,314,315}.

Por estas razones, hemos preferido estudiar la sensibilidad y especificidad de nuestras técnicas de una manera indirecta, combinando dos estrategias:

Por un lado, el empleo de líneas celulares con un número conocido de copias del genoma de HPV integradas en su propio genoma, lo que nos permite obtener un valor aproximado de la sensibilidad en términos absolutos (número mínimo de copias del genoma de HPV/célula para obtener un resultado positivo).

Por otro lado, la utilización de muestras control con lesiones no asociadas a HPV. Esto nos permite calcular la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la inmunohistoquímica e hibridación *in situ* respecto del diagnóstico histopatológico, considerando las biopsias diagnosticadas

de condiloma acuminado como HPV positivas por histopatología y las biopsias con lesiones no asociadas a HPV como negativas por histopatología. No se han considerado las biopsias diagnosticadas de SIL compatible o no con infección por HPV para realizar estos cálculos porque, como se discutirá más adelante, probablemente un porcentaje de SIL histopatológicamente compatible con infección por HPV tienen otra etiología distinta y viceversa, algunos SIL histopatológicamente no compatibles con infección por HPV son producidos por este virus.

Tampoco se han empleado muestras correspondientes a epitelio de distintas áreas genitales sin alteraciones por las implicaciones éticas que supone tomar biopsias a mujeres sanas sin ningún hallazgo previo que haga sospechar la presencia de una patología (imagen colposcópica anómala, citología cérvico-vaginal alterada, etc.). Además, diversos autores¹⁰⁵⁻¹¹⁶ han detectado la presencia de genomas de HPV en epitelio normal de personas asintomáticas en porcentajes que oscilan entre el 4.5%¹⁰⁹ y el 29%¹⁰⁷ de la población estudiada, por lo que el empleo de este tipo de muestras como control negativo debería evitarse.

* La segunda consideración hace referencia a la forma en que se han presentado los resultados, separados siempre en piezas de vulva y cérvix uterino.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica e hibridación in situ están relacionados con el comportamiento del virus en cada lesión. Este comportamiento puede estar influenciado por las características histológicas del tejido infectado y por los diferentes microambientes presentes en las distintas áreas del tracto genital inferior femenino. Por este motivo, hemos preferido separar los resultados en vulva y cérvix y no desarrollar también los resultados globales, que además de hacer sumamente tediosa la presentación de este apartado del trabajo, podrían inducir a conclusiones erróneas. Sólo se han considerado conjuntamente en aquellas ocasiones en las que la ausencia de significación al aplicar un test estadístico puede ser debida a un número insuficiente de casos y en las que además no se han observado discrepancias en los resultados obtenidos en ambas localizaciones anatómicas.

Una vez hechos estos dos comentarios, el resto de la discusión se estructura siguiendo los mismos epígrafes en que se dividió el capítulo de resultados, para hacer al final unas consideraciones globales.

V.1. CLASIFICACION DE LAS LESIONES.

El primer problema en el planteamiento del presente estudio fue la clasificación de las lesiones cervicales. Tras varias consideraciones optamos por una clasificación propia, basada en el sistema de Bethesda^{96,166,167} (LSIL y HSIL), pero considerando el condiloma acuminado como una entidad diagnóstica independiente de LSIL, ya que tiene unas características histopatológicas muy bien diferenciadas respecto del resto de lesiones de bajo grado y es una lesión claramente benigna que, salvo en muy raras excepciones, no evoluciona hacia malignidad.

Dos son principalmente las razones que motivaron la elección del sistema de Bethesda como base para esta clasificación:

- Por un lado, desde un punto de vista semántico, la denominación "lesión intraepitelial escamosa" define mejor el tipo de lesión que nos ocupa que la denominación "neoplasia intraepitelial". El término "neoplasia" tiene connotaciones de crecimiento y por consiguiente de invasión. Es verdad que estas lesiones tienen una potencialidad de evolución maligna, pero esto no implica que todas ellas conduzcan a una verdadera neoplasia invasiva. De hecho, un porcentaje elevado de lesiones persisten sin evolucionar e incluso remiten espontáneamente sin necesidad de tratamiento³⁰⁴. Es preferible, por ello, hablar de lesión intraepitelial originada por una alteración en las células escamosas, bien por una infección vírica, bien por otras etiologías.

- Por otro lado, el sistema de Bethesda es el que mejor se ajusta a una de las principales finalidades de este trabajo: la orientación pronóstica sobre la evolución de una lesión. En las lesiones de alto grado (HSIL) se acepta

universalmente la aplicación de tratamientos agresivos¹⁰⁰ (láser, cirugía), independientemente de factores pronósticos; pero en las lesiones de bajo grado (LSIL) en las que el clínico puede optar entre un amplio abanico de posibilidades terapéuticas¹⁰⁰ (resinas de podofilino, criocoagulación, electrocoagulación, interferón, láser, etc.) es donde esa orientación pronóstica puede influir en la elección del tratamiento más adecuado. Con el sistema de clasificación CIN, el problema surge con los CIN II, tanto a nivel diagnóstico, por estar a caballo entre el CIN I y el CIN III (lo que en ocasiones se soluciona con diagnósticos mixtos: CIN I-II, CIN II-III), como a nivel de decisiones terapéuticas.

En las piezas de vulva hemos mantenido la terminología VIN, por no estar todavía perfectamente definidos los criterios histopatológicos de LSIL y HSIL en esta localización anatómica. En aquellos casos en que ha sido necesario considerar los resultados globalmente para aumentar la significación estadística, se han seguido los criterios de Crum y Nuovo⁹⁶ y se han considerado las lesiones diagnosticadas de VIN I como LSIL y las diagnosticadas de VIN II como HSIL.

Otro aspecto que conviene resaltar es la idoneidad de las muestras utilizadas con lesiones asociadas a HPV en función de los objetivos que se persiguen. En piezas de vulva, dado el escaso número de lesiones displásicas diagnosticadas (3 VIN I y 3 VIN II), sólo son representativos los resultados obtenidos en condilomas acuminados y, por tanto, no se han podido realizar estudios con fines pronósticos. En cérvix uterino, en cambio, la distribución de las lesiones ha permitido realizar estudios más amplios. Como se puede observar en la figura IV.3 el porcentaje mayoritario de piezas fue diagnosticado de SIL (78.9%) y fueron minoritarias las piezas diagnosticadas de condiloma acuminado (14.4%) y carcinoma (6.7%). Esta aparente desigualdad en los porcentajes de las diferentes lesiones tiene, sin embargo, su explicación lógica: en las lesiones benignas y malignas se espera obtener resultados homogéneos, con lo que con un número menor de muestras, éstas pueden ser representativas. En los SIL, en cambio, se espera una mayor heterogeneidad, por lo que el número de muestras tiene que ser mayor para que los resultados sean representativos, sobre todo para abordar consideraciones de tipo pronóstico.

Un pequeño inconveniente ha sido el escaso número de carcinomas, que si bien ha sido suficiente para obtener resultados estadísticamente significativos en la mayor parte de los estudios, en algunos ha sido necesario considerar los resultados globalmente (vulva + cérvix) para conseguir esa significación estadística, y en los menos ha obligado a hablar de "tendencia" en lugar de significación estadística. Sin embargo, no ha sido posible obtener más muestras con este tipo de lesión, ya que en el período de estudio y en los centros que colaboraron en la obtención de nuevas muestras no se diagnosticó ningún carcinoma y en los archivos de anatomía patológica consultados no se podía garantizar que en fechas anteriores a las revisadas las condiciones de fijación de las piezas fuesen las idóneas para la realización de técnicas de hibridación *in situ*.

Un punto importante en la clasificación de las lesiones es la distinción entre biopsias histopatológicamente compatibles y no compatibles con infección por HPV. Los condilomas acuminados son, por definición, la consecuencia de la infección productiva por HPV, por lo que todos han sido considerados compatibles. De hecho no se ha descrito todavía ningún otro agente etiológico que produzca lesiones similares.

En el resto de las lesiones se debe evitar el empleo de la coilocitosis como único criterio histopatológico patognomónico de infección por HPV, ya que otros agentes infecciosos (tricomonas, candidas, *Gardenerella vaginalis*) pueden también producirla en mayor o menor grado¹¹⁷. Por ello, los criterios de compatibilidad con infección por HPV deben incluir además la observación de otras dos de las siguientes características histopatológicas: binucleación y/o multinucleación, disqueratosis, papilomatosis y contorno nuclear irregular.

En el caso de las piezas diagnosticadas de carcinoma el estudio de compatibilidad con infección por HPV se ha llevado a cabo no sólo en la masa de células neoplásicas, sino también en los fragmentos de epitelio adyacentes a la lesión invasiva, a pesar de lo cual ninguna de las muestras con este diagnóstico cumple los requisitos mencionados anteriormente y, en consecuencia, se han considerado no compatibles.

Finalmente, hay que mencionar las diferencias encontradas en la distribución de lesiones en muestras de archivo y de nueva obtención (figura IV.5): mientras que todos los carcinomas se diagnosticaron en piezas de archivo, en las de nueva obtención predominan los condilomas acuminados y LSIL. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que los archivos de anatomía patológica revisados corresponden a centros hospitalarios y las piezas de nueva obtención se obtuvieron en consultas de ginecología extrahospitalarias. La mayoría de las pacientes con lesiones asociadas a HPV que acuden a estas consultas presenta lesiones benignas o SIL de bajo grado y son tratadas de manera ambulatoria, sin remitirse al hospital; por el contrario, el número de pacientes con HSIL y carcinoma es muy bajo y habitualmente se remiten al hospital correspondiente para efectuar tratamientos más agresivos (láser o cirugía). De esta forma los hospitales, al nutrirse de pacientes procedentes de múltiples consultas de ginecología, realizan un efecto de concentración de este tipo de lesiones, que se refleja en sus archivos de anatomía patológica.

V.2. LONGITUD DE EPITELIO.

La idea de que la longitud del epitelio presente en una biopsia ginecológica puede influir en la obtención de un resultado falso negativo con la técnica de hibridación *in situ* surgió de nuestra propia experiencia con esta técnica, ya que no hemos encontrado ninguna referencia en la literatura revisada al respecto. Así, mientras que en algunas biopsias el número de células positivas es muy elevado y su distribución a lo largo del epitelio más o menos uniforme o parcheada, en otras el número de células positivas es muy reducido y se encuentran muy separadas unas de otras en el epitelio; incluso en algunas biopsias se observa una única célula claramente positiva.

Para comprobar esta hipótesis lo mejor es comparar los resultados obtenidos con hibridación *in situ* en piezas con distinta longitud de epitelio, para lo que previamente hace falta realizar esta medida en cada biopsia. La técnica

elegida, el análisis de imagen, creemos que es la mejor para efectuar las medidas con el máximo de precisión. El software utilizado (programa MIP de Microm España) presenta dos características interesantes: por un lado permite calibrar el sistema con un portaobjetos graduado, de manera que el resultado de las medidas se exprese en milímetros; por otro lado permite trazar una línea interactiva sobre una imagen y calcula automáticamente la distancia entre los dos extremos y el camino recorrido.

Otra característica importante es que las imágenes obtenidas con la cámara de TV acoplada al microscopio son cuadradas, por lo que en aquellas biopsias en las que el epitelio ocupa más de un campo se pueden captar varias imágenes sucesivas que permitan reconstruir toda la pieza sin pérdida de ningún fragmento entre campo y campo.

Ahora bien, ¿a qué altura del epitelio es preferible realizar la medida? Nosotros hemos considerado que la medida a nivel de la capa basal de células es la forma más objetiva de obtener este dato para poder efectuar estudios comparativos, ya que el resto de los estratos del epitelio se ven afectados por alteraciones causadas por la propia infección vírica, como acantosis y papilomatosis.

En el caso de lesiones invasivas, en las que la capa basal de células no está conservada, lo más práctico es efectuar una medida aproximada por campos, calibrando previamente el microscopio con un portaobjetos graduado. En nuestro caso un campo de 100 aumentos (10x10) equivale a un diámetro de 1.6 mm, por lo que 6-7 campos equivalen a 10 mm de epitelio.

Para poder tabular y estudiar resultados posteriores en relación con la longitud de epitelio las biopsias se agruparon en clases de 1 mm de amplitud, desde longitudes inferiores a 2 mm hasta 10 mm. Todas las biopsias cuyo epitelio medía más de 10 mm se agruparon en una sola clase, independientemente de su longitud, pues consideramos, según también nuestra propia experiencia, que 1 cm de epitelio constituye una longitud suficientemente representativa para que

el número de falsos negativos por hibridación *in situ* en función de la longitud de epitelio sea mínimo. De hecho, los resultados obtenidos posteriormente confirman esta idea.

Todas las muestras cervicales con lesiones no asociadas a HPV tenían mas de 10 mm de epitelio, punto importante si tenemos en cuenta que iban a ser usadas como controles.

V.3. INMUNOHISTOQUIMICA.

El equipo de reactivos utilizado se basa en el método avidina-biotina-enzima y su elección se fundamentó en dos razones:

1. Su mayor sensibilidad frente al método clásico de peroxidasa-antiperoxidasa, tanto en general²³⁶, como en el caso particular de la detección de HPV en tejido de cérvix uterino, como han demostrado Alessandri y cols.²³⁷.
2. Su perfecta adaptación a metodologías basadas en el "transporte capilar de reactivos"³¹², que tienen la ventaja de que los lavados son muy rápidos y muy enérgicos, con lo que se consigue un considerable ahorro de tiempo y eliminar, prácticamente en su totalidad, los problemas de "tinción de fondo" en las preparaciones.

La sensibilidad respecto del diagnóstico histopatológico en condilomas acuminados, 53.8%, es baja para considerar la inmunohistoquímica como una buena técnica en la que basar el diagnóstico de esta infección. Ahora bien, dado que la especificidad y el valor predictivo positivo son del 100%, sí se puede utilizar como técnica complementaria, teniendo siempre en cuenta que un resultado negativo no es concluyente (66.7% de valor predictivo negativo). Por supuesto, no podemos extrapolar estos valores al resto de lesiones, ya que la

sensibilidad de la inmunohistoquímica está influenciada por el tipo de infección, productiva o no productiva, que ha originado una lesión.

El anticuerpo policlonal utilizado como primario reacciona de forma cruzada con la proteína estructural mayoritaria de la cápside de todos los tipos de HPV, por lo que, en teoría, es útil para diagnosticar infecciones productivas. De hecho, Ferenczy y cols.⁴⁶, Kadish y cols.²¹⁸ y Morin y cols.¹³² han demostrado en sendos estudios una correlación prácticamente del 100% entre positividad antigénica por inmunohistoquímica y observación de partículas víricas por microscopía electrónica.

Esto explica el resultado negativo obtenido en las tres líneas celulares, procedentes de carcinomas cervicales y que contienen un número variable de copias de HPV de los tipos 16 (CaSki y SiHa) y 18 (HeLa) integradas en su genoma. Estas líneas se caracterizan por expresar proteínas reguladoras específicas de HPV^{232,309}, sobre todo las codificadas por las regiones E6 y E7, pero en ningún caso se ha descrito que haya síntesis de proteínas estructurales ni producción de nuevos viriones. Es lógico, por tanto, que se obtenga un resultado negativo por inmunohistoquímica, pues el anticuerpo no da reacción cruzada con proteínas víricas reguladoras.

Los resultados obtenidos en condilomas acuminados de vulva y cérvix uterino (58.1% y 53.8%, respectivamente) están en consonancia con los publicados por diversos autores, que oscilan alrededor del 50% de positividad. Como ejemplos, Schadendorf y cols.³¹⁶ obtuvieron una positividad del 69%, Wilbur y cols.¹¹⁹ del 55% y Bejui-Thivolet y cols.³¹⁷ del 22.2%, aunque en este estudio las piezas estaban fijadas con solución de Bouin, por lo que sus resultados no son perfectamente comparables con los nuestros.

En España, Jou y cols.³¹⁸ obtuvieron un resultado inmunohistoquímico positivo en el 39.5% y 60% de condilomas acuminados de vulva y cérvix, respectivamente, y Ochotorena³¹⁹, en un reciente estudio realizado en la Comunidad Autónoma de Murcia, detectó antígenos de HPV en un 32.7% de

condilomas acuminados cervicales.

Coincidiendo con lo publicado por la mayoría de los autores, el porcentaje de positividad es menor en lesiones displásicas que en condilomas y es mínimo en carcinomas. En nuestro trabajo hemos obtenido el mismo resultado en LSIL y HSIL (11.1% y 11.5%, respectivamente). Estos porcentajes son ligeramente inferiores a los publicados por Bitterman y Jenson¹¹⁸ en displasias leves (30%) y similares en displasias moderadas (16%) y severas (3%).

La serie presentada por Ochotorena³¹⁹ es muy similar a la nuestra, ya que detecta antígenos víricos en el 10% de biopsias diagnosticadas de CIN I y en el 17.2% de CIN II y CIN III, mientras que los resultados de Jou y cols.³¹⁸ son ligeramente superiores, con un 32.3% de positividad en CIN I y un 16% en CIN II y CIN III. Sin embargo, dado que estos autores estudian sólo biopsias que cumplen los criterios de compatibilidad con infección por HPV, sus resultados no son perfectamente comparables con los nuestros.

En lesiones malignas sólo una biopsia de carcinoma epidermoide de vulva presentó inmunorreactividad. Hay que señalar, que la positividad se observó en dos células de una región de epitelio adyacente al carcinoma con evidencia de VIN y en ningún caso en células de la masa neoplásica. Esta peculiaridad ha sido también descrita por Hara y cols.³²⁰

En todos los casos positivos, independientemente de la lesión diagnosticada, el marcaje afectó casi exclusivamente a coilocitos y células disqueratóticas del tercio superior del epitelio, lo que apoya la idea de que es necesario un cierto grado de maduración celular para que se transcriban los genes tardíos estructurales del genoma vírico.

V.4. HIBRIDACION *IN SITU*.

V.4.1. TECNICA DE DETECCION.

La sensibilidad de la técnica de hibridación *in situ* depende de factores como el tipo de marcaje de las sondas (radioactivo o no radioactivo) y el número de pasos en que se realiza la detección de ese marcaje. El equipo que hemos utilizado contiene sondas marcadas con biotina y la detección se realiza en un solo paso con un complejo estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina. Con la técnica descrita en material y métodos hemos obtenido una reacción positiva en células HeLa, que, según Schwarz y cols.⁷⁸ y Mincheva y cols.³¹¹, contienen entre 10 y 50 copias integradas del genoma del HPV 18. En consecuencia, podemos afirmar que nuestra técnica tiene, por lo menos, una sensibilidad en valores absolutos de 50 copias de HPV/célula, aunque probablemente sea menor. Esta sensibilidad es mejor que la obtenida por Guerin-Reverchon³²¹, que necesita un sistema de detección en tres pasos para obtener un resultado positivo en células HeLa, y coincide con la calculada por Herrington y cols.³²² (33 copias de HPV/célula) en un estudio comparativo entre sondas marcadas con biotina y con digoxigenina, combinadas con sistemas de detección en uno y tres pasos, con fosfatasa alcalina y con peroxidasa.

En células CaSki obtuvimos una reacción positiva mucho más intensa que en células HeLa, como corresponde a un número de copias de HPV mucho mayor³¹¹ (400-600 copias de HPV 16/célula). El resultado negativo en células SiHa indica de forma obvia que nuestra técnica no es tan sensible como para detectar una o dos copias de HPV/célula³¹¹, por lo que en el conjunto de casos negativos se incluirá un porcentaje de falsos negativos que contengan un número muy bajo de copias de HPV/célula.

Los valores de sensibilidad y especificidad calculados para la HIS-detección respecto al diagnóstico histopatológico en condilomas acuminados de cérvix

(92.3% de sensibilidad y 100% de especificidad) indican que ésta si puede ser una técnica adecuada en la que basar el diagnóstico de infección por HPV, aunque con los datos que estamos manejando en este punto de la discusión es todavía prematuro extrapolar estos valores de sensibilidad y especificidad al resto de lesiones cervicales asociadas a HPV. Estos valores, no obstante, son muy parecidos e incluso en algunos parámetros mejores, a los obtenidos por Pao y cols.³¹⁴ comparando la hibridación *in situ* frente a Southern blot en material procedente de citologías exfoliativas: sensibilidad 93.3%, especificidad 84.2%, valor predictivo positivo 75.7% y valor predictivo negativo 96%.

Centrándonos en los resultados obtenidos con esta técnica en los distintos tipos de lesiones, el porcentaje de positividad obtenido en condilomas acuminados de vulva (80.7%) es superior al publicado por Bleiweiss y cols.³²³ (50%) y prácticamente igual al obtenido por Schadendorf y cols.³¹⁶ (76.9%) con el mismo equipo de reactivos y por Wilbur y cols.¹¹⁹ (83.3%) con sondas tritadas de ARN antisentido. Esto apoya la idea de que las técnicas que utilizan sondas biotiniladas tienen la misma sensibilidad que las que utilizan sondas radioactivas. En este sentido, Unger y cols.³²⁴ y Nuovo y Richart²⁷⁵, en sendos estudios comparativos frente a sondas marcadas con ³⁵S, y Neumann y cols.²⁷⁸ frente a sondas marcadas con ³²P, concluyen que las sondas marcadas con biotina confieren la misma sensibilidad, e incluso mejor, que las sondas radioactivas a las técnicas de hibridación *in situ*.

Con respecto a las biopsias de cérvix, en la tabla V.I se comparan nuestros resultados con los obtenidos por otros autores que han utilizado también la hibridación *in situ* como técnica diagnóstica; en cada caso se señala el tipo de marcaje empleado y el tipo de muestra en el que realizaron el estudio.

| AUTOR ¹ | MARCAJE | MUESTRA | LESION | | | |
|--------------------------------|----------------|-----------|-----------|--------------|------------------------|-----------|
| | | | CONDILOMA | LSIL (CIN I) | HSIL (CIN II +CIN III) | CARCINOMA |
| Herrington ³²⁵ | Digoxigenina | Citología | 64.7% | 75% | | |
| Bejui-Thivolet ³¹⁷ | Biotina | Biopsia | 100% | | 44.6% | |
| Konno ³²⁶ | Biotina | Biopsia | | | 63.2% | |
| Thompson y Rose ³²⁷ | ^{32p} | Biopsia | | | | 53% |
| Faulkner-Jones ³²⁸ | Biotina | Biopsia | 46.2% | 33.3% | 76.9% | |
| Pao ³¹⁸ | Biotina | Citología | 84.4% | 50% | 76.9% | 66.7% |
| Cooper ^{329, 330} | Digoxigenina | Biopsia | | | 72.2% | 68% |
| Cooper ^{329, 330} | Digoxigenina | Biopsia | | | 44.9% | 64% |
| Nuovo ³³¹ | Biotina | Biopsia | | 89% | 71% | |
| Meyer ³³² | Biotina | Cito/Biop | | 29% | 69% | |
| Thomassen ³³³ | Biotina | Biopsia | | | 69% | |
| Gómez | Biotina | Biopsia | 92% | 52.2% | 76.9% | 91.7% |

¹ Primer autor del trabajo.

Tabla V.I. Comparación de los resultados obtenidos por diversos autores con la técnica de hibridación *in situ* para HPV en muestras de cérvix uterino.

A la vista de esta tabla se pueden resaltar tres aspectos:

1. Nuestros resultados en condilomas y carcinomas son, en general, superiores a los obtenidos por otros autores. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que, excepto Herrington y cols.³²⁵, ninguno de ellos realizó una técnica de HIS-detección, sino que los porcentajes de positividad reflejan la suma de todas las biopsias en las que se obtuvo un resultado positivo con alguna de las múltiples sondas utilizadas por cada investigador con técnicas de HIS-tipado (la mayoría utiliza sondas que cubren los tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33 de HPV).

En carcinomas los resultados de los diversos autores oscilan alrededor del 65%, excepto Thomson y Rose³²⁷, que obtienen un resultado positivo en un 53% de casos, debido probablemente a que las sondas que utilizaron no cubren los tipos 31 y 33 de HPV.

2. En LSIL es donde mayor heterogeneidad se observa en los resultados obtenidos por diversos autores (29%-89%), debido quizás a la aplicación de criterios distintos en el diagnóstico de este tipo de lesiones. Nosotros hemos obtenido un resultado positivo en el 52.2% de las biopsias, similar al publicado por Pao y cols.³¹⁴ en muestras citológicas (50%).
3. En HSIL los resultados publicados por la mayoría de los autores oscilan alrededor del 75% y coinciden con los obtenidos por nosotros (76.9%). Llama la atención el bajo porcentaje de positividad obtenido por Bejui-Thivolet y cols.³¹⁷ (44.6%) en SIL, que se puede justificar porque tampoco cubrieron los tipos 31 y 33 de HPV con sus sondas y emplearon biopsias fijadas en Bouin, que no es el fijador ideal para esta técnica, y por Cooper y cols.³²⁹ en HSIL (50%) en una población de Africa del Sur, de difícil explicación, si exceptuamos criterios de distribución geográfica de los distintos tipos virales.

Respecto de otras series españolas, nuestros resultados son ligeramente superiores a los encontrados en la bibliografía consultada. Aznar y cols.³³⁴ obtuvieron un 77% de casos positivos en condilomas acuminados; Riera y cols.³³⁵ un 47.6% en biopsias diagnosticadas de CIN I; Domínguez y cols.³³⁶ un 44.7% en CIN I y un 27% en CIN II + CIN III; y Ochotorena³¹⁹ un 52.7% en condilomas acuminados, un 12% en CIN I y un 37.2% en CIN II + CIN III. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se utilizó una técnica de detección.

Podemos finalizar este apartado de la discusión recalcando la importancia que tiene realizar una técnica de HIS-detección para confirmar la etiología por HPV de este tipo de lesiones, o en su defecto, si se efectúa solamente técnica de HIS-tipado, emplear un amplio abanico de sondas que cubran por lo menos los tipos de HPV más frecuentes en localizaciones genitales (tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33 de HPV).

V.4.1.1. Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias.

Una vez realizada la medida de la longitud del epitelio presente en las biopsias con lesiones no invasivas asociadas a HPV y tabulados los resultados en clases de 1 mm de amplitud, se procedió a relacionar estos datos con los resultados obtenidos mediante HIS-detección. De esta forma se construyeron las tablas IV.X y IV.XI, en las que se recoge el número de biopsias positivas para HPV con respecto al número total de biopsias en cada clase. El análisis estadístico de estas tablas puede ser conflictivo por el reducido número de muestras que hay en algunas clases. Por ello se prefirió presentar estos datos gráficamente y agruparlos de manera que fuesen más representativos. Así en la figura IV.11 se ilustra el porcentaje de biopsias HPV-positivas con una longitud mínima de epitelio.

En el caso de piezas de vulva los mejores resultados se obtuvieron en

biopsias con más de 10 mm de epitelio (89.5%), pero a la vista de la gráfica, este parámetro no parece ser un factor importante a tener en cuenta para mejorar el rendimiento de la técnica, pues los porcentajes de positividad obtenidos se sitúan en la banda del 80-90%, independientemente de la longitud mínima de epitelio en las biopsias consideradas. Esta conclusión, sin embargo, no debería generalizarse a todas las piezas de vulva, ya que la muestra estudiada esta compuesta en un porcentaje mayoritario (77.5%) por condilomas acuminados, por lo que parece más aceptable concluir que en condilomas acuminados de vulva la longitud de epitelio no influye de forma significativa en el resultado obtenido mediante HIS-detección, aunque lo ideal es que la biopsia tenga más de 10 mm de epitelio. Esto es lógico, ya que como se ha mencionado en varias ocasiones, el condiloma acuminado es la manifestación clínica de una infección benigna productiva, en la que un porcentaje muy elevado de células está infectado y contienen un alto número de copias del genoma de HPV.

La situación es distinta en piezas de cérvix uterino. La gráfica se puede descomponer en tres tramos: un primer tramo, ascendente, en el que el porcentaje de positividad pasa de un 66.1% en biopsias con más de 1 mm de epitelio a un 79.7% en biopsias con más de 5 mm de epitelio; un segundo tramo en el que este porcentaje se estabiliza alrededor del 80-82%, entre biopsias con más de 5 mm y biopsias con más de 8 mm de epitelio; un tercer tramo en el que la positividad vuelve a subir, aunque ligeramente, hasta alcanzar valores alrededor del 85% en biopsias con más de 9 mm de epitelio. En este caso, sí parece haber una influencia de la longitud de epitelio en los resultados de la HIS-detección.

Para estudiar la significación estadística, las biopsias se agruparon en tres categorías: longitud de epitelio inferior a 5 mm, entre 5 y 9 mm y superior a 9 mm. Los puntos de corte (5 y 9) se eligieron a tenor de lo observado en la gráfica IV.8. Las diferencias entre los porcentajes de positividad en estos tres grupos (figura IV.13) son estadísticamente significativas, lo que implica una dependencia entre el resultado de la técnica de HIS-detección y la longitud de epitelio presente en las biopsias. Al considerar estas tres categorías por parejas se observan

diferencias significativas entre biopsias con menos de 5 mm de epitelio y aquellas con 5-9 mm o más de 9 mm. No hay diferencia significativa, sin embargo, entre biopsias con 5-9 mm y biopsias con más de 9 mm de epitelio. Esto nos permite concluir, en principio, que las biopsias de cérvix uterino deberían tener una longitud mínima de 5 mm de epitelio para reducir en lo posible el número de falsos negativos por tamaño inadecuado de la muestra, aunque lo ideal sería una longitud superior a 9 mm.

Para comprobar si esta conclusión general es válida para cada tipo de lesión cervical, se repitió el estudio por lesiones (figura IV.12).

En condilomas acuminados se comprueba una vez más que la longitud de epitelio no influye en los resultados de la HIS, pues se obtienen porcentajes de positividad por encima del 90% cualquiera que sea la longitud mínima considerada.

En LSIL la gráfica es prácticamente igual a la global de cérvix, aunque con resultados más bajos, con un primer tramo en que el porcentaje de biopsias HPV positivas aumenta desde el 52.2% hasta el 68.4% en biopsias con más de 5 mm de epitelio, un segundo tramo en el que la positividad se mantiene alrededor del 65-70% hasta biopsias con más de 9 mm de epitelio y un tercer tramo en que aumentan los resultados positivos hasta el 74.2% para biopsias con más de 10 mm de epitelio.

En HSIL los resultados de positividad son mejores, pero la forma de la gráfica es muy similar: una subida inicial desde el 76.9% al 85.4%, en este caso en biopsias con más de 4 mm de epitelio; una estabilización alrededor del 86-88% hasta biopsias con más de 6 mm; una nueva subida hasta valores próximos al 93% en biopsias con longitudes mínimas de 7 y 8 mm y, finalmente, un 100% de resultados positivos en biopsias con más de 9 mm.

Al agrupar las biopsias en tres categorías, respetando los mismos puntos de corte que en el estudio global (5 y 9), se comprueba que no hay diferencia

estadística significativa en condilomas acuminados, pero sí la hay en LSIL y HSIL. En consecuencia, la conclusión a que se llegó al estudiar todas las biopsias de cérvix conjuntamente puede extenderse a biopsias diagnosticadas de LSIL y HSIL, con ligeras matizaciones: en LSIL la longitud ideal sería de 10 mm en lugar de 9 mm y en HSIL la longitud mínima puede rebajarse a 4 mm.

En la literatura consultada no hemos encontrado ningún trabajo que haga referencia a la importancia que el tamaño de una biopsia puede tener para reducir en lo posible el número de falsos negativos y, en consecuencia, mejorar el valor predictivo negativo de la hibridación *in situ*, por lo que no hemos podido contrastar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en este sentido.

V.4.2. TECNICA DE TIPADO.

La técnica de HIS-tipado se ha realizado sólo en biopsias positivas por HIS-detección y, a la vista de los resultados obtenidos, se puede hablar de tres tipos de muestras:

1. Muestras negativas para las tres sondas:

La sensibilidad de la técnica de tipado es similar, en valores absolutos (copias de HPV/célula), a la de detección, ya que con ambas técnicas se obtiene un resultado positivo en las mismas líneas celulares, CaSki y HeLa, aunque con una clara diferencia de intensidad en la reacción positiva, debido al distinto número de copias de HPV en cada una de ellas³¹¹ (400-600 copias/célula en células CaSki y 20-50 copias/célula en células HeLa). Por ello, las muestras positivas por HIS-detección y negativas por HIS-tipado se interpretan como infecciones por tipos de HPV no cubiertos con las sondas utilizadas (al tabular los resultados estos tipos virales se han

denominado "otros").

2. Muestras positivas para una sonda:

Las sondas utilizadas no son específicas de tipos aislados de HPV, sino que están constituidas por cócteles de sondas específicas de los tipos virales más representativos de lo que clásicamente se han denominado grupos de bajo riesgo (sonda 6/11), alto riesgo (sonda 16/18) y riesgo intermedio (sonda 31/33/51) con respecto a la carcinogénesis. En consecuencia, las muestras que dan un resultado positivo con una sola sonda se interpretan como infecciones por tipos virales de un grupo de riesgo determinado, pero no se puede saber cuál es el tipo concreto que está presente en la muestra. Así, tanto las células CaSki como las células HeLa fueron positivas para la misma sonda (16/18) a pesar de que los genomas virales integrados en cada una de ellas corresponden a tipos distintos de HPV³¹¹ (HPV 16 en células CaSki y HPV 18 en células HeLa). Tampoco se puede saber si se trata de una infección por un único tipo viral o de una infección múltiple por dos virus del mismo grupo de riesgo o incluso si están presentes otros tipos virales no cubiertos con las sondas empleadas.

Desde un punto de vista semántico, estas biopsias se consideran positivas para los tipos virales que incluye la sonda correspondiente (biopsias positivas para los tipos 6/11 ó 16/18 ó 31/33/51 de HPV).

3. Muestras positivas para 2 ó 3 sondas:

En todas las biopsias en las que se obtuvo una reacción positiva para más de una sonda, éstas se observaron en zonas distintas del epitelio no superpuestas, lo que se interpreta como infecciones múltiples por dos o más tipos de HPV de distintos grupos de riesgo, como han demostrado recientemente Herrington y cols.³³⁷. Si la reacción positiva de cada sonda hubiese afectado a la misma zona de

epitelio, no podríamos saber si se trata de una infección múltiple o de una reacción cruzada. Dado que esto no se ha observado y que tampoco se obtuvieron reacciones cruzadas en las líneas celulares de control, indica que la técnica utilizada tiene una especificidad elevada.

V.4.2.1. Biopsias de vulva.

En piezas de vulva llama la atención que prácticamente en todos los condilomas acuminados positivos por HIS-detección (23 de 25) se detectó la presencia de los tipos 6/11 de HPV, coincidiendo con autores como Wilbur y cols.¹¹⁹, Schadendorf y cols.³¹⁶ y Bleiweiss y cols.³²³, que solo detectan estos tipos virales en los condilomas que estudian. Esto apoya el carácter benigno de este tipo de lesiones, que en muchas ocasiones regresan espontáneamente y en muy raras ocasiones progresan hacia una malignidad.

Kasher y Roman²⁰³ citan varios carcinomas epidermoides de vulva positivos para HPV 6 como casos muy raros en los que se detecta una duplicación de la región URR del genoma de este tipo viral. De los tres carcinomas estudiados por nosotros ninguno fue positivo para HPV 6/11, pero sí lo fueron un VIN I y un VIN II.

Aunque en la literatura revisada hemos encontrado varios trabajos en los que se describen infecciones múltiples en condilomas acuminados de vulva^{119,316,331}, ningún autor cita una infección por tres tipos virales de tres grupos de riesgo distintos. Nosotros encontramos una pieza positiva para las tres sondas correspondiente a una mujer de 24 años de edad, con múltiples parejas sexuales, que presentaba varios condilomas en vulva y región perianal. Las tres reacciones positivas no se observaron, sin embargo, en sendos condilomas, sino en zonas distintas de una misma pieza. Este condiloma podría haberse originado como respuesta a una infección inicial por un sólo tipo de HPV y posteriores infecciones sobreañadidas por los otros dos tipos virales, o bien por la confluencia de tres

lesiones muy próximas producidas cada una de ellas por un tipo viral distinto.

Por último, merece la pena mencionar el porcentaje relativamente elevado de positividad para los tipos 31/33/51 de HPV en comparación con lo publicado por otros autores^{119,316,323,331,338}.

V.4.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

El primer punto a resaltar es la diferencia estadísticamente significativa en la distribución de tipos virales por lesiones ($p < 2 \times 10^{-5}$), reflejado perfectamente en la figura IV.15 y que justifica el agrupamiento de los distintos tipos de HPV en grupos de riesgo. Así, el porcentaje de detección de los tipos 6/11 de bajo riesgo es máximo en lesiones benignas (condilomas acuminados), disminuye en lesiones con potencialidad de evolución maligna a medida que aumenta el grado de la lesión y es nulo en carcinomas epidermoides. Con los tipos 16/18 de alto riesgo sucede lo contrario ya que no hemos obtenido ningún condiloma acuminado positivo para estos tipos de HPV y son los más frecuentes en HSIL. Los tipos 31/33/51 de riesgo intermedio se han detectado en todas las lesiones estudiadas sin una gran variación en sus respectivos porcentajes (33%-55%).

En la tabla V.II se comparan nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en varios países, incluido España, con sondas que cubren los tres grupos de riesgo.

Lo más llamativo de esta tabla es que en nuestro estudio hemos observado en todas las lesiones un porcentaje de positividad para los tipos de riesgo intermedio superior al publicado por la mayoría de los autores en el extranjero, hasta el punto de que son los tipos más frecuentes en LSIL y carcinomas epidermoides, contrariamente a lo encontrado en la literatura internacional, en la que en estas lesiones predominan los tipos de alto riesgo. Únicamente Gitsch y cols.³³⁹, en Austria, obtienen unos resultados muy similares a los nuestros en CIN.

| AUTOR ¹ Y PAIS | TIPOS VIRALES | LESION | | | |
|--|------------------|-----------|-------------------|-------------------|-----------|
| | | Condiloma | LSIL ² | HSIL ³ | Carcinoma |
| Pao ³¹⁴ (China) | 6/11 | 63.2 | 20 | | 12.5 |
| | 16/18 | 20.7 | 63.3 | | 62.5 |
| | 31/33 | 16.1 | 16.7 | | 25 |
| Lorincz ²⁰⁷ (EEUU, Brasil y Perú) | 6/11 | | 11.8 | 20 | --- |
| | 16/18 | | 23.5 | 60 | 71.9 |
| | 31 | | 17.6 | 13.3 | 6.2 |
| Reid ³³⁸ (EEUU) | 6/11 | 78.6 | 42.9 | 12.7 | --- |
| | 16/18 | 7.1 | 28.6 | 60 | 80 |
| | 31 | --- | 14.3 | 14.5 | 10 |
| Nuovo ³³¹ (EEUU) | 6/11 | | 20 | --- | |
| | 16/18 | | 33 | 69 | |
| | 31/33/35 | | 30 | 28 | |
| Cooper ^{329, 330} (Sudáfrica) | 6/11 | | | --- | --- |
| | 16/18 | | | 63.9 | 100 |
| | 31/33/35 | | | 36.1 | --- |
| Cooper ^{329, 330} (Inglaterra) | 6/11 | | | --- | --- |
| | 16/18 | | | 84 | 80 |
| | 31/33/35 | | | 16 | 20 |
| Gitsch ³³⁹ (Austria) | 6/11 | | 16.6 | | |
| | 16/18 | | 40.5 | | |
| | 31/33 | | 42.9 | | |
| Riera ³³⁵ (España) | 6/11 | | 20 | | |
| | 16/18 | | 50 | | |
| | 31/35/51 | | 60 | | |
| Ochotorena ³¹⁹ (España) | 6/11 | 100 | --- | --- | |
| | 16/18 | --- | 33.3 | 77.1 | |
| | 31/33/51 | --- | 83.3 | 51.4 | |
| Gómez (España) | 6/11 | 70.8 | 27.7 | 10 | --- |
| | 16/18 | --- | 34 | 50 | 36.4 |
| | 31/33/51 | 33.3 | 44.7 | 40 | 54.5 |

¹ Primer autor del trabajo y país del que proceden las muestras estudiadas.

² LSIL/CIN I.

³ HSIL/CIN II - CIN III.

Tabla V.ii. Comparación de los resultados porcentuales obtenidos por diversos autores en lesiones cervicales mediante HIS-tipado para HPV.

Es posible que estas diferencias de porcentajes sean debidas a que en la mayor parte de los trabajos revisados las sondas correspondientes al grupo de riesgo intermedio cubren menos tipos virales o algún tipo distinto que la empleada por nosotros. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Riera y cols.³³⁵ en Asturias y por Ochotorena³¹⁹ en Murcia, por lo que otra posible explicación es una mayor incidencia de los tipos de HPV de riesgo intermedio en España, aunque con los datos que disponemos no podemos saber si predomina uno solo de los tipos incluidos en la sonda o son los tres los que son más habituales en nuestro medio geográfico.

Por lo que respecta a la infección múltiple, prácticamente en todos los trabajos consultados se mencionan casos de infección por 2 ó más tipos de HPV, pero los porcentajes varían mucho de unos autores a otros, ya que este parámetro está muy influenciado por la técnica utilizada y por las características epidemiológicas de la población estudiada. En nuestro trabajo se detectó infección múltiple en el 8.2% de las biopsias HPV-positivas, valor similar al obtenido por Bleiweiss y cols.³²³ (9%).

V.5. PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION *IN SITU*.

V.5.1. PATRON DE MARCAJE.

Cooper y cols.³²⁹, en 1991, describieron por primera vez la existencia de tres tipos de reacción positiva por hibridación *in situ*, a los que denominaron tipo 1 ó difuso, tipo 2 ó puntual y tipo 3 ó mixto. Estos autores asumieron en un principio la hipótesis de que la señal de tipo 2 podía representar la integración del genoma de HPV en el de la célula infectada. Esta hipótesis se basaba en tres observaciones:

- En células CaSki y HeLa, con múltiples copias de HPV integradas, la señal que se obtiene por hibridación *in situ* es de tipo puntual.
- En todos los carcinomas epidermoides HPV-positivos que ellos estudiaron la señal obtenida era de tipo puntual.
- En figuras mitóticas de un carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado observaron señales puntuales apareadas, que interpretaron como reacciones positivas en cromátidas hermanas.

Para confirmar esta hipótesis, los mismos autores³⁴⁰ determinaron el estado físico del genoma de HPV mediante Southern blot y análisis de restricción en 11 biopsias cervicales: 7 CIN y 4 carcinomas epidermoides. En las biopsias en las que obtuvieron una señal tipo 1 por hibridación *in situ* demostraron la existencia de ADN episómico de HPV, en las que obtuvieron una señal de tipo 2 demostraron la existencia de ADN integrado de HPV y en las que obtuvieron una señal de tipo 3 demostraron la existencia de ADN episómico e integrado de HPV. En este trabajo Cooper y cols.³⁴⁰ concluyen que cada tipo de señal se corresponde con un estado físico del genoma de HPV.

Nosotros también hemos observado estos tres tipos de reacciones positivas por hibridación *in situ*, pero con algunas diferencias respecto de Cooper y cols. Concretamente, estos autores aplican la terminología "señal tipo 1, 2 ó 3" indistintamente a células individuales y tejidos. Nosotros distinguimos ambos niveles:

A nivel celular únicamente consideramos dos tipos de marcaje: uniforme (todo el núcleo muestra una reacción positiva homogénea) y puntual (la reacción positiva se observa en forma de puntos intranucleares). Las células que presentan un núcleo con una reacción positiva uniforme y 1 ó varios puntos más intensos se consideran con marcaje uniforme a diferencia de Cooper y cols. que las consideran señal tipo 3 ó mixta.

A nivel de tejido, y según el tipo de células positivas predominante, sí consideramos tres tipos distintos de lo que hemos denominado "patrón de marcaje": patrón uniforme, que equivale a la señal tipo 1 de Cooper y cols.³²⁹; patrón puntual, que equivale a la señal tipo 2 de Cooper y cols.³²⁹; patrón mixto, que equivale parcialmente a la señal tipo 3 de Cooper y cols.³²⁹, ya que sólo se considera este tipo de patrón de marcaje cuando en la biopsia se observan unas células con marcaje uniforme y otras con marcaje puntual en proporciones similares. Cuando predominan células en las que se combinan ambos tipos de marcaje hemos considerado un patrón de marcaje uniforme, a diferencia de Cooper y cols.³²⁹ que lo consideran también señal tipo 3.

La explicación que nosotros sugerimos para la existencia de estos tres patrones de marcaje no coincide con la hipótesis de Cooper y cols.³⁴⁰. En nuestra opinión, el tipo de marcaje está relacionado con el número de copias del genoma de HPV/célula, independientemente de su estado físico. Así, el marcaje uniforme reflejaría un número elevado de copias de HPV y el puntual un número reducido de copias que, probablemente, en muchas ocasiones coincida con genoma de HPV episómico o integrado, respectivamente (pero no siempre, como suponen Cooper y cols.³⁴⁰).

Esta hipótesis permite explicar algunos casos que tendrían difícil explicación con la propuesta por Cooper y cols.³⁴⁰ Concretamente, en algunas piezas se observa un marcaje puntual muy débil en células basales y parabasales, un marcaje uniforme de poca intensidad en células del tercio medio del epitelio y un marcaje uniforme muy intenso en células superficiales. Según la hipótesis de Cooper y cols.³⁴⁰ esto reflejaría integración del genoma viral en las células basales y parabasales y mantenimiento de la forma episómica en células de los tercios superior y medio del epitelio. Sin embargo, parece más lógico suponer que, de acuerdo con la biología viral, el número de copias del genoma de HPV en células basales (la infección se inicia en estas células) y parabasales (a este nivel se transcriben los genes reguladores de HPV y se inicia la replicación de su ADN) es bajo y aumenta progresivamente a medida que se produce la maduración celular, siendo máximo en las células de capas superficiales, en las que se

efectúa el ensamblaje de los nuevos viriones. En nuestro estudio, todas las biopsias en las que se observó esta gradación se contabilizaron como patrón de marcaje uniforme, puesto que el número de células con este tipo de marcaje era, globalmente, muy superior al de células con marcaje puntual.

Un caso distinto es el de biopsias con patrón de marcaje mixto en las que en las mismas capas celulares del tercio superior del epitelio se observan unas células con marcaje uniforme y otras con marcaje puntual. Según nuestra hipótesis, el comportamiento del virus en esas lesiones variaría de unas células a otras: mientras que en unas, probablemente, se llevaría a cabo el ciclo viral completo (marcaje uniforme), en otras este ciclo viral se habría interrumpido, posiblemente por integración del genoma vírico en el de la célula infectada, por lo que el número de copias de HPV se mantendría bajo (marcaje puntual). En este caso nuestra hipótesis coincidiría con la de Cooper y cols.³⁴⁰

En las células con ambos tipos de marcaje simultáneo, según Cooper y cols.^{329,330,340} coexisten ambos estados físicos del genoma de HPV. En nuestra opinión esto no tiene por qué ser necesariamente así. De hecho, con microscopía electrónica se observan, en células infectadas por HPV, acúmulos de partículas víricas intranucleares formando pseudocristales, además de partículas víricas aisladas. En estas células, en las que se está produciendo el ensamblaje de nuevos virus, es muy probable que haya un gran número de copias episómicas del genoma de HPV, lo que determinaría un marcaje uniforme por hibridación *in situ*, a la vez que esos acúmulos de partículas víricas podrían originar señales puntuales de gran intensidad. Dado que, en cualquier caso, el número de copias de HPV probablemente es elevado, nosotros consideramos estas células con marcaje uniforme, como ya se ha mencionado antes.

Lo que sí parece claro es que los tres patrones de marcaje reflejan distintas situaciones de la infección por HPV y no son consecuencia de factores ajenos a la biología viral, como son variaciones en la manipulación y procesamiento de las muestras o en la realización de la técnica. En este sentido, en la literatura revisada únicamente hemos encontrado dos grupos que hagan

referencia a tipos de marcaje, y ambos emplean técnicas de hibridación *in situ* diferentes entre sí y distintas de la empleada por nosotros: Cooper y cols.^{329,330,340}, ya citados, que usan sondas marcadas con digoxigenina y detección del marcaje en tres pasos y, muy recientemente, Pöllänen y cols.³⁴¹, que asumen la terminología de Cooper y que emplean un equipo comercial basado en sondas biotiniladas distinto del nuestro.

En definitiva, creemos que la observación del patrón de marcaje aporta una valiosa información en el estudio de la infección por HPV, bien respecto al número de copias de HPV/célula, bien respecto al estado físico de éstas (y, probablemente, respecto de ambas en muchas ocasiones). Cooper y cols.³⁴⁰ apuntan que las lesiones con señal puntual pueden evolucionar peor, pero no han realizado ningún estudio estadístico al respecto, ni han relacionado tipos virales con tipos de marcaje. Nosotros pensamos que lesiones de igual grado, con patrones de marcaje diferente pueden evolucionar de distinta forma, razón por la que hemos efectuado un estudio con fines pronósticos.

V.5.1.1. Biopsias de vulva.

Los resultados obtenidos en vulva apuntan hacia una distribución asimétrica de los patrones de marcaje en las distintas lesiones. Mientras que en la mayoría de los condilomas acuminados (20 de 22) se observó un patrón uniforme, en los tres carcinomas epidermoides se observó un patrón puntual.

Por lo que respecta a la relación de los patrones de marcaje con los tipos virales detectados, todas las biopsias en las que se observó un patrón puntual fueron positivas para los tipos 31/33/51 de HPV o para tipos no cubiertos con las sondas utilizadas. En contraposición, en todos los casos, excepto uno, en que se demostró la existencia de los tipos 6/11 de HPV el patrón observado fue uniforme.

V.5.1.2. Biopsias de cérvix uterino.

Al estudiar la distribución de patrones de marcaje en los distintos tipos de lesión (fig. IV.20) se observa una clara tendencia hacia un mayor porcentaje del patrón puntual a medida que aumenta el grado de la lesión, siendo mínimo en condilomas acuminados y máximo en carcinomas epidermoides. Sin embargo, estadísticamente no hay una diferencia significativa, posiblemente por el pequeño número de carcinomas estudiado.

En donde sí se demuestra una diferencia estadísticamente significativa es en la relación entre patrón de marcaje y tipo viral (fig. IV.21), con una clara asociación entre los tipos de bajo riesgo y el patrón uniforme por un lado, y los tipos de riesgo intermedio y alto (sobre todo los primeros) y el patrón puntual. Hay que destacar, en este sentido, que no hemos encontrado ninguna biopsia positiva para los tipos 6/11 de HPV con un patrón puntual.

Todo esto nos induce a pensar que las lesiones en las que se detecta un marcaje puntual por hibridación *in situ* pueden tener peor pronóstico que aquellas lesiones de igual grado y producidas por el mismo tipo viral pero que presentan un marcaje uniforme. Una posible justificación de esta idea se basaría en la hipótesis formulada antes de que el patrón puntual refleja un bajo número de copias de HPV/célula, con lo que ello implica de no realización del ciclo viral completo y posible integración en el genoma de la célula infectada. Esta teoría se apoyaría también en la relación observada entre patrones de marcaje y resultados de la técnica de inmunohistoquímica (tabla IV.XVII), puesto que prácticamente todas las biopsias con patrón puntual (47 de 49) fueron negativas por inmunohistoquímica y, por lo tanto, corresponden a infecciones no productivas.

Hay un resultado que merece una mayor explicación para validar esta teoría: la observación de 7 condilomas acuminados con marcaje puntual (30.4% del total de condilomas). Los condilomas acuminados son lesiones benignas que muy raramente evolucionan hacia lesiones de más alto grado y malignidades y,

por supuesto, el porcentaje de progresión es muy inferior al 30%. Según la hipótesis de Cooper y cols.³⁴⁰ el genoma viral se encontraría de forma integrada en estas biopsias y, sin embargo, no progresarían. Esto invalidaría el patrón de marcaje como factor pronóstico.

Según nuestra hipótesis es posible otra explicación. Todos los condilomas con patrón puntual fueron positivos para los tipos 31/33/51 de HPV. Estos tipos de riesgo intermedio se caracterizan, según Lorincz y cols.²⁰⁷, porque las lesiones que producen evolucionan muy lentamente. Este hecho puede ser el reflejo de una tasa de replicación muy baja, que determinaría un número bajo de copias de su genoma, incluso en infecciones productivas. De hecho, uno de esos 7 condilomas acuminados fue positivo por inmunohistoquímica. Es posible, por tanto, que para estos tipos virales el patrón de marcaje tenga diferente significación en lesiones benignas y lesiones premalignas y malignas. De todas formas, si tenemos en cuenta que los tipos 31/33/51 son los más frecuentes en carcinomas epidermoides en nuestra casuística, seguimos manteniendo que el patrón de marcaje puede ser un buen factor pronóstico sobre la evolución de una lesión.

V.5.1.3. Resultados globales.

Dado que tanto en vulva como en cérvix uterino se ha observado la misma tendencia, se han considerado los resultados conjuntos para intentar obtener mayor información. Una vez comprobado que hay diferencia estadística significativa en la distribución de los tres patrones de marcaje en cada tipo de lesión ($p < 0.003$), los datos se agruparon para poder estudiar tablas de contingencia de 2x2, considerando las lesiones por parejas (tablas IV.XVIII y IV.XIX).

En primer lugar se estudió la relación entre el patrón de marcaje puntual y el grado histológico de la lesión. Se utilizó la razón de ventaja como medida de la

asociación entre ambos parámetros. Los valores obtenidos demuestran una elevada asociación entre el patrón puntual y el carcinoma epidermoide, lo que sugiere que este parámetro puede ser considerado como un factor de riesgo en la evolución de una lesión hacia una malignidad, en el sentido de que una biopsia diagnosticada de SIL en la que se observe un patrón de marcaje puntual por hibridación *in situ* tiene una probabilidad mayor de evolucionar a carcinoma epidermoide que otra lesión de igual grado histológico en la que se observe un patrón de marcaje uniforme o mixto. Una medida indirecta de esta probabilidad es el riesgo relativo, que en este caso es suficientemente elevado (3.82) como para considerar el patrón de marcaje como un factor pronóstico.

En segundo lugar, se repitió este estudio considerando conjuntamente los patrones puntual y mixto, ya que en las biopsias en las que se detecta este último hay una población celular importante que contiene, presumiblemente, un número bajo de copias de HPV y, por lo tanto, pueden evolucionar de forma similar a una lesión con patrón puntual. En efecto, se demuestra una fuerte asociación entre ambos patrones y el carcinoma epidermoide (razón de ventaja de riesgo 10.69 cuando se comparan carcinomas y SIL) y el riesgo relativo de evolución de SIL a carcinoma es también mucho mayor (8.52).

En nuestra opinión, las SIL HPV-positivas por hibridación *in situ* con un patrón de marcaje puntual o mixto tienen, por tanto, peor pronóstico que aquéllas en las que se observa un patrón uniforme o, dicho de otra manera, tienen mayor riesgo o probabilidad de evolucionar a carcinoma epidermoide.

V.5.2. PATRON DE DISTRIBUCION DE LAS CELULAS POSITIVAS.

En 1988 Wilbur y cols.¹¹⁹ mencionan que el número y distribución de células positivas por hibridación *in situ* varía mucho de unas lesiones a otras, desde una sola célula positiva hasta prácticamente el 100% de las células, aunque la mayor parte de las biopsias mostraban varios grupos de 10-20 células positivas.

Nosotros también hemos observado esta característica morfológica de la hibridación *in situ*, a la que hemos llamado "patrón de distribución" y hemos considerado dos patrones diferentes: multifocal y aislado. La explicación de los mismos con respecto a la biología viral no está muy clara. Wilbur y cols.¹¹⁹ consideran que es el reflejo de una microheterogeneidad de expresión de HPV, pero no explican la causa de la misma.

Parece claro que, a diferencia del patrón de marcaje, no existe una relación directa entre número de copias de HPV/célula y patrón de distribución, ya que, por un lado, hemos observado dos carcinomas con un patrón de distribución multifocal en los que todas las células positivas presentaban un único punto intranuclear (patrón de marcaje puntual), por lo que se presupone un número muy bajo de copias/célula; por otro lado, en varias biopsias con diversos diagnósticos se combinan un patrón de distribución aislado con un patrón de marcaje uniforme.

Sí parece existir cierta relación entre patrón de distribución aislado e infección no productiva, puesto que la mayor parte de las biopsias con este patrón (68 de 73) fueron negativas por inmunohistoquímica. Sin embargo, la relación contraria entre patrón multifocal e infección productiva no se observa, ya que el porcentaje de biopsias con este patrón positivas y negativas por inmunohistoquímica es similar (55.3% y 44.7%, respectivamente).

Una posible explicación se basa en el propio mecanismo de infección. Actualmente se asume que la infección por HPV se inicia en las células de la capa basal y que el virus alcanzaría esta capa a través de alteraciones o microlesiones del epitelio⁹⁶. Estas células son permisivas pero en ellas no se puede llevar a cabo la síntesis de nuevos viriones, pues para ello se necesita un microambiente celular que únicamente se da en células epiteliales maduras (queratinocitos). Una vez que el ADN vírico alcanza el núcleo de la célula infectada, comienza la síntesis de proteínas reguladoras y la replicación vírica, de forma que todas las células epiteliales que se deriven de ella estarán infectadas. Si se producen infecciones simultáneas de varias células basales próximas, a partir de ellas se originarán grupos o clones de células infectadas, que puede

traducirse en un patrón de distribución multifocal o parcheado al realizar una técnica de hibridación *in situ*. Puede ocurrir también que una célula basal infectada entre en mitosis antes de que comience la replicación del ADN viral, de manera que el material genético vírico se incorpore exclusivamente en una célula que haya perdido la capacidad de dividirse. Esto daría lugar a un patrón de distribución aislado. Otra posibilidad es que la infección inicial afecte también a células parabasales inmaduras, todavía permisivas, pero sin capacidad de división, lo que igualmente daría lugar a un patrón de distribución aislado.

Es muy posible que el patrón de distribución no tenga una única explicación sino que sea el reflejo de un cúmulo de factores. Es probable que la respuesta inmune local juegue un papel muy importante. En algunas biopsias se observan infiltrados linfocitarios locales que en muchas ocasiones coinciden con zonas negativas por hibridación *in situ* o positivas con un patrón aislado, hecho que también han descrito Ochotorena³¹⁹ y Toki y Yajima³⁴².

V.5.2.1. Biopsias de vulva.

Al igual que ocurriría con el patrón de marcaje, los resultados obtenidos en vulva apuntan hacia una distribución asimétrica de este parámetro, puesto que en condilomas acuminados predomina el patrón multifocal, mientras que en todos los carcinomas se observó un patrón aislado.

V.5.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

Los resultados obtenidos en piezas de cérvix confirman la tendencia observada en vulva. Mientras que en condilomas acuminados predomina el patrón multifocal, en SIL y carcinomas predomina el patrón aislado. Esta dualidad, que se observa claramente en la figura IV.29 se traduce en una diferencia estadísticamente significativa entre condiloma y SIL. Por el contrario, no hay

diferencia significativa entre SIL y carcinomas.

Al estudiar conjuntamente los resultados de vulva y cérvix se obtiene una diferencia significativa ($p < 0.005$) cuando se consideran los resultados globalmente, lo que indica que hay una relación entre el patrón de distribución y el tipo de lesión. Sin embargo, este dato únicamente refleja la dualidad ya señalada, puesto que cuando se estudian las lesiones por parejas hay diferencia significativa entre condilomas y SIL ($p < 0.003$) pero no la hay entre SIL y carcinomas.

Para que un parámetro se pueda considerar un buen factor pronóstico tiene que cumplir dos requisitos: su distribución en las distintas lesiones debe reflejar, globalmente, una diferencia significativa estadísticamente y ello se debe traducir en diferencias igualmente significativas cuando se consideran las lesiones por parejas. Esto permite cuantificar de alguna manera el riesgo de que una lesión intraepitelial evolucione hacia carcinoma.

En el caso del patrón de distribución se cumple sólo uno de los dos requisitos, por lo que no parece ser un buen factor pronóstico, al menos cuando se considera de forma aislada.

Cuando se estudia la relación entre patrón de distribución y los tipos virales detectados se observa una dualidad similar: hay una clara asociación entre el patrón multifocal y los tipos de bajo riesgo y entre el patrón aislado y los tipos de riesgo intermedio y alto, que estadísticamente se traduce en diferencias significativas entre los tipos 6/11 y 16/18 ó 31/33/51 de HPV. No hay, en cambio, diferencias entre los tipos 16/18 y 31/33/51.

V.5.3. POSICION RELATIVA DE LAS CELULAS POSITIVAS EN EL GROSOR DEL EPITELIO.

Al describir los resultados obtenidos con hibridación *in situ* numerosos autores señalan que la reacción positiva puede afectar a células de todas las capas del epitelio, aunque lo más frecuente es que afecte sólo a células del tercio superior.

Nosotros también hemos observado este fenómeno y hemos agrupado las muestras en tres categorías según el tercio de epitelio (superior, medio o inferior) en el que se encontraron células positivas más próximas a la capa basal. Como en el caso del patrón de marcaje, es posible que esta característica morfológica de la hibridación *in situ* esté relacionada con el número de copias de HPV/célula, que se espera sea bajo en las células del tercio inferior del epitelio y elevado en las del tercio superior. En la literatura revisada no hemos encontrado ningún trabajo en el que se relacione este parámetro con la evolución de las lesiones.

V.5.3.1. Biopsias de vulva.

Los resultados obtenidos en vulva muestran una clara asociación entre la presencia de células positivas en el tercio medio del epitelio y condilomas acuminados, por un lado, y los tipos 6/11 de HPV, por otro lado.

V.5.3.2. Biopsias de cérvix uterino.

En la mayor parte de las biopsias HPV-positivas se observaron células marcadas en los tercios superior y medio del epitelio, independientemente de la lesión diagnosticada y del tipo viral detectado. Esto se traduce en que las diferencias encontradas entre las lesiones consideradas o entre los tres grupos virales de riesgo no son estadísticamente significativas. En consecuencia, no se

puede considerar esta característica como factor pronóstico.

V.5.4. RELACION ENTRE EL PATRON DE MARCAJE Y EL PATRON DE DISTRIBUCION.

Como hemos comentado anteriormente, el patrón de distribución no puede ser utilizado de forma aislada como factor pronóstico, pues aunque hay una gran diferencia entre los resultados obtenidos en lesiones benignas y SIL, la diferencia entre SIL y carcinomas no es significativa. Sin embargo, ante la posibilidad ya planteada de que este parámetro esté relacionado con el mecanismo de infección o la respuesta inmune local, hemos estudiado conjuntamente el patrón de marcaje y el patrón de distribución para ver si de esta manera se consigue mayor significación estadística.

En efecto, tras agrupar los datos de vulva y cérvix en tablas de contingencia de 2x2 se observa una asociación entre la combinación patrón de marcaje puntual/patrón de distribución aislado y el carcinoma epidermoide (razón de ventaja 4.11 cuando se la compara con SIL). Esto se traduce en un riesgo relativo de evolución de SIL a carcinoma de 3.35 para aquellas piezas en las que se observen ambos patrones.

En consecuencia, el patrón de marcaje, tanto de forma aislada, como asociado con el patrón de distribución es un buen indicador del riesgo de evolución de una lesión.

Por lo que respecta a la relación de estos dos patrones con los tipos virales hay que destacar por un lado la asociación de la combinación uniforme/multifocal con los tipos 6/11 de HPV y por otro lado la asociación de la combinación puntual/aislado con los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

Una vez más, hay diferencia significativa entre los tipos de bajo riesgo y

riesgo intermedio o alto, pero no la hay entre los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

V.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS.

Una parte importante del presente trabajo consiste en la realización de estudios comparativos, tanto entre las técnicas utilizadas como entre muestras con distintas características histopatológicas o distintas procedencias. Para ello se han considerado sólo las biopsias con más de 5 mm de epitelio, a fin de que las conclusiones obtenidas tengan la mayor validez posible.

V.6.1. COMPARACION ENTRE INMUNOHISTOQUIMICA E HIBRIDACION *IN SITU*.

Antes de comparar ambas técnicas conviene analizar brevemente los resultados obtenidos con cada una de ellas por separado, ya que estamos manejando datos correspondientes a la situación ideal (longitud de epitelio superior a 5 mm).

Con respecto a la inmunohistoquímica se observa un aumento de la sensibilidad en condilomas acuminados, que pasa del 58.1% en vulva y 53.8% en cérvix uterino cuando se consideran todas las biopsias al 62.1% y 60.9%, respectivamente, al considerar sólo biopsias con más de 5 mm de epitelio. Esta sensibilidad está muy próxima a la obtenida por Schadendorf y cols.³¹⁶ (69%) y es igual a la obtenida por Jou y cols.³¹⁸ en España (60%) en condilomas acuminados de cérvix.

Por lo que respecta a la hibridación *in situ*, en cérvix uterino se observa un sensible aumento en el porcentaje de positividad en LSIL, que pasa del 52.2% en el total de biopsias al 68.4% en piezas con más de 5 mm de epitelio, y HSIL, que pasa del 76.9% al 86.8%. Estos resultados son comparables a los obtenidos

por otros autores con técnicas en teoría más sensibles. Así, Lorincz y cols.²⁰⁷, con Southern blot, obtienen unos resultados prácticamente iguales a los nuestros en CIN I (70.8%) y CIN II + CIN III (88.2%) y ligeramente inferiores en carcinomas escamosos (82.1%). Riou y cols.³⁴³, con Southern blot y PCR, obtienen un 83.1% de carcinomas escamosos positivos, porcentaje que asciende al 87.7% cuando consideran sólo muestras procedentes de Argel, pero que en cualquier caso es inferior a nuestro resultado. Iwasaka y cols.³⁴⁴, también con una combinación de Southern blot y PCR, obtienen un 94.7% de positividad en carcinomas cervicales, ligeramente superior a nuestro 91.7%.

Esto constituye una prueba más a favor de la importancia que tiene el tamaño de una biopsia, y más concretamente la longitud de epitelio presente en la misma, para que los resultados de la hibridación *in situ* sean lo más fiables posible y comparables con la técnica de referencia.

Al discutir los resultados de la hibridación *in situ* en el total de biopsias se comentó que la sensibilidad calculada para la técnica en condilomas acuminados de cérvix (92.3%) todavía no podía extrapolarse a otras lesiones. Pues bien, ahora sí estamos en condiciones de poder hacerlo. Al aplicar un test estadístico a los resultados obtenidos en las distintas lesiones se obtiene que existe una diferencia significativa ($p < 0.02$). Si nos fijamos en la figura IV.41 se aprecia que esta diferencia se debe al peor resultado obtenido en LSIL (68.4%) en comparación con el resto de lesiones. De hecho, si repetimos el test estadístico considerando conjuntamente LSIL y HSIL o sin considerar las LSIL, las diferencias en los porcentajes de positividad en cada lesión no son significativas. Esto nos permite suponer que la sensibilidad de la hibridación *in situ* en HSIL y carcinomas es muy parecida a la calculada en condilomas acuminados (95.6% en biopsias con más de 5 mm de epitelio) y la podemos situar alrededor del 90%.

Ahora bien, ¿por qué los resultados de la hibridación *in situ* en LSIL no están en concordancia con los del resto de lesiones? No es probable que este resultado sea debido al azar, ya que la diferencia con las otras lesiones es significativa estadísticamente. Además, este fenómeno también ha sido observado

por otros autores, aunque ninguno de ellos lo explica: Faulkner-Jones y cols.³²⁸ obtienen un 33.3% de positividad en CIN I y un 76.9% en CIN II + CIN III; Pao y cols.³¹⁴, 50% en CIN I y 76.9% en CIN II + CIN III; Meyer y cols.³³², 29% en CIN I y 69% en CIN II + CIN III; y Ochotorena³¹⁹, 12% en CIN I y 37.2% en CIN II + CIN III.

Una posible explicación es que parte de las lesiones diagnosticadas de LSIL pueden representar lesiones de grado superior (HSIL) en período de regresión. Nasiell y cols.²¹¹, en un estudio de seguimiento a largo plazo de 894 pacientes con displasia moderada, observaron regresión en el 54% de los casos. La regresión de una lesión depende en gran medida de una buena respuesta inmune, en este caso a nivel local, que muy probablemente negativizaría la detección de HPV por hibridación *in situ*. Esta teoría se ve apoyada indirectamente por los resultados de varios autores: Toki y Yajima³⁴² encontraron en lesiones cervicales una asociación estadísticamente significativa entre ausencia de inmunorreactividad y la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio y Ochotorena³¹⁹ encontró una asociación significativa entre la presencia de infiltrado inflamatorio intenso y CIN I, lesiones en las que obtuvo el porcentaje más bajo de positividad por hibridación *in situ* (12%). Nosotros también hemos observado un infiltrado linfocitario en algunas LSIL HPV-negativas, pero no en todas.

Otra explicación es que parte de las lesiones diagnosticadas de LSIL no son producidas por HPV, pero este punto lo trataremos un poco más adelante al comentar los resultados obtenidos en biopsias compatibles y no compatibles con infección por HPV.

Al comparar ambas técnicas se observa que el número de muestras positivas por inmunohistoquímica es siempre menor que por hibridación *in situ*, tanto en vulva como en cérvix (diferencias estadísticamente significativas). El valor más elevado de sensibilidad de la inmunohistoquímica frente a la hibridación *in situ* se obtiene en condilomas acuminados de vulva (72%). En cérvix, el valor más elevado se obtiene también en condilomas acuminados (63.6%) y disminuye

de manera importante en LSIL (25.6%) y HSIL (12.1%), siendo nulo en carcinomas.

Esta gran diferencia de sensibilidad entre ambas técnicas, sobre todo en lesiones de alto grado, junto con la mayor información aportada por la hibridación *in situ* en cuanto al tipo de virus presente en una lesión, ha determinado que en muchos laboratorios de anatomía patológica se abandone la técnica de inmunohistoquímica en el diagnóstico de esta infección. Es evidente que el diagnóstico, como tal, no puede hacerse con esta técnica, pero nosotros consideramos que debería utilizarse como técnica complementaria, ya que aporta una información muy útil que no puede obtenerse mediante hibridación *in situ*: la naturaleza productiva o no productiva de una infección por HPV. Este dato puede constituir otro importante factor pronóstico, pues, como se comprueba en la tabla IV.XXIX, las diferencias en los resultados obtenidos por lesiones son estadísticamente significativas y al estudiarlas por parejas se obtiene una fuerte asociación entre resultado positivo por inmunohistoquímica y lesiones benignas y viceversa, resultado negativo por inmunohistoquímica y lesiones con potencialidad de evolución maligna (razón de ventaja de riesgo 7.25). El hecho de que no se obtenga una diferencia significativa entre SIL y carcinomas es debido probablemente al bajo número de carcinomas estudiado y ello nos impide dar una medida estadística del riesgo o probabilidad de que una SIL IHQ-negativa evolucione hacia carcinoma. Sin embargo, dada la tendencia tan clara observada en el sentido de disminución de inmunorreactividad con el grado histológico de la lesión, creemos que el resultado inmunohistoquímico debe ser considerado un importante factor pronóstico.

Al comparar la inmunohistoquímica con HIS-tipado se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 10^{-6}$) en la sensibilidad de la inmunohistoquímica respecto de los distintos tipos virales. Hay una clara asociación entre tipos 6/11 de HPV y resultado positivo por inmunohistoquímica y entre tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV y resultado negativo. Esta es una prueba más de que los tipos de riesgo intermedio y alto producen con mayor frecuencia infecciones no productivas. De nuevo no hay diferencias significativas entre los

tipos 16/18 y 31/33/51.

Es posible que una parte de las lesiones IHQ-negativas, sobre todo los condilomas acuminados, represente lesiones en regresión a consecuencia de una respuesta inmune adecuada.

Esta claro que una paciente con una lesión HPV-positiva por hibridación *in situ* debe considerarse potencialmente infectante, pero si la técnica de inmunohistoquímica es también positiva debe considerarse como altamente infectante y tomar las medias oportunas para evitar el contagio de sus parejas sexuales.

V.6.2. COMPARACION ENTRE BIOPSIAS COMPATIBLES Y NO COMPATIBLES HISTOPATOLOGICAMENTE CON INFECCION POR HPV.

A la vista de los datos de las tablas IV.XXX y IV.XXXI lo primero que hay que señalar es que los criterios histopatológicos de compatibilidad con infección por HPV son muy poco específicos, puesto que en vulva todas las lesiones no compatibles con infección por HPV son positivas por hibridación *in situ* y en cérvix no hay diferencia significativa estadísticamente entre los resultados de esta técnica en ambos tipos de lesión.

Si analizamos un poco más detenidamente ambas tablas comprobamos que tan sólo un carcinoma de vulva fue positivo por inmunohistoquímica (y como ya se ha mencionado en una localización ajena al tejido neoplásico); el resto de lesiones no compatibles con infección por HPV en ambas localizaciones anatómicas fue IHQ-negativo. Esto parece indicar que los criterios de compatibilidad con infección por HPV son el reflejo de alteraciones celulares, relacionadas con la interacción virus-célula, características de infecciones productivas. Ahora bien, si esto es cierto ¿cómo se explica el reducido número

de LSIL y HSIL compatibles con infección por HPV y positivas por inmunohistoquímica? Según Monsonégo¹⁰⁰, el proceso de carcinogénesis inducida por HPV puede seguir dos vías diferentes: una vía rápida, muy rara, en la que la integración del genoma de HPV se produciría al poco tiempo de la infección y daría lugar al desarrollo rápido de carcinomas epidermoides, sin pasar prácticamente por estadios preneoplásicos (SIL); y otra vía lenta, la más habitual, en la que la integración del genoma de HPV se produciría de una manera progresiva debido a la acción de ciertos cofactores (tabaco, carencia de beta-caroteno, inmunodepresión, etc.) y en la que la aparición de un carcinoma viene precedida de SIL de bajo y alto grado. Esta vía lenta puede desarrollarse a partir de infecciones productivas.

Según esta teoría, las lesiones intraepiteliales compatibles con infección por HPV e IHQ-positivas serían la consecuencia de infecciones productivas benignas; las SIL compatibles con infección por HPV e IHQ-negativas representarían, bien lesiones en regresión por una buena respuesta inmune, bien lesiones productivas en las que se ha iniciado el proceso de integración y han perdido ya la inmunorreactividad, bien lesiones no productivas en las que a consecuencia de la lentitud del proceso de integración, el ciclo viral se ha desarrollado lo suficiente como para que se produzcan las alteraciones celulares típicas de compatibilidad con infección. Las SIL no compatibles con infección por HPV representarían mayoritariamente integración del genoma de HPV.

Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, ya que en lesiones no compatibles con infección únicamente se han detectado virus de riesgo intermedio y alto y además se observa una clara asociación de estas lesiones con el patrón de marcaje puntual por hibridación *in situ* (diferencia estadísticamente significativa con lesiones compatibles con infección, $p < 0.04$). En este punto conviene señalar que la proporción en que se han detectado los tipos 31/33/51 de HPV en lesiones no compatibles es el doble de la de los tipos 16/18. Esto puede ser consecuencia de la baja tasa de replicación de los tipos de riesgo intermedio, ya mencionada con anterioridad, que daría lugar a lesiones histopatológicamente no compatibles, incluso sin integración del genoma vírico.

Por todo ello, creemos que la hibridación *in situ* se debe realizar en todas las biopsias diagnosticadas de SIL, independientemente de que sean compatibles o no con infección por HPV y sugerimos que las SIL no compatibles con infección e HIS-positivas tendrían peor pronóstico que aquellas compatibles con infección.

Otro aspecto interesante de la tabla IV.XXXI es que aunque consideremos sólo las lesiones compatibles con infección por HPV, el porcentaje de positividad por hibridación *in situ* en LSIL es sensiblemente inferior al del resto de lesiones, lo que parece indicar que un porcentaje de LSIL histopatológicamente compatible con infección por HPV tiene una etiología distinta. Esto es hasta cierto punto lógico, ya que la categoría LSIL engloba lesiones en las que la atipia citológica (anisonucleosis, hiper cromatismo) no es muy grande y se observa exclusivamente en el tercio superior del epitelio. Estas alteraciones son producidas no sólo por HPV, sino también por múltiples agentes etiológicos y de ahí que se separen las lesiones compatibles de las que no lo son. Por otra parte, las características hitopatológicas de compatibilidad con infección por HPV^{118,179} (coilocitosis, binucleación o multinucleación, disqueratosis, papilomatosis, contorno nuclear irregular) se encuentran también por separado en otras patologías, algunas de ellas infecciosas¹¹⁷. De hecho un porcentaje importante de pacientes en las que se diagnostican este tipo de lesiones refiere historias de cervicitis de repetición e infecciones por diversos gérmenes. Recientemente Cancelo⁶⁸ encontró que el 69.6% de una población con alteraciones colposcópicas y/o histológicas compatibles con infección por HPV presentaban infección por uno o dos gérmenes. Es posible, pues, que parte de las LSIL compatibles con infección por HPV sean realmente originadas por otros agentes etiológicos. El porcentaje de progresión de estas lesiones sería muy pequeño en comparación con las lesiones producidas por HPV, lo que explicaría el mayor porcentaje de positividad para HPV en HSIL.

V.6.3. COMPARACION ENTRE MUESTRAS DE ARCHIVO Y MUESTRAS DE NUEVA OBTENCION.

Al revisar la literatura se encuentran estudios retrospectivos en los que la hibridación *in situ* se realiza sobre muestras incluidas en parafina con varios años de antigüedad³²⁸⁻³³¹. Todos los autores coinciden en que esta técnica es perfectamente válida para este tipo de estudios, pero los resultados que obtienen varían mucho de un trabajo a otro (ver tabla V.I). Probablemente estas diferencias son debidas a variaciones en las sondas y su marcaje, técnicas de detección, procedencia geográfica de las muestras, características epidemiológicas de las poblaciones estudiadas, etc.

No hemos encontrado, sin embargo, ningún trabajo en el que se comparen los resultados obtenidos en muestras de archivo y de nueva obtención. Nosotros pensamos que la validación de todos los resultados obtenidos en este trabajo y, por lo tanto, de todas las conclusiones, pasa por la confirmación de que realmente no hay diferencia entre un tipo de muestras y otro a la hora de realizar técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

El estudio comparativo realizado demuestra que estadísticamente no hay diferencia entre los resultados de ambas técnicas en los dos tipos de muestras, tanto cuando se consideran los totales como cuando se considera cada lesión por separado.

Esto indica que en tejidos fijados en formol tamponado e incluidos en parafina se conserva perfectamente la antigenicidad para HPV y el ADN vírico no experimenta ningún proceso de degradación (por lo menos durante los años revisados en este estudio). Se puede concluir, pues, que los estudios retrospectivos sobre la infección genital por HPV en este tipo de material son perfectamente válidos.

V.6.4. PROCEDENCIA GEOGRAFICA.

Como ya se ha mencionado, hemos obtenido un porcentaje de lesiones positivas para los tipos 31/33/51 de HPV superior al publicado por otros autores^{207,314,329-331,338} en poblaciones procedentes de diversos países. Para descartar que esto sea debido a una mayor prevalencia de estos tipos en alguna de las procedencias geográficas de que hemos obtenido las muestras, se realizó un estudio comparativo entre los resultados obtenidos en cada una de ellas.

No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en la distribución de los distintos tipos virales por procedencias. En todas ellas el mayor porcentaje correspondió a los tipos 31/33/51, excepto en las muestras procedentes de los Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid, aunque este resultado no es significativo por el reducido número de las mismas.

La concordancia de nuestros resultados con los obtenidos por Riera y cols.³³⁵ en Asturias y por Ochotorena³¹⁹ en Murcia justifican la idea de que en España, o al menos en algunas comunidades autónomas, la tasa de incidencia de los tipos de riesgo intermedio es superior a la encontrada en otros países.

V.7. TECNICA DE DOBLE MARCAJE.

La detección simultánea de antígenos víricos y secuencias génicas específicas de HPV puede ser de gran interés para comprender algunos aspectos de la biología viral y de la interacción virus-célula infectada.

En los últimos años se han publicado varias técnicas que combinan la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*³⁴⁵⁻³⁵¹. Las primeras que se describieron^{345,346} se basaban en la realización secuencial de un método inmunohistoquímico, que empleaba peroxidasa como enzima marcadora y diaminobencidina (DAB) como cromógeno, y de una hibridación *in situ* con sondas

marcadas radioactivamente. Después se sustituyeron las sondas radioactivas por sondas biotiniladas y se desarrollaron varios procedimientos con la finalidad de obtener dos reacciones coloreadas claramente distinguibles. En la tabla V.III se detallan las estrategias utilizadas por varios autores.

El desarrollo de estas técnicas supone solucionar varias cuestiones. En primer lugar hay que decidir el orden en que se realizan ambos métodos. Van der Loos y cols.³⁴⁸ y Graham y cols.³⁵¹ ensayaron varios protocolos en los que cambiaban el orden de realización de la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*. Ambos concluyen que los mejores resultados se obtienen realizando primero la detección antigénica y a continuación la hibridación. Esto es lógico ya que la hibridación implica un calentamiento por encima de los 90°C para desnaturalizar la sonda y el ADN de la muestra, que puede causar una pérdida de antigenicidad en el tejido.

En segundo lugar hay que elegir dos sistemas de revelado que den lugar a dos colores que se puedan discriminar bien uno de otro y que tengan buen contraste respecto de la tinción de fondo. Además la reacción positiva de la inmunohistoquímica debe ser insoluble en alcohol y resistir temperaturas elevadas, pues durante la hibridación hay que deshidratar el tejido y, como ya se ha mencionado, calentar a más de 90°C.

La combinación que proponemos responde perfectamente a estos dos interrogantes: el oro coloidal amplificado con plata es insoluble en alcohol, resiste bien las temperaturas elevadas y su color negro se distingue perfectamente del color rojo del aminoetilcarbazol (AEC).

| AUTOR | INMUNOHISTOQUIMICA | | HIBRIDACION <i>IN SITU</i> | |
|--------------------------------------|------------------------|---|---|---|
| | Detección | Revelado | Detección | Revelado |
| Mullink y cols. ³⁴⁷ | Inmunoperoxidasa | H ₂ O ₂ /DAB ¹ | Estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina | BCIP/NBT ² |
| Van der Loos y cols. ³⁴⁸ | Inmunoperoxidasa | H ₂ O ₂ /DAB | Estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina | BCIP/NBT |
| Cubie y Norval ³⁴⁹ | PAP ³ | H ₂ O ₂ /DAB | Anti-biotina con oro coloidal | Amplificación con plata |
| Van den Brink y cols. ³⁵⁰ | β -galactosidasa | Bromo-cloro-indol- β -D-galactopiranosido | Inmuno-oro | Amplificación con plata |
| Graham y cols. ³⁵¹ | APAAP ⁴ | BCIP/NBT | Estreptavidina-peroxidasa | H ₂ O ₂ /AEC ⁵ |

¹ Diaminobencidina.² Bromo-cloro-indol-fosfato / Azul de nitrotetrazolio.³ Peroxidasa-anti-peroxidasa.⁴ Fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina.⁵ Amino-etil-carbazol.

Tabla V.III. Estrategias utilizadas por diversos autores para combinar inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en un mismo corte de tejido.

Esta técnica posibilitará la realización de nuevos estudios. Por un lado, permite cuantificar mediante análisis de imagen el porcentaje de células infectadas en las que se están transcribiendo los genes estructurales de HPV. Esto puede tener una gran importancia pronóstica. Como ya se ha señalado, normalmente la integración del genoma de HPV es un proceso lento, inducido por determinados cofactores, que puede producirse en cualquier momento durante la infección, incluso a partir de infecciones productivas. Por ello, el cálculo de este porcentaje puede tener gran interés, pues valores bajos pueden indicar precozmente el inicio de ese proceso de integración.

Por otro lado, a medida que se vayan desarrollando anticuerpos monoclonales específicos de proteínas reguladoras de los distintos tipos virales, esta técnica permitirá profundizar en los mecanismos de la infección y en la interacción virus-célula.

Finalmente, la técnica puede aplicarse también para detectar simultáneamente secuencias génicas específicas de HPV y proteínas celulares no víricas. De esta forma se puede estudiar la relación entre tipos virales y oncoproteínas, profundizando en los mecanismos de la carcinogénesis inducida por HPV.

V.8. CONSIDERACIONES GLOBALES.

A la vista de todo lo expuesto hasta ahora creemos que la hibridación *in situ* con sondas no radioactivas es la técnica de elección para el diagnóstico rutinario de la infección por HPV en biopsias ginecológicas, por varios motivos:

- Su sensibilidad en muestras con una cantidad suficiente de epitelio (más de 5 mm de longitud) es similar a la del Southern blot y sólo ligeramente inferior a la de la PCR.

- No requiere infraestructura o aparataje específico.
- Es rápida (la técnica utilizada por nosotros se realiza en una mañana) y prácticamente no requiere entrenamiento especial del personal que la realiza, sobre todo si se tiene experiencia en técnicas de inmunohistoquímica.
- No requiere destrucción del tejido, por lo que sus resultados se complementan con información histológica, importante en casos de infección múltiple y para estudiar características morfológicas de las reacciones positivas.

La PCR y el Southern blot pueden ser también de gran utilidad en algunos casos. El Southern blot permite conocer el estado físico del genoma de HPV en una lesión⁷²: integrado o episómico. La PCR²⁸⁷, por su mayor sensibilidad, se debería realizar en los casos en que se espere un número muy bajo de copias de HPV/célula, por ejemplo, en muestras negativas por hibridación *in situ* y para diagnosticar infecciones latentes en población de riesgo (mujeres jóvenes, sexualmente activas, sin pareja estable y que no utilizan métodos anticonceptivos de barrera), ya que, aunque varios autores^{324,325,352} han descrito técnicas de hibridación *in situ* con las que consiguen detectar una copia de HPV/célula, éstas no están todavía adaptadas al uso rutinario.

Ante cualquier sospecha de infección genital por HPV (lesión macroscópica, citología anormal, imagen colposcópica anómala) se debería tomar una biopsia para realizar estudio anatomopatológico convencional, inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (detección y tipado) para HPV. De esta forma se le suministraría al clínico la siguiente información: clasificación de la lesión, confirmación o no de la presencia del genoma de HPV en la muestra y, en caso afirmativo, si la infección es productiva o no productiva y el tipo de HPV presente, o al menos el grupo de riesgo al que pertenece.

En este punto conviene hacer dos consideraciones:

1. Con respecto a la clasificación de la lesión creemos que, en piezas de cérvix, la modificación introducida por nosotros en el sistema de Bethesda puede ser de gran utilidad para el clínico, al separar una lesión claramente benigna (condiloma acuminado) del resto de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, que, aunque en su mayoría también son benignas, conviene considerarlas como lesiones con potencialidad de evolución maligna. No hay que olvidar que el sistema de Bethesda¹⁶⁶ surgió como un intento de unificar los criterios diagnósticos aplicados en citologías cérvico-vaginales y en este tipo de muestras no es posible distinguir un condiloma acuminado de un condiloma plano, por lo que ambos se engloban en la categoría LSIL. Sin embargo, histológicamente hay una clara diferencia entre ambas lesiones. De hecho, en la casi totalidad de los estudios que hemos realizado se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos en condilomas acuminados y LSIL (inmunohistoquímica, HIS-detección, distribución de tipos virales, patrón de marcaje, patrón de distribución).
2. Con respecto a la técnica de HIS-tipado, el uso de sondas únicas específicas de los distintos tipos de HPV es de gran utilidad en estudios epidemiológicos, para estudiar la prevalencia de determinados tipos virales en los distintos medios geográficos, pero no es útil para el diagnóstico rutinario de la infección. En este caso es preferible el empleo de cócteles de sondas específicas de grupos de riesgo, puesto que aportan suficiente información y se disminuyen los costes al reducir el número de hibridaciones necesarias. Sin embargo, es necesario hacer una puntualización respecto de los tipos 31, 33 y 51 de HPV. Estos tipos virales se han considerado clásicamente de "riesgo intermedio"^{72,118,207,353} ya que se detectan en proporciones semejantes en todo tipo de lesiones (condilomas acuminados, SIL y carcinomas) En nuestra opinión, en lesiones con potencialidad de

evolución maligna, deben ser considerados de "alto riesgo" por varias razones:

- No hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en biopsias cervicales positivas para los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV respecto de la inmunohistoquímica y el patrón de distribución de células positivas por hibridación *in situ*.
- El porcentaje de biopsias positivas para los tipos 31/33/51 en las que se observó un patrón de marcaje puntual es superior al obtenido en biopsias positivas para los tipos 16/18 (diferencia estadísticamente significativa).
- Los tipos 31/33/51 de HPV son los más frecuentes en carcinomas escamosos en nuestra serie.

Es posible que éste sea un grupo heterogéneo de virus en relación con el riesgo de carcinogénesis. En la bibliografía consultada los datos sobre estos tipos virales son contradictorios. Hellberg y cols.³⁵⁴, en un estudio de seguimiento a largo plazo, calcularon índices de progresión del 30% en lesiones positivas para HPV 31 (muy próximo al de lesiones positivas para HPV 6, 25%) y del 84.6% para lesiones positivas para HPV 33 (superior al de lesiones positivas para HPV 16, 52.9%). Kataja y cols.³⁵³, en un estudio similar, obtuvieron índices de progresión prácticamente iguales en lesiones positivas para HPV 31 (18.8%) y HPV 33 (19.4%) e inferiores al obtenido para biopsias positivas para HPV 16 (35.2%). Sería conveniente realizar estudios más amplios con sondas específicas de cada tipo viral para comprobar si estos tres tipos de HPV son realmente de "riesgo intermedio" o si alguno de ellos está mal clasificado y se puede considerar de riesgo bajo o alto. Hasta que estos estudios aporten mayor información, y a la vista de nuestros resultados, creemos que

es preferible considerarlos de "alto riesgo", opinión en la que coincidimos con Chang⁴⁸ y Paper y cols.³⁵⁵.

Después de estudiar la información recibida el clínico debe tomar una decisión terapéutica. El problema se plantea en muchas ocasiones en las lesiones de bajo grado, en las que los índices de progresión no son muy elevados. Hellberg y cols.³⁵⁴ señalan que sólo el 25% de los condilomas planos progresa, frente a un 73.9% de los CIN III; Weaver y cols.³⁵⁶ calculan unos índices de regresión, persistencia y progresión del 50%, 41% y 9% en CIN I, respectivamente, y del 43%, 48% y 9% en CIN II; Nasiell y cols.²¹¹ fijan estos índices en el 54%, 16% y 30%, respectivamente, en displasias moderadas. Un dato importante para sospechar que un SIL va a progresar es el tipo de HPV presente. La inmunohistoquímica, como ya se ha mencionado, también aporta una información valiosa, al distinguir entre infecciones productivas y no productivas. Pero en muchas ocasiones esto no es suficiente. Por ello varios investigadores han estudiado distintos parámetros como marcadores pronósticos:

Dudzinski y cols.³⁵⁷ y Kashyap y cols.³⁵⁸ consideran que la medida del DNA celular con microespectrofotometría puede ser de interés en este sentido, ya que el epitelio normal o reactivo es euploide, las lesiones hiperplásicas reversibles suelen ser poliploides y los carcinomas invasivos son típicamente aneuploides. Según Bitterman y Jenson¹¹⁸ la aneuploidía correlaciona bien con la presencia de mitosis atípicas en el tejido. Sin embargo, en la literatura se encuentran datos contradictorios. Por ejemplo, Multhaupt y cols.³⁵⁹, en un estudio de contenido de DNA por análisis de imagen en muestras citológicas, observaron poliploidía en el 51.7% de citologías normales, mientras que todos los casos de CIN (12) presentaban aneuploidía.

Tosi y cols.³⁶⁰ han estudiado parámetros morfométricos (área nuclear, perímetro, diámetro máximo, y factores de forma), número y tamaño de AgNOR y la expresión de diferentes citoqueratinas. Tan sólo el estudio de los AgNOR puede tener interés pronóstico, aunque sus resultados no son totalmente concluyentes.

Finalmente, Devictor y cols.³⁶¹ han estudiado recientemente la expresión de la proteína c-myc y del antígeno Ki-67 y Tervahauta y cols.³⁶², Holm y cols.³⁶³ y Bosari y cols.³⁶⁴ la expresión de la proteína p53. Sin embargo, los resultados no parecen indicar que estos marcadores sean de interés pronóstico.

Nosotros hemos estudiado tres características morfológicas de la hibridación *in situ* como posibles marcadores relacionados con la progresión de una lesión y los resultados obtenidos demuestran que el patrón de marcaje aporta una sólida información pronóstica, bien de forma aislada, bien conjuntamente con el patrón de distribución.

En resumen, creemos que el riesgo de progresión de una lesión intraepitelial escamosa viene determinado por el tipo de HPV detectado (6/11, bajo riesgo; 16/18 y 31/33/51, alto riesgo), el resultado de la técnica de inmunohistoquímica para HPV (resultado positivo, mejor pronóstico; resultado negativo, peor pronóstico) y el patrón de marcaje observado en la hibridación *in situ* (puntual y mixto, mayor riesgo de evolución; uniforme, menor riesgo de evolución). Probablemente, la ausencia de compatibilidad histopatológica con infección por HPV sea también un factor de riesgo de progresión.

Así pues, centrándonos en el riesgo de evolución a malignidad de las SIL, la peor combinación de factores de riesgo correspondería a una lesión positiva para los tipos 16/18 ó 31/33/51 de HPV, no compatible histopatológicamente con infección por HPV, negativa por inmunohistoquímica y con un patrón de marcaje puntual. La mejor combinación correspondería a una lesión positiva para los tipos 6/11 de HPV, compatible histopatológicamente con infección por HPV, positiva por inmunohistoquímica y con un patrón de marcaje uniforme.

En cualquier caso, siempre que se detecte un tipo de HPV de alto riesgo, independientemente del tipo de lesión (aunque sea un condiloma acuminado, positivo por inmunohistoquímica y con patrón de marcaje uniforme) y del tratamiento que se efectúe, habría que someter a la paciente a un programa de vigilancia y seguimiento con controles periódicos, a fin de detectar precozmente

el desarrollo de una nueva lesión en cualquier localización genital. Esto es debido a que, como han demostrado Kulski y cols.³⁶⁵ y Rymark y cols.³⁶⁶, la infección genital por HPV no debe considerarse como una infección puntual en el sitio de la lesión, sino como una infección multifocal o generalizada de todo el tracto genital inferior.

VI. CONCLUSIONES

A continuación se enumeran las conclusiones obtenidas en relación con los objetivos que nos fijamos al iniciar el estudio:

* *Objetivo 1: Comprobar la utilidad de la inmunohistoquímica como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.*

1. **La detección inmunohistoquímica del antígeno estructural común de HPV no es la técnica de elección para el diagnóstico rutinario de la infección genital por HPV, pero es de gran utilidad para confirmar el carácter productivo de una infección. Esta información es importante como factor pronóstico para predecir la evolución de una lesión.**

* *Objetivo 2: Establecer el tamaño más adecuado de una biopsia genital para minimizar el número de falsos positivos por hibridación in situ.*

2. **En biopsias diagnosticadas de condiloma acuminado, tanto de vulva como de cérvix uterino, la longitud del epitelio no influye de forma significativa en el resultado obtenido mediante hibridación *in situ*.**
3. **En biopsias cervicales diagnosticadas de SIL la longitud de epitelio influye de forma significativa en el resultado obtenido mediante hibridación *in situ*. Las muestras con una longitud de epitelio inferior a 5 mm se deben considerar como material insuficiente para la realización de esta técnica.**

* *Objetivo 3: Comprobar la utilidad de la hibridación in situ como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.*

4. **La hibridación *in situ* con sondas no radioactivas es una técnica perfectamente válida para el diagnóstico rutinario de la infección genital por HPV y para realizar estudios retrospectivos sobre esta infección. Los mejores resultados se obtienen combinando técnicas de HIS-detección e HIS-tipado.**

5. La hibridación *in situ* debe realizarse en todas las biopsias diagnosticadas de SIL, independientemente de que sean histopatológicamente compatibles o no con infección por HPV.
 6. El empleo de cócteles de sondas específicas de grupos de riesgo de HPV respecto de la carcinogénesis en técnicas de HIS-tipado aporta una valiosa información en el estudio de esta infección y es idóneo para el diagnóstico rutinario.
- * *Objetivo 4: Estudiar la distribución de los grupos de HPV de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo de carcinogénesis en lesiones genitales benignas, lesiones con potencialidad de evolución maligna y lesiones malignas.*
7. Los tipos 6/11 de HPV se asocian con condilomas acuminados, tanto en vulva como en cérvix uterino, mientras que los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV se asocian con lesiones intraepiteliales de alto grado y carcinomas escamosos. Los tipos 31/33/51 de HPV deben ser considerados de alto riesgo cuando se detectan en biopsias diagnosticadas de SIL.
 8. Hay una clara asociación entre los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV y las lesiones asociadas a HPV no compatibles histopatológicamente con infección por este virus.
 9. La distribución de los grupos virales estudiados no difiere significativamente en las distintas procedencias geográficas de las biopsias. Los tipos 31/33/51 de HPV son los que se han detectado con mayor frecuencia en el conjunto de muestras estudiadas.
- * *Objetivo 5: Realizar un estudio comparativo entre inmunohistoquímica e hibridación in situ.*

10. La hibridación *in situ* de ADN con sondas no radioactivas es más sensible que la inmunohistoquímica para diagnosticar la infección genital por HPV y aporta mayor información al permitir conocer el tipo de HPV presente en una muestra, o al menos el grupo de riesgo al que pertenece.
 11. Los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV producen preferentemente infecciones no productivas, mientras que los tipos 6/11 de HPV producen mayoritariamente infecciones productivas.
- * *Objetivo 6: Estudiar las características morfológicas de la hibridación in situ con fines pronósticos.*
12. El patrón de marcaje obtenido con hibridación *in situ* es un buen factor pronóstico para predecir la evolución de una lesión. Las biopsias diagnosticadas de SIL en las que se observa un patrón de marcaje puntual o mixto tienen mayor probabilidad de progresar a malignidad que aquéllas en las que se observa un patrón uniforme.
 13. El patrón de distribución obtenido con hibridación *in situ* y la distribución de células positivas en el grosor del epitelio no se pueden utilizar con fines pronósticos.
- * *Objetivo 7: Desarrollar nuevas técnicas que combinen inmunohistoquímica e hibridación in situ y que aporten mayor información al estudio de la infección genital por HPV.*
14. La técnica de doble marcaje desarrollada en este trabajo permite detectar simultáneamente antígenos víricos y secuencias génicas específicas de HPV, por lo que es de gran utilidad en el estudio de la interacción virus-célula.

CONCLUSION ADICIONAL

- 15. El condiloma acuminado de cérvix constituye una entidad diagnóstica distinta del resto de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, por lo que no debe ser incluido en esta categoría.**

VII. BIBLIOGRAFIA

1. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977;78:1-30.
2. Gissmann L. Papillomaviruses and their association with cancer in animals and in man. *Cancer Surv* 1984;3:161-181.
3. Syrjänen K J. Papillomaviruses and cancer. En: Syrjänen K J, Gissmann L, Koss L G, eds. *Papillomaviruses and human diseases*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1987;468-503.
4. Quick C A, Watts S L, Krzyzek R A, Faras A J. Relationship between condylomata and laryngeal papillomata. *Ann Otol* 1980;89:467-471.
5. de Villiers E-M, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985;36:575-578.
6. Beckmann A M, Daling J R, Sherman K J, et al. Human papillomavirus and anal cancer. *Int J Cancer* 1989;43:1042-1049.
7. Winkler B W, Capo V, Reumann W, et al. Human papillomavirus infection of the esophagus: a clinocopathologic study with demonstration of papillomavirus antigen by the immunoperoxidase technique. *Cancer* 1985;55:149-155.
8. Moy R L, Eliezri Y D, Nuovo G J, Zitelli Z A, Bennett R G, Silverstein S J. Squamous cell carcinoma of the finger is associated with human papillomavirus type 16 DNA. *JAMA* 1989;261:2669-2673.
9. McDonnell J M, Mayr A J, Martin W J. DNA of human papillomavirus type 16 in dysplastic and malignant lesions of the conjunctiva and cornea. *N Engl J Med* 1989;320:1442-1446.
10. Orth G, Breitbart F, Favre M, et al. Papillomaviruses: possible role in human

cancer. En: Hiatt H H, Watson J D, Wisten J A, eds. *Origins of Human Cancer. Libro A: Incidence of Cancer in Humans*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977;1043-1068.

11. Syrjänen K J. Human papillomavirus (HPV) lesions in association with cervical dysplasias and neoplasias. *Obstet Gynecol* 1983;62:617-622.

12. Syrjänen K J. Current concept on human papillomavirus (HPV) infections in the genital tract and their relationship to intraepithelial neoplasias and squamous cell carcinoma. *Obstet Gynecol Surv* 1984;39:252-265.

13. Syrjänen K J. Human papillomavirus (HPV) infection of the female genital tract and their associations with intraepithelial neoplasias and squamous cell carcinoma. *Pathol Annu* 1986;21:53-87.

14. Celso A C. *Los ocho libros de la medicina. Vol. II*. (Traducción directa del latín por Agustín Blazquez). Madrid, 1980.

15. Van-Svvieten. *Descripción compendiosa de las enfermedades que reynan lo mas comunmente en los exercitos, con el methodo de curarlas*. (Traducido al castellano por D. Agustín Argüello y Castrillo). Madrid: editorial de Andrés Ortega. 1767:152-166.

16. "Algunos doctores en cirugía y medicina". *Nuevos elementos de cirugía y medicina. Tomo I*. Madrid: establecimiento literario-tipográfico de P. Madoz y L. Sagasti. 1846:40-51.

17. Díaz Benito J, González y Velasco P. *Guía teórico-práctica del sangrador, dentista y callista, o tratado completo de cirugía menor o ministrante*. Madrid: imprenta de D. Alejandro Gómez Fuentesnebro. 1848:401-404.

18. Maestre-de San Juan A. *Tratado elemental de histología normal y patológica*,

precedido de un resumen de técnica de laboratorio. 2ª ed. Madrid. 1885:743-746.

19. Variot G. Un cas d'inoculation expérimentale des verrues de l'enfant à l'homme. *J Clin Therap Infant* 1894;2:529-531.

20. Ciuffo G. Innesto positivo confluito di verruca vulgare. *G Ital Mal Vener* 1907;42:12-17.

21. Gross L. *Oncogenic viruses. 2ª ed. New York: Pergamon Press. 1970:49-81.*

22. Serra A. Studi sul virus della verruca, del papilloma, del condiloma acuminato. Etiologia, patogenesi, filtrabilità. *G Ital Mal Vener Pelle* 1924;65:1808-1814.

23. Shope R E, Hurst E W. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med* 1933;58:607-624.

24. Rous P, Beard J W. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (The Shope rabbit papilloma).I. The growth on implantation within favorable hosts. *J Exp Med* 1934;60:701-722.

25. Rous P, Beard J W. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (The Shope rabbit papilloma).III. Further characters of the growth. General discussion. *J Exp Med* 1934;60:741-766.

26. Rous P, Beard J W. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papilloma (Shope). *J Exp Med* 1935;62:523-548.

27. Ayer J E. The vaginal smear: "precancer" cell using a modified technique. *Am J Obstet Gynecol* 1949;58:1205-1219.

28. Koss L G, Durfee G R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad*

Sci 1956;63:1245-1261.

29. Ayer J E. Role of the halo cell in cervical carcinogenesis. *Obstet Gynecol* 1960;15:481-491.

30. Naib Z N, Masukawa N. Identification of condyloma accuminata cells in routine vaginal smears. *Obstet Gynecol* 1961;18:735-738.

31. Rotkin L D. A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer res* 1973;33:1353-1367.

32. Richart R M. Cervical intraepithelial neoplasia. En: Sommers S C, ed. *Pathology Annual*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1973;301-328.

33. Kessler I I. Human cervical cancer as a venereal disease. *Cancer Res* 1976;36:783-791.

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

35. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977;21:26-31.

36. zur Hausen H. Condylomata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;36:530.

37. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papillomaviruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 1977;76:569-580.

38. Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 1977;24:108-120.

39. Orth G, Jablonska L, Jarzabek-Chorzelska M, et al. Characterization of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of papillomavirus involved in epidermodisplasia verruciformis. *Cancer Res* 1979;39:1074-7082.
40. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condiloma acuminata). *Int J Cancer* 1980;25:605-609.
41. de Villiers E M, Gissman L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol* 1981;40:932-935.
42. Reid R, Lavery C R, Coppelson M, et al. Noncondylomatous cervical wart virus infection. *Obstet Gynecol* 1979;55:476-483.
43. Jenson A B, Rosenthal J D, Olson C, et al. Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. *J Natl Cancer Inst* 1980;64:495-500.
44. Kurman R, Shah K V, Lancaster W D, et al. Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasias and vulvar condylomas. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:931-935.
45. Broker T R, Botchan M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. En: Botchan M, Grodzicker T, Sharp P A, eds. *Cancer cells 4: DNA tumor viruses*. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986;17-35.
46. Ferenczy A, Braun L, Shah K V. Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesions of the cervix. A comparative ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1981;5:661-670.
47. de Villiers E-M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989;63:4898-4903.

48. Chang F. Role of papillomaviruses. *J Clin Pathol* 1990;43:269-276.
49. Kaur P, McDougall J K. Transformation of mouse cells by human papillomavirus type-6b and type-18 DNAs. En: Steinberg B M, Brandsma J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells, vol. 5*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987:249-252.
50. Kanda T, Watanabe S, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 transformation of rat 3Y1 cells. *Jpn J Cancer Res* 1987;78:103-108.
51. Laimins L A, Bedell M A, Jones K H, Long J A. Transformation of NIH-3T3 and primary rat embryo fibroblasts by human papillomavirus type 16 and 18. En: Steinberg B M, Brandsma J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells, vol. 5*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987:201-207.
52. Morgan D, Pecoraro G, Rosenberg I, Defendi V. Transformation of C127 mouse fibroblasts by human papillomavirus 16. *Cancer Res* 1988;48:2505-2511.
53. Yasumoto S, Burkhardt A L, Doniger J, DiPaolo J A. Human papillomavirus type 16 DNA induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* 1986;57:572-577.
54. Watanabe S, Yoshiike K. Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus typ-18 DNA. *Int J Cancer* 1988;41:896-900.
55. Kaur P, McDougall J K. Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J Virol* 1988;62:1917-1924.
56. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, Di Paolo J A. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987;61:1061-1066.

57. McCance D J, Kopan R, Fuchs E, Laimins L A. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7169-7173.
58. Dyson N, Howley P M, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-937.
59. Werness B A, Levine A J, Howley P M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-79.
60. Pirisi L, Creek K E, Doniger J, et al. Continuous cell lines with altered growth and differentiation properties originate after transfection of human keratinocytes with human papillomavirus type-16 DNA. *Carcinogenesis* 1988;9:1573-1579.
61. Schlegel R, Phelps W C, Zhang Y-L, Barbosa M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 1988;7:3181-3187.
62. Lacey M, Alpert S, Hanahan D. Bovine papillomavirus genome elicits skin tumors in transgenic mice. *Nature* 1986;322:609-612.
63. Kreider J W, Howett M K, Wolfe S A, et al. Morphological transformation *in vivo* of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature* 1985;317:639-641.
64. Sexually transmitted disease: extract from the annual report of the Chief Medical Officer of the Department of Health and Social Security. *Genitourin Med* 1985;61:204-207.
65. Evans S, Dowling K. The changing prevalence of cervical human papilloma virus infection. *Aust New Zealand J Obstet Gynecol* 1990;30:375-377.

66. Becker T. Cervical papillomavirus infection and cervical dysplasia in hispanic, native american, and non-hispanic white woman in New Mexico. *J Public Health* 1991;81:582-586.
67. Matorras R, Ariceta J M, Alonso M. Epidemiología de la condilomatosis genital. *Clin Inv Gen Obstet* 1989;16:428-435.
68. Cancelo M J. *Infección genital femenina por papilomavirus. Valor de la exploración, citología, colposcopia e histología versus inmunohistoquímica e hibridación*. Tesis doctoral. Dpto. de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares. 1994.
69. Francki R I B, Fauquet C M, Krudson D L, Brown F. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol* 1991;Supl. 2:146-149.
70. Melnick J L, Allison A C, Butel J S, et al. Papovaviridae. *Intervirology* 1974;3:106-120.
71. Coggin J R, zur Hausen H. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res* 1979;39:545-546.
72. Roman A, Fife K H. Human papillomaviruses: are we ready to type?. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:166-190.
73. Pfister H, Fuchs P G. Papillomaviruses: particles, genome organisation and proteins. En: Syrjänen K J, Gissman L, Koss L G, eds. *Papillomaviruses and human diseases*. Heidelberg: Springer-Verlag 1987:1-18.
74. Tomita Y, Shirasawa H, Sekine H, Simizu B. Expression of the human papillomavirus type 6b L2 open reading frame in Escherichia coli: L2-beta-galactosidase fusion proteins and their antigenic properties. *Virology* 1987;158:8-

14.

75. Giri I, Danos O. Papillomavirus genomes. From sequence data to biological properties. *Trends Genet* 1986;2:227-232.

76. Taichman L B, Reilly S S, LaPorta R F. The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. *J Invest Dermatol* 1983;81:137-140.

77. Chen E Y, Howley P M, Levinson A D, Seeburg A D. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982;299:529.

78. Danos O, Engel L W, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* 1982;1:231-236.

79. Schwartz E, Durst M, Demankowski C, et al. Sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J* 1983;12:2341-2348.

80. Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowenkamp W. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 1985;145:181-184.

81. Danos O, Engel L W, Chen E Y, Yaniv M, Howley P M. A comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J Virol* 1983;46:557-566.

82. Lazo P A. Human papillomaviruses in oncogenesis. *Bioessays* 1988;9:162-168.

83. Schwartz E, Freese U K, Gissman L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*

1985;314:111.

84. Spalholz B A, Wang Y-C, Howley P M. Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 1985;42:183-191.

85. Androphy E J, Lowy D R, Schiller J T. Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 1987;325:70-73.

86. Phelps W C, Yee C L, Munger K, Howley P M. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 1988;53:539.

87. Smotkin D, Wettstein F O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4680-4684.

88. Seedorf K, Oltersdorf T, Krammer G, Rowemkamp W. Identification of early proteins of the human papillomaviruses type 16 (HPV 16) and 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J* 1987;6:139-144.

89. Schwartz E, Schneider-Gadicke A, zur Hausen H. Human papillomavirus type-18 transcription in cervical carcinoma cell lines and in human cell hybrids. En: Steinberg B M, Brandsma J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells 5: papillomaviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory 1987;47-53.

90. Schiller J T, Vass W C, Vousden K H, Lowy D R. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* 1986;57:1-6.

91. DiMaio D, Guralski D, Schiller J T. Translation of open reading frame E5 of

bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1797.

92. Halbert C L, Galloway D A. Identification of the E5 open reading frame of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1988;62:1071-1075.

93. Shen S-L, Mounts P. Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J Virol* 1990;64:3226-3233.

94. Pilacinsky W P, Glassman D L, Krzyzek, Sadowski P L, Robbins A K. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the bovine papillomavirus L1 and L2 open reading frames. *Biotechnology* 1984;2:356.

95. Campo M S, Spandidos D A, Lang J, Wilkie N M. Transcriptional control signals in the genome of bovine papillomavirus type 1. *Nature* 1981;303:77-80.

96. Crum C P, Nuovo G J. Biology of papillomaviruses. En: Crum C P y Nuovo G J, eds. *Genital papillomaviruses and related neoplasms*. New York: Raven Press, 1991:10-35.

97. Smotkin D, Berek J S, Fu Y S, Hacker N F, Major F G, Wettstein F O. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1986;68:241-244.

98. Tase T, Okagaki T, Clark B A, Twiggs L B, Ostrow R S, Faras A J. Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma in situ, microinvasive adenocarcinoma of the uterine cervix and coexisting cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1989;8:8-17.

99. Stoler M H, Walker A N, Mills S E. Small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix: a human papillomavirus type 18 associated cervix cancer. *Lab Invest* 1989;60:92A.

100. Monsonégo J. Etude Virologique. En: Monsonégo J, ed. *Dysplasies du col utérin et papillomavirus humains*. Paris: Maloine, 1988:31-40
101. Oriel J D. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971;47:1-13.
102. Ferenczy A, Mitao M, Nagai N, Silverstein S J, Crum C P. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J Med* 1985;313:784-788.
103. Macnab J C M, Walkinshaw S A, Cordiner J W, Clemens J B. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *N Engl J Med* 1986;315:1052-1058.
104. Walkinshaw S A, Cordiner J W, Clements J B, MacNab J C M. Prognosis of women with human papillomavirus DNA in normal tissue distal to invasive cervical and vulvar cancer. *Lancet* 1987;i:563.
105. Cox M F, Meanwell C A, Maitland N J, Blackledge G, Scully C, Jordan J A. Human papillomavirus type-16 homologous DNA in normal human ectocervix. *Lancet* 1986;ii:157-158.
106. Toom P G, Arrand J R, Wilson L P, Sharp D S. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia. *Br Med J* 1986;293:1261-1264.
107. Burk R D, Kadish A S, Calderin S, Romney S L. Human papillomavirus infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridization: correlation with biopsy results and Papanicolaou smear. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:982-989.
108. Lorincz A T, Temple G F, Patterson J A, Bennett A B, Kurman R J, Lancaster W D. Correlation of cellular atypia and human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in exfoliated cells of the uterine cervix. *Obstet*

Gynecol 1986;68:508-512.

109. de Villiers E-M, Wagner D, Schneider A, et al. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 1987;ii:703-706.

110. Fife K H, Rogers R E, Zwickl B W. Symptomatic and asymptomatic cervical infections with human papillomavirus during pregnancy. *J Infect Dis* 1987;156:904-911.

111. Schneider A, Hotz M, Gissmann L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 1987;40:198-201.

112. Wickenden C, Malcolm A D B, Byrne M A, Smith C, Anderson M C, Coleman D V. Prevalence of HPV DNA and viral copy numbers in cervical scrapes from women with normal and abnormal cervixes. *J Pathol* 1987;153:127-135.

113. Fuchs P G, Girardi F, Pfister H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 1988;41:41-45.

114. Nuovo G J. Correlation of histology with human papillomavirus DNA detection in the female genital tract. *Gynecol Oncol* 1988;31:176-181.

115. Nuovo G J, Nuovo M A, Cottral S, Gordon S, Silverstein S J, Crum C P. Histological correlates of clinically occult human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 1988;12:198-204.

116. Kiviat N B, Koutsky L A, Paavonen J A, et al. Prevalence of genital papillomavirus infection among women attending a college student health clinic or a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis* 1989;159:293-302.

- 117.** Ferenczy A, Winkler B. Cervical intraepithelial neoplasia and condyloma. En: Kurman R J ed. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. New York: Springer-Verlag, 1987:177-217.
- 118.** Bitterman P, Jenson A B. Uterine cervix. En: Henson D E, Albores-Saavedra J, eds. *Pathology of incipient neoplasia*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1993:248-267.
- 119.** Wilbur D C, Reichman R C, Stoler M H. Detection of infection by human papillomavirus in genital condylomata. A comparison study using immunocytochemistry and *in situ* nucleic acid hybridization. *Am J Clin Pathol* 1988;89:505-510.
- 120.** Alonso M J, Gómez F, Muñoz E, et al. Comparative study of *in situ* hybridization and immunohistochemical techniques for the detection of human papillomavirus in lesions of the uterine cervix. *Eur J Histochem* 1992;36:271-278.
- 121.** Doorbar J, Ely S, Sterling J, McClean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824-827.
- 122.** Cullen A P, Reid R, Campion M, Lorincz A T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991;65:606-612.
- 123.** Gage J R, Meyers C, Wettstein F O. The E7 proteins of non-oncogenic human papillomavirus type 6B (HPV-6B) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* 1990;64:723-730.
- 124.** Baker C C, Howley P M. Different promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissue. *EMBO J* 1987;6:1027-1035.

- 125.** Lazo P A. Structure, DNase I hypersensitivity and expression of integrated papillomavirus in the genome of HeLa cells. *Eur J Biochem* 1987;165:393-401.
- 126.** Schneider-Maunouroy S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 1987;61:3295-3298.
- 127.** Gissmann L, de Villiers E M, zur Hausen H. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer* 1982;29:143-146.
- 128.** Stoler M H, Broker T R. In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Hum Pathol* 1986;17:1250-1258.
- 129.** Beckmann A M, Myerson D, Daling J R, Kiviat N B, Fenoglio C M, McDougall J K. Detection and localization of human papillomavirus DNA in human genital condylomas by in situ hybridization with biotinylated probes. *J Med Virol* 1985;16:265-273.
- 130.** Fu Y S, Braun L, Shah K V, Lawrence W D, Robboy S J. Histologic, nuclear DNA, and human papillomavirus studies of cervical condylomas. *Cancer* 1983;52:1705-1711.
- 131.** Guillet G, Braun L, Shah K V, Ferenczy A. Papillomavirus in cervical condylomas with and without associated cervical intraepithelial neoplasia. *J Invest Dermatol* 1983;81:513-516.
- 132.** Morin C, Braun L, Casas-Cordero M, et al. Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:831-835.

133. Syrjanen K J, Pyrhonen S. Demonstration of human papilloma virus antigen in the codylomatous lesions of the uterine cervix by immunoperoxidase technique. *Gynecol Obstet Invest* 1982;14:90-96.
134. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812-3815.
135. Kulski J K, Howard M J, Pixley E C. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16 or 18 in invasive cervical carcinoma of Western Australian women. *Immunol Cell Biol* 1987;65:7-84.
136. McCance D J, Campion M J, Clarkson P K, Chesters P M, Jenkins D, Singer A. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:1101-1105.
137. Sutton G P, Stehman F B, Ehrlich C E, Roman A. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in lesions of the female genital tract: evidence for type 6/11 in squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* 1987;70:564-568.
138. Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 1986;321:246-249.
139. Lorincz A T, Quinn A P, Lancaster W D, Temple G F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 1987;159:187-190.
140. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA and its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984;3:1151-1157.

- 141.** Fukushima M, Okagaki T, Twiggs L B, et al. Histological types of carcinoma of the uterine cervix and the detectability of human papillomavirus DNA. *Cancer Res* 1985;45:3252-3255.
- 142.** Gissmann L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 1984;83:26S-28S.
- 143.** Grussendorf-Conen E I, Ikenberg H, Gissmann L. Demonstration of HPV-16 genomes in the nuclei of cervix carcinoma cells. *Dermatologica* 1985;170:199-201.
- 144.** Ostrow R S, Manias D A, Clark B A, Okagaki T, Twiggs L B, Faras A J. Detection of human papillomavirus DNA in invasive carcinomas of the cervix by in situ hybridization. *Cancer Res* 1987;47:649-653.
- 145.** Yoshikawa H, Matsukura T, Yamamoto E, Kwana T, Mizuno M, Yoshiike K. Occurrence of human papillomavirus types 16 and 18 DNA in cervical carcinomas from Japan: age of patients and histological type of carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1985;76:667-671.
- 146.** Lehn H, Krieg P, Sauer G. Papillomavirus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5540-5544.
- 147.** Tsunokawa Y, Takebe N, Nozawa S, et al. Presence of human papillomavirus type-16 and type-18 DNA sequences and their expression in cervical cancers and cell lines from Japanese patients. *Int J Cancer* 1986;37:499-503.
- 148.** Zachow K R, Ostrow R S, Bender M, et al. Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. *Nature* 1982;300:771-773.

- 149.** Collins J E, Jenkins D, McCance D J. Detection of human papillomavirus DNA sequences by in situ DNA-DNA hybridization in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma: retrospective study. *J Clin Pathol* 1988;41:289-295.
- 150.** Crum C P, Ikenberg H, Richart R M, Gissmann L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N Engl J Med* 1984;310:880-883.
- 151.** Gupta J, Pilotti S, Rilke F, Shah K V. Association of human papillomavirus type 16 with neoplastic lesions of the vulva and other genital sites by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1987;127:206-215.
- 152.** Lorincz A T, Lancaster W D, Kurman R J, Jenson A B, Temple G F. Characterization of human papillomaviruses in cervical neoplasia and their detection in routine clinical screening. En: Peto R, zur Hausen H, eds. *Viral etiology of cervical cancer*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986:225-238.
- 153.** McCance D J, Walker P G, Dyson J L, Coleman D V, Singer A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 1983;287:784-788.
- 154.** Schneider A, Kraus H, Schuhmann R, Gissmann L. Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int J Cancer* 1985;35:443-448.
- 155.** Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. *Obstet Gynecol* 1984;64:767-772.
- 156.** Wickenden C, Steele A, Malcolm A D B, Coleman D V. Screening for wart virus infection in normal and abnormal cervixes by DNA hybridization of cervical

scrapes. *Lancet* 1985;i:65-67.

157. Sterrett G F, Alessandri L M, Pixley E, Kulski J K. Assessment of precancerous lesions of the uterine cervix for evidence of human papillomavirus infection: a histological and immunohistochemical study. *Pathology* 1987;19:84-90.

158. Webb D H, Rogers R E, Fife K H. A one-step method for detecting and typing human papillomavirus DNA in cervical scrape specimens from women with cervical dysplasia. *J Infect Dis* 1987;156:912-919.

159. Schneider A, Oltersdorf T, Schneider V, Gissmann L. Distribution pattern of human papilloma virus 16 genome in cervical neoplasia by molecular in situ hybridization of tissue sections. *Int J Cancer* 1987;39:717-721.

160. Nagai N, Nuovo G, Friedman D, Crum C P. Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancers with the in situ hybridization technique. *Int J Gynecol Pathol* 1987;6:366-379.

161. Crum C P, Braun L A, Shah K V, et al. Vulvar intraepithelial neoplasia: correlation of nuclear DNA content and the presence of a human papilloma virus (HPV) structural antigen. *Cancer* 1982;49:468-471.

162. Reagan J W, Seidemann I L, Saracusa Y. Cellular morphology of carcinoma *in situ* and dysplasia or atypical hyperplasia of uterine cervix cancer. *Cancer* 1953;6:224.

163. Poulson H E, Taylor C H, Sobin L H. Histological typing of female genital tract tumours. Ginebra: World Health Organization 1975.

164. Weid G L. Proceedings of the First International Congress of exfoliative cytology (editorial). Viena: Appleton-Century-Crofts 1962:297.

- 165.** Richart R M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1968;5:748-784.
- 166.** Workshop: The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. *JAMA* 1989;262:931-934.
- 167.** Luff R D. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. Report of the 1991 Bethesda workshop. *Hum Pathol* 1992;23:719-721.
- 168.** Barron B A, Richart R M. A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst* 1968;41:1343-1350.
- 169.** Fu Y S, Reagan J W, Richart R M. Definitions of precursors. *Gynecol Oncol* 1981;12:220-231.
- 170.** Fu Y S, Reagan J W, Richart R M. Precursors of cervical cancer. *Cancer Surv* 1983;2:359-365.
- 171.** Tabbara S, Saleh A D M, Andersen W A, Barber S R, Taylor P T, Crum C P. The Bethesda classification for squamous intraepithelial lesions: histologic, cytologic and viral correlates. *Obstet Gynecol* 1992;79:338-346.
- 172.** Franquemont D W, Ward B E, Andersen W A, Crum C P. Prediction of "high risk" cervical papillomavirus infection by biopsy morphology. *Am J Clin Pathol* 1989;92:577-582.
- 173.** Crum C P, Mitao M, Levine R U, Silverstein S. Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J Virol* 1984;54:675-681.
- 174.** Bibbo M, Dytch S B, Alenghat E, Bartels P H, Wied G L. DNA ploidy profiles

as prognostic indicators in CIN lesions. *Am J Clin Pathol* 1989;92:261.

175. Barron B A, Cahill M C, Richart R M. A statistical model of the natural history of cervical neoplastic disease: the duration of carcinoma *in situ*. *Gynecol Oncol* 1978;6:196-205.

176. McIndoe W, McLean J, Jones R, Mullins P. The invasive potential of carcinoma *in situ* of the cervix. *Obstet Gynecol* 1984;64:451-452.

177. Gustafsson L, Adami H-O. Natural history of cervical neoplasia: consistent results obtained by an identification technique. *Br J Cancer* 1989;60:132-141.

178. Ferenczy A, Winckler B. Carcinoma and metastatic tumors of the cervix. En: Kurman R J ed. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. New York: Springer-Verlag, 1987: 218-256.

179. Kurman R J, Norris H J, Wilkinson E. Tumors of the cervix. En: Rosai J, Sobin L H eds. *Tumors of the cervix, vagina and vulva*. Bethesda: Armed Forces Institute of Pathology. 1992:37-139.

180. Japaze H, Van Dinh T, Woodruff J D. Verrucous carcinoma of the vulva: a study of 24 cases. *Obstet Gynecol* 1982;60:462-467.

181. Spratt D W, Lee S C. Verrucous carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:699-670.

182. Van Nagell J R, Donaldson E S, Wood E G, et al. Small cell cancer of the uterine cervix. *Cancer* 1977;40:2243-2249.

183. Hurt W G, Silverberg S G, Frable W F, et al. Adenocarcinoma of the cervix: histopathologic and clinical features. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:304-313.

184. Barnes W, Delgado G, Kurman R J, et al. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1988;29:267-273.
185. Dekmezian R, Chen X, Kuo T, Ordonez N, Katz R. Dna hybridization for human papillomavirus (HPV) in cervical lesions. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:22-27.
186. de Villiers E M, Schneider A, Gross G, zur Hausen H. Analysis of benign and malignant urogenital tumors for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA. *Med Microbiol Immunol* 1986;174:281-286.
187. Choo K B, Pan C C, Liu M S, et al. Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J Med Virol* 1987;21:101-107.
188. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch H G, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:560-563.
189. Kurman R J, Schiffman M H, Lancaster W D, et al. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:293-296.
190. Millan D W M, Davis J A, Torbet T E, Campo M S. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16 and 18 in lesions of the uterine cervix in the west of Scotland. *Br Med J* 1986;293:93-96.
191. Pater M M, Dunne J, Hogan G, Chatage P, Pater A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in early cervical neoplasia. *Virology* 1986;155:13-18.
192. Reeves W C, Caussy D, Brinton L A, et al. Case-control study of human

papillomaviruses and cervical cancer in Latin America. *Int J Cancer* 1987;40:450-454.

193. Syrjanen S, Syrjanen K, Mantyjarvi R, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences demonstrated by in situ DNA hybridization in serial paraffin-embedded cervical biopsies. *Arch Gynecol* 1986;239:39-48.

194. Richart R M. Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1987;60(Supl.):1951-1959.

195. Lorincz A T, Lancaster W D, Temple G F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 1986;58:225-229.

196. Beaudenon S, Kremsdorf D, Obalek S, et al. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 1987;161:374-384.

197. Naghashfar Z S, Rosenshein B N, Lorincz A T, Buscema J, Shah K V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J Gen Virol* 1987;68:3073-3079.

198. Nuovo G J, Crum C P, de Villiers E M, Levine R U, Silverstein S J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 1988;62:1452-1455.

199. Gómez F, Abad M M, Muñoz E, et al. Study of infection by human papillomavirus in severe dysplasias and carcinomas *in situ* of the uterine cervix using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Eur J Histochem* 1992;36:137-142.

200. Rando R F, Sedlacek T V, Hunt J, Jenson A B, Kurman R J, Lancaster W

D. Verrucous carcinoma of the vulva associated with an unusual type 6 human papillomavirus. *Obstet Gynecol* 1986;67(Supl.):70-75.

201. Rando R F, Groff D E, Chirikjian J G, Lancaster W D. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *J Virol* 1986;57:353-356.

202. Rando R F, Lancaster W D, Han P, López C. The noncoding region of HPV-6vc contains two distinct transcriptional enhancing elements. *Virology* 1986;155:545-546.

203. Kasher M S, Roman A. Characterization of human papillomavirus type 6b DNA isolated from an invasive squamous carcinoma of the vulva. *Virology* 1988;165:225-233.

204. Koutsky L A, Galloway D A, Holmes K K. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 1988;10:122-163.

205. Wilczynski S P, Bergen S, Walker J, Lia S Y, Pearlman L F. Human papillomaviruses and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. *Hum Pathol* 1988;19:697-704.

206. Tase T T, Okagaki T, Clark B A, et al. Human papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: a study by in situ DNA hybridization. *Cancer Res* 1988;48:993-998.

207. Lorincz A T, Temple G F, Kurman R J, et al. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:671-677.

208. Richart R M. The correlation of Schiller-positive areas on the exposed portion of the cervix with intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1964;90:697-702.

209. Staffl A, Mattingly R F. Colposcopic diagnosis of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol* 1973;41:168-175.
210. Guzick D S. Efficacy of screening for cervical cancer: a review. *Am J Public Health* 1978;68:125-130.
211. Nasiell K, Nasiell M, Vaclavinkova V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long term follow-up. *Obstet Gynecol* 1983;61:609-615.
212. Boras V F, Duggan M A. Cervical dyskeratotic cells as predictors of condylomatous changes on biopsy. *Acta Cytol* 1989;33:223-227.
213. Lundberg G D. Quality assurance in cervical cytology: the Papanicolaou smear. *JAMA* 1989;262:1672-1679.
214. Gay J D, Donaldson L D, Goellner J R. False negative results in cervical cytological studies. *Acta Cytol* 1985;29:1043-1046.
215. Della Torre G, Pilotti S, De Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori* 1978;64:549-553.
216. Grunebaum A N, Sedlis A, Sillman F, Fruchter R, Stanek A, Boyce J. Association of human papillomavirus infection with cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1983;62:448-455.
217. Hills E, Lavery C R. Electron microscopic detection of papillomavirus particles in selected koilocytotic cells in routine cervical smears. *Acta Cytol* 1979;23:53-56.
218. Kadish A S, Burk R D, Kress Y, Calderin S, Romney S L. Human papillomaviruses of different types in precancerous lesions of the uterine cervix: histologic, immunocytochemical and ultrastructural studies. *Hum Pathol*

1986;17:384-392.

219. Morin C, Meisels A. Human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Acta Cytol* 1980;24:82-84.

220. Pilotti S, Rilke F, Shah K V, Della Torre G, De Palo G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of papillomavirus infection associated with in situ and microinvasive squamous cell carcinoma of the vulva. *Am J Surg Pathol* 1984;8:751-761.

221. Standbridge C M, Butler E B. Human papillomavirus infection of the lower female genital tract: association with multicentric neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1983;2:264-274.

222. Standbridge C M, Mather J, Curry A, Butler E B. Demonstration of papillomavirus particles in cervical and vaginal scrape material: a report of 10 cases. *J Clin Pathol* 1981;34:524-531.

223. Syrjanen K, Vayrynen M, Mantyjarvi R, et al. Electron microscopy in assessment of the biological behavior of human papillomavirus infections in the uterine cervix. *Neoplasia* 1986;33:493-506.

224. Kienzler J L. Humoral immunity to human papillomaviruses. *Clin Dermatol* 1985;4:144-155.

225. Ogilvie M M. Basics in human wart immunology. En: Prunieris M, ed. *Biomedical aspects of human wart virus infection*. Lyon: Fondation Merieux, 1976;183-189.

226. Firzlaff J M, Hsia C-NL, Halbert C P H L, Jenison S A, Galloway D A. Polyclonal antibodies to human papillomavirus type 6b and type 16 bacterially derived fusion proteins. En: Steinberg B M, Brandsmad J L, Taichman L B, eds.

Cancer cells 5: papillomaviruses. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987;105-113.

227. Jenison S A, Firzloff J M, Langenberg A, Galloway D A. Identification of immunoreactive antigens of human papillomavirus type 6b using *Escherichia coli*-expressed fusion proteins. *J Virol* 1988;62:2115-2123.

228. Tomita Y, Hiroshi S, Sekine H, Simizu B. Expression of the human papillomavirus type 6b L2 open reading frame in *Escherichia coli*: L2- β -galactosidase fusion proteins and their antigenic properties. *Virology* 1987;158:8-14.

229. Jenison S A, Yu X P, Valentine J M, Galloway D A. Human antibodies react with an epitope of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame which is distinct from the type-common epitope. *J Virol* 1989;63:809-818.

230. Jenison S A, Yu X P, Valentine J M, et al. Evidence of prevalent genital-type human papillomavirus infections in adults and children. *J Infect Dis* 1990;162:60-69.

231. Jochmus-Kudielka I, Schneider A, Braun R, et al. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1698-1704.

232. Crum C P, Barber S, Roche J K. Pathobiology of papillomavirus-related cervical diseases: prospects for immunodiagnosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:270-285.

233. Dillner J, Dillner L, Utter G, et al. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. *Int J Cancer* 1990;45:529-535.

- 234.** Dillner J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *Int J Cancer* 1990;46:703-711.
- 235.** Orth G, Breitbart F, Favre M. Evidence for antigenic determinants shared by the structural polypeptides of (Shope) rabbit papillomavirus and human papillomavirus tpe 1. *Virology* 1978;91:243-255.
- 236.** Hsu S-M, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
- 237.** Alessandri L M, Sterrett G F, Pixley E C, Kulski J K. Comparison of peroxidase-antiperoxidase and avidin-biotin complex methods for the detection of papillomavirus in histological sections of the cervix uteri. *Pathology* 1986;18:382-385.
- 238.** Firzlaff J M, Kiviat N B, Beckmann A M, Jenison S A, Galloway D A. Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 and L2 open reading frames. *Virology* 1988;164:467-477.
- 239.** Li C H, Shah K V, Seth A, Gilden R V. Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera. *J Virol* 1987;61:2684-2690.
- 240.** Kurman R J, Jenson A B, Lancaster W D. Papillomavirus infection of the cervix. II. Relationship to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structural proteins. *Am J Surg Pathol* 1983;7:39-52.
- 241.** Gupta J W, Gupta P K, Shah K V, Kelly D P. Distribution of human papillomavirus antigen in cervicovaginal smears and cervical tissues. *Int J Gynecol Pathol* 1983;2:160-170.

- 242.** Portolani M, Borgatti M A, Bartoletti A M, et al. Papillomavirus genus-antigens in vulvar and cervical condylomatous lesions. *Microbiologica* 1983;6:115-120.
- 243.** Woodruff J D, Braun L, Cavalieri R, Gupta P, Pass F, Shah K V. Immunologic identification of papillomavirus antigen in condyloma tissues from the female genital tract. *Obstet Gynecol* 1980;56:727-732.
- 244.** Sato S, Okagaki T, Clark B A, et al. Sensitivity of koilocytosis, immunochemistry, and electron microscopy as compared to DNA hybridization in detecting human papillomavirus in cervical and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1987;5:297-307.
- 245.** Syrjanen K, Vayrynen M, Castren O, Mantyjärvi R, Pyrhonen S, Yliskoski M. Morphological and immunohistochemical evidence of human papillomavirus (HPV) involvement in the dysplastic lesions of the uterine cervix. *Int J Gynecol Obstet* 1983;21:261-269.
- 246.** Syrjanen K J, Pyrhonen S. Immunoperoxidase demonstration of human papillomavirus (HPV) in dysplastic lesions of the uterine cervix. *Arch Gynecol* 1982;233:53-61.
- 247.** Toki T, Oikawa N, Tase T, Satoh S, Wada Y, Yajima A. Immunohistochemical demonstration of papillomavirus antigen in cervical dysplasia and vulvar condyloma. *Gynecol Obstet Invest* 1986;22:97-101.
- 248.** Breitburd F, Croissant O, Orth G. Expression of human papillomavirus type-1 E4 gene products in warts. En: Steinberg B M, Brandsmad J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells 5: Papillomaviruses*. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory 1987;115-122.
- 249.** Doorbar J, Campbell D, Grand R J A, Gallimore P H. Identification of the

human papillomavirus-1a E4 gene products. *EMBO J* 1986;5:355-362.

250. Crum C P, Barber S R, Symbula M, Snyder K, Saleh A M, Roche J K. Co-expression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* 1990;178:238-246.

251. Sekine H, Fuse A, Inaba N, Takamizawa H, Simizu B. Detection of the human papillomavirus 6b E2 gene product in genital condyloma and laryngeal papilloma tissues. *Virology* 1989;170:92-98.

252. Cason J, Patell D, Naylor J, et al. Identification of immunogenic regions of the major coat protein of human papillomavirus type 16 that contain type-restricted epitopes. *J Gen Virol* 1989;70:2973-2987.

253. Christensen N D, Kreider J W, Cladel N M, Galloway D A. Immunological cross-reactivity to laboratory-produced HPV-11 virions of polysera raised against bacterially derived fusion proteins and synthetic peptides of HPV-6b and HPV-16 capsid proteins. *Virology* 1990;175:1-9.

254. Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977;113:237-251.

255. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory Manual. Vol II.* New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

256. Law M-F, Lancaster W D, Howley P M. Conserved polynucleotide sequences among the genomes of papillomaviruses. *J Virol* 1979;32:199-207.

257. Willet G D, Kurman R J, Reid R, Greenberg M, Jenson A B, Lorincz A T. Correlation of the histological appearance of intraepithelial neoplasia of the cervix with human papillomavirus types. *Int J Gynecol Pathol* 1989;8:18-25.

- 258.** Broker T R, Chow L T. Human papillomaviruses of the genital mucosa: electron microscopic analyses of DNA heteroduplexes formed with HPV types 6, 11, and 18. En: Botchan M, Grodzicker T, Sharp P A, eds. *Cancer cells 4: DNA tumor viruses*. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory 1986;589-594.
- 259.** Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
- 260.** Maitland N J, Cox M F, Lynas C, Prime S S, Meanwell C A, Scully C. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987;56:245-250.
- 261.** Dubeau L, Chandler L A, Gralow J R, Nichols P W, Jones P A. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin fixed pathology specimens. *Cancer Res* 1986;46:2964-2970.
- 262.** Goelz S E, Hamilton S R, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:118-124.
- 263.** Mark A, Trowell H, Dyall-Smith M L, Dyall-Smith D J. Extraction of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded pathology specimens and its use in hybridization (histo-blot) assays. Application to the detection of human papillomavirus DNA. *Nucleic Acids Res* 1987;56:501-507.
- 264.** Nuovo G J, Silverstein S J. Comparison of formalin, buffered formalin, and Bouin's fixation on the detection of human papillomavirus DNA from genital lesions. *Lab Invest* 1988;59:720-724.
- 265.** Nuovo G J, Richart R M. A comparison of slot blot, Southern blot and in situ hybridization analyses for human papillomavirus DNA in genital tract lesions.

Obstet Gynecol 1989;74:673-677.

266. Moench T R, Gendelman H E, Clements J E, Narayan O, Griffin D E. Efficiency of in situ hybridization as a function of probe size and fixation technique. *J Virol Methods* 1985;11:119-130.

267. Nuovo G J, Richart R M. Buffered formalin is the superior fixative for the detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization analysis. *Am J Pathol* 1989;134:837-842.

268. Syrjanen S, Syrjanen K. An improved in situ DNA hybridization protocol for detection of human papillomavirus (HPV) DNA sequences in paraffin-embedded biopsies. *J Virol Methods* 1986;14:293-304.

269. Maples J. A method for the covalent attachment of cells to glass slides for use in immunohistochemical assays. *Am J Clin Pathol* 1985;83:356-363.

270. Denhardt D T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;23:641-647.

271. Wahl G M, Stern M, Stark G R. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3683-3688.

272. Renz M, Kurz C. A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucleic Acids Res* 1984;12:3435.

273. Amasino R M. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal Biochem* 1986;152:304-309.

274. Syrjanen S, Partanen P, Mantjarvi R, Syrjanen K. Sensitivity of in situ hybridization techniques using biotin- and ³⁵S-labeled human papillomavirus

(HPV) DNA probes. *J Virol Methods* 1988;19:225-238.

275. Nuovo G J, Richart R M. A comparison of Biotin- and ³⁵S-based *in situ* hybridization methodologies for detection of human papillomavirus DNA. *Lab Invest* 1989;61:471-476.

276. Crum C P, Nagai N, Levine R U, Silverstein S. In situ hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia. *Am J Pathol* 1986;123:174-182.

277. Gupta J W, Gupta P K, Rosenshein N, Shah K V. Detection of human papillomavirus in cervical smears: a comparison of *in situ* hybridization, immunocytochemistry and cytopathology. *Acta Cytol* 1987;31:387-396.

278. Neumann R, Heiles B, Zippel C, et al. Use of biotinylated DNA probes in screening cells obtained from cervical swabs for human papillomavirus DNA sequences. *Acta Cytol* 1986;30:603-607.

279. Caussy D, Orr W, Daya A D, Roth P, Reeves W, Rawls W. Evaluation of methods for detecting human papillomavirus deoxyribonucleotide sequences in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:236-243.

280. Cornelissen M T E, van der Velden K J, Walboomers J M M, et al. Evaluation of different DNA-DNA hybridisation techniques in detection of HPV 16 DNA in cervical smears and biopsies. *J Med Virol* 1988;25:105-114.

281. Melchers W J G, Herbrink P, Walboomers J M M, et al. Optimization of human papillomavirus genotype detection in cervical scrapes by a modified filter *in situ* hybridization test. *J Clin Microbiol* 1989;27:106-110.

282. Parkkinen S. Nucleic acid sandwich hybridization in detection of HPV 16 DNA: technique and its clinical application. *J Virol Methods* 1988;19:69-77.

- 283.** Parkkinen S, Mantyjarvi R, Syrjanen K, Ranki M. Detection of human papillomavirus DNA by the nucleic acid sandwich hybridization method from cervical scraping. *J Med Virol* 1986;20:279-288.
- 284.** Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
- 285.** Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
- 286.** Shibata D K, Arnheim N, Martin W J. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988;167:225-230.
- 287.** Melchers W J G, Claas H C J, Quint W G V. Use of the polymerase chain reaction to study the relationship between human papillomavirus infections and cervical cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:714-727.
- 288.** Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-238.
- 289.** Kitchin P A, Szotyori Z, Fromhole C, Almond N. Avoidance of false positives. *Nature* 1990;244:201.
- 290.** Beyer-Finkler E, Pfister H, Girardi F. Anti-contamination primers to improve specificity of polymerase chain reaction in human papillomavirus screening. *Lancet* 1990;ii:1289-1290.
- 291.** Pao C C, Lin C Y, Maa J S, Lai C H, Wu S Y, Soong Y K. Detection of human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1990;161:113-115.

- 292.** Anceschi M M, Falcinelli C, Pieretti M, Cosmi E V. Multiple primer pairs PCR for the detection of HPV types. *J Virol Methods* 1990;28:59-66.
- 293.** Claas E C J, Melchers W, van de Linden J, Lindeman J, Quint W. Human papillomavirus detection in paraffin embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1989;135:703-709.
- 294.** Melchers W J G, van den Brule A J C, Walboomers J M M, et al. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction as compared to modified FISH and Southern blot analysis. *J Med Virol* 1989;27:329-335.
- 295.** Van den Brule A J C, Meijer C J L M, Bakels V, Kenemans P, Walboomers J M M. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:2739-2743.
- 296.** Van den Brule A J C, Claas E C J, du Maine M, et al. Use of anticontamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *J Med Virol* 1989;29:20-27.
- 297.** Van den Brule A J C, Snijders P J F, Gordijn R L J, Bleker O P, Meijer C J L M, Walboomers J M M. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 1990;45:644-649.
- 298.** Tidy J A, Mason P, Farrell P J. A new and sensitive method for screening for human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol* 1989;74:410-414.
- 299.** Young L S, Bevan I S, Johnson M A, et al. The polymerase chain reaction:

a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. *Br Med J* 1989;298:14-18.

300. Nuovo G J. Human papillomavirus DNA in genital tract lesions histologically negative for condylomata. Analysis by in situ, southern blot hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1990;14:643-651.

301. Resnick R M, Cornelissen M T E, Wright D K, et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Nat Cancer Inst* 1990;82:1477-1484.

302. Burmer G C, Parker J D, Bates J, East K, Kulander B G. Comparative analysis of human papillomavirus detection by polymerase chain reaction and Virapap/Viratype kits. *Am J Clin Pathol* 1990;94:554-559.

303. Kiyabu M T, Shibata D, Arnheim N, Martin W J, Fitzgibbons P L. Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1989;13:221-224.

304. Yliskoski M, Tervahauta A, Saarikoski S, Mantyjärvi R, Syrjänen K. Clinical course of cervical human papillomavirus lesions in relation to coexistent cervical infections. *Sex Transm Dis* 1992;19:137-139.

305. Barton S E, Hollingworth A, Maddox P H, et al. Possible cofactors in the etiology of cervical intraepithelial neoplasia. An immunopathologic study. *J Reprod Med* 1989;34:613-616.

306. Hildesheim A, Reeves W C, Brinton L A, et al. Association of oral contraceptive use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers. *Int J Cancer* 1990;45:860-864.

307. Mougín C, Schaal J P, Bassignot A, et al. Detection of human papillomavirus

and human cytomegalovirus in cervical lesions by in situ hybridization using biotinylated probes. *Biomed Pharmacother* 1991;45:353-357.

308. Burger M P, Hollema H, Gouw A S, Pieters W J, Quint W G. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *BMJ* 1993;306:749-752.

309. Yee C I, Krishnan-Hewlett I, Baker C C, Schlegel R, Howley P M. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985;119:361-366.

310. Baker C C, Phelps W C, Lindgren V, Braun M J, Gonda M A, Howley P M. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987;61:962-971.

311. Mincheva A, Gissman L, Zur Hausen H. Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by the in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol* 1987;176:245-256.

312. Brigati D J, Budgeon L R, Unger E R, et al. Immunocytochemistry is automated development of a robotic workstation based upon the capillary action principle. *J Histotechnol* 1988;11:165-183.

313. Brandsma J, Burk R D, Lancaster W D, Pfister H, Schiffman M H. Interlaboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 1989;43:260-262.

314. Pao C C, Lai C H, Wu S Y, Young K C, Chang P L, Soong Y K. Detection of human papillomaviruses in exfoliated cervicovaginal cells by in situ DNA Hybridization Analysis. *J Clin Microbiol* 1989;27:168-173.

315. Beckmann A M, Sherman K J, Myerson D, Daling J R, McDougall J K,

Galloway D A. Comparative virologic studies of condylomata acuminata reveal a lack of dual infections with human papillomaviruses. *J Infect Dis* 1991;163:393-396.

316. Schadendorf D, Tiedemann K H, Haas N, Czarnetzki B M. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded condylomata acuminata. Comparison of immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 1991;97:549-554.

317. Bejui-Thivolet F, Liagre N, Patricot L M, Chardonnet Y, Chignol M C. Human papillomavirus DNA in cervix. In situ hybridization with biotinylated probes on Bouin's fixed paraffin embedded specimens. *Pathol Res Pract* 1992;188:67-73.

318. Jou P, Palacín A, Puig-Tintoré L M, et al. Infección por papilomavirus humano en el tracto genital femenino. Estudio inmunohistoquímico. *Clin Invest Ginecol Obstet* 1989;16:181-187.

319. Ochotorena M M. *Lesiones genitales por papilomavirus humanos. Estudio inmunohistoquímico, de hibridación in situ y ultraestructural.* Tesis doctoral. Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. 1993.

320. Hara Y, Tuchida S, Nakamura T, et al. Human papillomavirus infection of the uterine cervix analyzed by nonisotopic in situ hybridization. *J Med Virol* 1990;31:120-128.

321. Guérin-Reverchon I, Chardonnet Y, Chignol M C, Thivolet J. A comparison of methods for the detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization with biotinylated probes on human carcinoma cell lines. *J Immunol Methods* 1989;123:167-176.

322. Herrington C S, Burns J, Graham A K, Evans M, McGee J O'D. Interphase cytogenetics using biotin and digoxigenin labelled probes I: relative sensitivity of

both reporter molecules for detection of HPV 16 in CaSki cells. *J Clin Pathol* 1989;42:592-600.

323. Bleiweiss I J, Heller D, Dottino P, Cass I, Deligdisch L. Identifying human papillomavirus subtypes in cervical biopsies with in situ DNA hybridization with biotinylated probes. *J Reprod Med* 1992;37:151-156.

324. Unger E R, Hammer M L, Chenggis M L. Comparison of ³⁵S and biotin as labels for in situ hybridization: use of and HPV model system. *J Histochem Cytochem* 1991;39:145-150.

325. Herrington C S, de Angelis M, Evans M F, Troncone G, McGee J O'D. Detection of high risk human papillomavirus in routine cervical smears: strategy for screening. *J Clin Pathol* 1992;45:385-390.

326. Konno R, Sato S, Yajima A. Progression of squamous cell carcinoma of the uterine cervix from cervical intraepithelial neoplasia infected with human papillomavirus: a retrospective follow-up study by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int J Gynecol Pathol* 1992;11:105-112.

327. Thompson C H, Rose B R. Deleterious effects of formalin/acetic acid/alcohol (FAA) fixation on the detection of HPV DNA by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Pathology* 1991;23:327-330.

328. Faulkner-Jones B E, Bellomarino V M, Borg A J, Orzeszko K, Garland S M. Detection and typing of human papillomavirus using the Vira Type "in situ" kit: comparison with a conventional dot blot technique. *J Clin Pathol* 1990;43:913-917.

329. Cooper K, Herrington C S, Graham A K, Evans M F, McGee J O'D. In situ human papillomavirus (HPV) genotyping of cervical intraepithelial neoplasia in South African and British patients: evidence for putative HPV integration in vivo. *J Clin Pathol* 1991;44:400-405.

- 330.** Cooper K, Herrington C S, Graham A K, Evans M F, McGee J O'D. In situ evidence for HPV 16, 18, 33 integration in cervical squamous cell cancer in Britain and South Africa. *J Clin Pathol* 1991;44:406-409.
- 331.** Nuovo G J, Darfler M M, Impraim C C, Bromley S E. Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am J Pathol* 1991;13:53-58.
- 332.** Meyer M P, Carbonell R I, Mauser N A, Kanbour A I, Amortegui A J. Detection of human papillomavirus in cervical swab samples by ViraPap and in cervical biopsy specimens by in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 1993;100:12-17.
- 333.** Thomassen L V, Warshaw J, Lawhead R A Jr, Unger E R. Invasive cervical cancer in young women. Clinicopathologic correlation and demonstration of human papillomavirus by in situ hybridization. *J Reprod Med* 1992;37:901-906.
- 334.** Aznar J, Ojeda A, Torres M J, Palomares J C, Rodríguez-Pichardo A. Dual genitotropic human papillomavirus infections in genital warts. *Genitourin Med* 1993;69:60-62.
- 335.** Riera J R, Junco P, Sampedro A, et al. Caracterización de tipos de papiloma virus humanos en displasias leves con cambios condilomatosos por hibridación in situ. *Patología* 1990;23:171-175.
- 336.** Domínguez F, Riera J R, Junco P, et al. Detección y tipificación del virus del papiloma humano en biopsias de cuello uterino. Un estudio de correlación con variables clínicas y morfológicas. *Clin Invest Ginecol Obstet* 1992;19:102-108.
- 337.** Herrington C S, Anderson S M, Graham A K, McGee J O. The discrimination of high-risk HPV types by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Histochem J* 1993;25:191-198.

- 338.** Reid R, Greenberg M, Jenson B, et al. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:212-222.
- 339.** Gitsch G, Reinthaller A, Tatra G, Breitenecker G. Diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection: punch biopsy versus cervical smear. *Arch Gynecol Obstet* 1991;249:179-184.
- 340.** Cooper K, Herrington C S, Stickland J E, Evans M F, McGee J O'D. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol* 1991;44:990-996.
- 341.** Pöllänen R, Vuopala S, Lehto V P. Detection of human papillomavirus infection by non-isotopic in situ hybridisation in condylomatous and CIN lesions. *J Clin Pathol* 1993;46:936-939.
- 342.** Toki T, Yajima A. "HPV score". A scoring system for histological diagnosis of human papillomavirus infection in dysplasia of the uterine cervix. *Acta Pathol Jpn* 1987;449-455.
- 343.** Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* 1990;335:1171-1174.
- 344.** Iwasaka T, Yokoyama M, Oh-uchida M, et al. Detection of human papillomavirus genome and analysis of expression of c-myc and Ha-ras oncogenes in invasive cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1992;46:298-303.
- 345.** Brahic M, Haase A T, Cash E. Simultaneous in situ detection of viral RNA and antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5445-5448.
- 346.** Haase A T. Analysis of viral infections by in situ hybridization. *J Histochem*

Cytochem 1986;34:27-32.

347. Mullink H, Walboomers J M, Tadema T M, Jansen D J, Meijer C J. Combined immuno- and non-radioactive hybridocytochemistry on cells and tissue sections: influence of fixation, enzyme pre-treatment, and choice of chromogen on detection of antigen and DNA sequences. *J Histochem Cytochem* 1989;37:603-609.

348. Van der Loos C, Volkers H, Rook R, van den Berg F, Houthoff H J. Simultaneous application of DNA in situ hybridization and immunohistochemistry on one tissue section. *Histochemical J* 1989;21:279-284.

349. Cubie H A, Norval M. Detection of human papilloma viruses in paraffin wax sections with biotinylated synthetic oligonucleotide probes and immunogold staining. *J Clin Pathol* 1989;42:988-991.

350. Van den Brink W, van der Loos C, Volkers H, et al. Combined β -galactosidase and immunogold/silver staining for immunohistochemistry and DNA in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1990;38:325-329.

351. Graham A K, Herrington C S, McGee J O'D. Simultaneous in situ genotyping and phenotyping of human papillomavirus cervical lesions: comparative sensitivity and specificity. *J Clin Pathol* 1991;44:96-101.

352. Heiles H B, Genersch E, Kessler C, Neumann R, Eggers H J. In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. *Biotechniques* 1988;6:978-981.

353. Kataja V, Syrjanen K, Syrjanen S, et al. Prospective follow-up of genital HPV infections: survival analysis of the HPV typing data. *Eur J Epidemiol* 1990;6:9-14.

354. Hellberg D, Nilsson S, Grad A, et al. Behavior of cervical intraepithelial

neoplasia (CIN) associated with various human papillomavirus (HPV) types. *Arch Gynecol Obstet* 1993;252:119-128.

355. Paper T, Friedman M, Nur I. Use of sulfonated primers to detect and type papillomavirus in cell cultures and cervical biopsies. *Gene* 1991;103:155-161.

356. Weaver M G, Abdul-Karim F W, Dale G, Sorensen K, Huang Y T. Outcome in mild and moderate cervical dysplasias related to the presence of specific human papillomavirus types. *Mod Pathol* 1990;3:679-683.

357. Dudzinski M R, Haskill S J, Fowler W C, et al. DNA content in cervical neoplasia and its relationship to prognosis. *Obstet Gynecol* 1987;69:373-377.

358. Kashyap V, Das D K, Luthra U K. Microphotometric DNA analysis in moderate dysplasia of the uterine cervix. Correlation to the progression and regression of the lesion. *Acta Oncol* 1990;29:755-759.

359. Mulhaupt H, Bruder E, Elit L, Rothblat I, Warhol M. Combined analysis of cervical smears. Cytopathology, image cytometry and in situ hybridization. *Acta Cytol* 1993;37:373-378.

360. Tosi P, Luzi P, Santopietro R, et al. Morphometric assessment of the biological potential of human papillomavirus infections in the uterine cervix. *Appl Pathol* 1988;6:247-257.

361. Devictor B, Bonnier P, Piana L, et al. C-myc protein and Ki-67 antigen immunodetection in patients with uterine cervix neoplasia: correlation of microcytophotometric analysis and histological data. *Gynecol Oncol* 1993;49:284-290.

362. Tervahauta A I, Syrjänen S M, Vayrynen M, Saastamoinen J, Syrjänen K J. Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus (HPV)

DNA in genital carcinomas and precancer lesions. *Anticancer Res* 1993;13:1107-1111.

363. Holm R, Skomedal H, Helland A, Kristensen G, Borresen A L, Nesland J M. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant and malignant tissues of the cervix uteri. *J Pathol* 1993;169:21-26.

364. Bosari S, Roncalli M, Viale G, Boss P, Coggi G. p53 immunoreactivity in inflammatory and neoplastic diseases of the uterine cervix. *J Pathol* 1993;169:425-430.

365. Kulski J K, Demeter T, Rakoczy P, Sterrett G F, Pixley E C. Human papillomavirus coinfections of the vulva and uterine cervix. *J Med Virol* 1989;27:244-251.

366. Rymak P, Forslund O, Hansson B G, Lindholm K. Genital HPV infection not a local but a regional infection: experience from a female teenage group. *Genitourin Med* 1993;69:18-22.