



Células cervicales de citología evaluadas por un nuevo método de diagnóstico: cuantificaciones de la aplicabilidad clínica

Rodríguez-Velásquez Javier-Oswaldo^a, Prieto-Bohórquez Signed-Esperanza^a,
Ramírez-López Juan-Leonardo^b

(a) Grupo Insight, Universidad Militar Nueva Granada – Centro de Investigaciones de la Clínica del Country, Bogotá, Colombia.

(b) Grupo TIGUM, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia

Recibido el 8 de marzo de 2019; aceptado el 9 de septiembre de 2019

PALABRAS CLAVE

Fractales.
Modelos teóricos.
Carcinoma.
Cuello del útero.

Resumen:

Objetivo. Confirmar la aplicabilidad clínica de la metodología diagnóstica que permite mediante el espacio de ocupación del núcleo establecer diferencias entre los diferentes tipos de lesiones celulares.

Metodología. Mediante la superposición de una rejilla de 8x8 píxeles, se cuantificó el espacio ocupado por la superficie del núcleo y del citoplasma de 10 células normales, 12 ASCUS (Células escamosas atípicas de significado indeterminado), 12 L-SIL (Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado) y 14 H-SIL (Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado), adicionalmente la proporción C/N, buscando si éstas se encuentran dentro de los rangos de valores establecidos previamente. Se calculó la sensibilidad, especificidad, coeficiente de probabilidad negativo y Kappa respecto al 'gold standard'.

Resultados. Las medidas hechas en los espacios de ocupación del núcleo de cada una de las células se encontraron dentro del rango de valores previamente establecidos, incluyendo las células ASCUS evitando de esta manera su indeterminación. La comparación respecto al 'gold standard' presentó sensibilidad y especificidad del 100%, coeficiente de probabilidad negativo de cero, y un coeficiente Kappa de uno.

Conclusiones. Se confirmó la reproductibilidad y aplicabilidad clínica de la metodología diagnóstica diseñada para evaluar el grado de lesión de las células de cuello uterino, a partir del espacio ocupado por el núcleo, lo cual implica un correcto seguimiento de la lesión en el tiempo a nivel clínico, alertando sobre alteraciones que se dirijan a malignidad.

© 2020 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Fractal.
Theoretical models.
Carcinoma.
Cervix uteri.

Cervical cells from cytology evaluated by a new diagnostic method: quantifications of clinical applicability

Abstract :

Objective. To confirm the clinical applicability of the diagnostic methodology that allows, through the space of occupation of the nucleus, to establish differences between the different types of cellular lesions.

Methodology. By the superposition of a grid of 8x8 pixels, the space occupied by the surface of the nucleus and the cytoplasm of 10 normal cells, 12 ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance), 12 L-SIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions) and 14 H-SIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesions), in addition the C/N ratio, looking for if these are within the previously established ranges of values. The sensitivity, specificity, negative likelihood ratio and the Kappa coefficient were calculated with respect to Gold Standard.

Results. The measurements made in the spaces of occupation of the nucleus of each of the cells were within the range of previously established values, including ASCUS cells thus avoiding their indetermination. The comparison with Gold Standard showed sensitivity and specificity of 100%, negative likelihood ratio of zero, and a Kappa coefficient of one.

Conclusions. The reproducibility and clinical applicability of the diagnostic methodology designed to evaluate the degree of lesion of the cervical cells from the space occupied by the nucleus was confirmed, which implies a correct follow-up of the lesion over time at the clinical setting, alerting about alterations that are directed to malignity. anemias.

© 2020 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. All rights reserved.

Introducción

Los objetos regulares han sido medidos con geometrías que caracterizan, por órdenes de magnitud, la longitud, área o volumen, como es el caso de la geometría euclidiana. No obstante, desde el contexto de la geometría fractal la irregularidad de los objetos de la naturaleza ha sido caracterizada de manera correcta mediante la dimensión fractal¹. Existen diferentes tipos de fractales dentro de los cuales se encuentran las estructuras del cuerpo humano como son las células y tejidos que por sus características los ubican dentro del grupo de fractales salvajes o naturales. El grado de irregularidad de este tipo fractales es establecido mediante la dimensión fractal calculada con el método de Box-Counting², método con el cual se establecen relaciones en la ocupación espacial de un objeto en diferentes escalas.

El año 2018 se estimó que el cáncer de cuello uterino ocupa el cuarto puesto de cáncer más frecuente en mujeres, es decir, representa el 6.6% de todos los tipos de cáncer femeninos³. Los cambios neoplásicos previos, de acuerdo con propiedades como son el color, la forma y la textura del núcleo y del citoplasma en células cervicales⁴, puede ser detectados mediante la citología vaginal, prueba de frotis de Papanicolaou (o prueba Pap) o frotis Pap. No obstante, esta evaluación es altamente subjetiva cuando se trata de evaluar las anteriores características desde la imagen original, ya que los resultados histológicos pueden verse afectados por factores como son el nivel de cansancio o estrés del médico⁵.

A la luz de estos resultados, se ha hecho necesario realizar análisis avanzado de imágenes mediante compu-

tadoras, lo cual se ha convertido en una parte integral de muchos proyectos de investigación⁹. Sin embargo, cuando se trabaja con imágenes obtenidas a partir de un microscopio, se debe estar preparado para controlar ciertos factores como son la iluminación desigual, el ruido del detector, y los artefactos de compresión^{6,7}; sumado a esto, existen aberraciones relacionadas con las limitaciones físicas de la óptica ya existente⁸. Para disminuir estas limitaciones, se han utilizado otras técnicas que buscan imitar las imágenes adquiridas mediante microscopía de fluorescencia, las cuales crean imágenes en 2D⁹ y 3D^{10,11} que simulan el núcleo de la célula. Otro método utilizado para este tipo de imágenes de células cervicales tomadas del microscopio, es la segmentación con la cual se busca distinguir el fondo, el citoplasma y el núcleo de la célula¹². Dicha segmentación permitiría medir de manera automática las características de interés que hayan demostrado ser discriminativas para la detección de estas lesiones.

La automatización de las imágenes de células de cuello uterino se puede mejorar mediante la aplicación de metodologías diagnósticas desarrolladas en el contexto de la física y matemática teórica, permitiendo caracterizar de forma objetiva estados preneoplásicos y neoplásicos¹³⁻¹⁷. Para ello se hizo uso de la geometría fractal y se establecieron rangos de valores matemáticos para los estados histológicos de normalidad o anormalidad que ubican a las células ASCUS dentro de este rango de valores¹³. Desde esta nueva forma caracterizar las partes de la célula, se amplía el conocimiento que hasta el momento se tiene de los diferentes cambios que se pueden

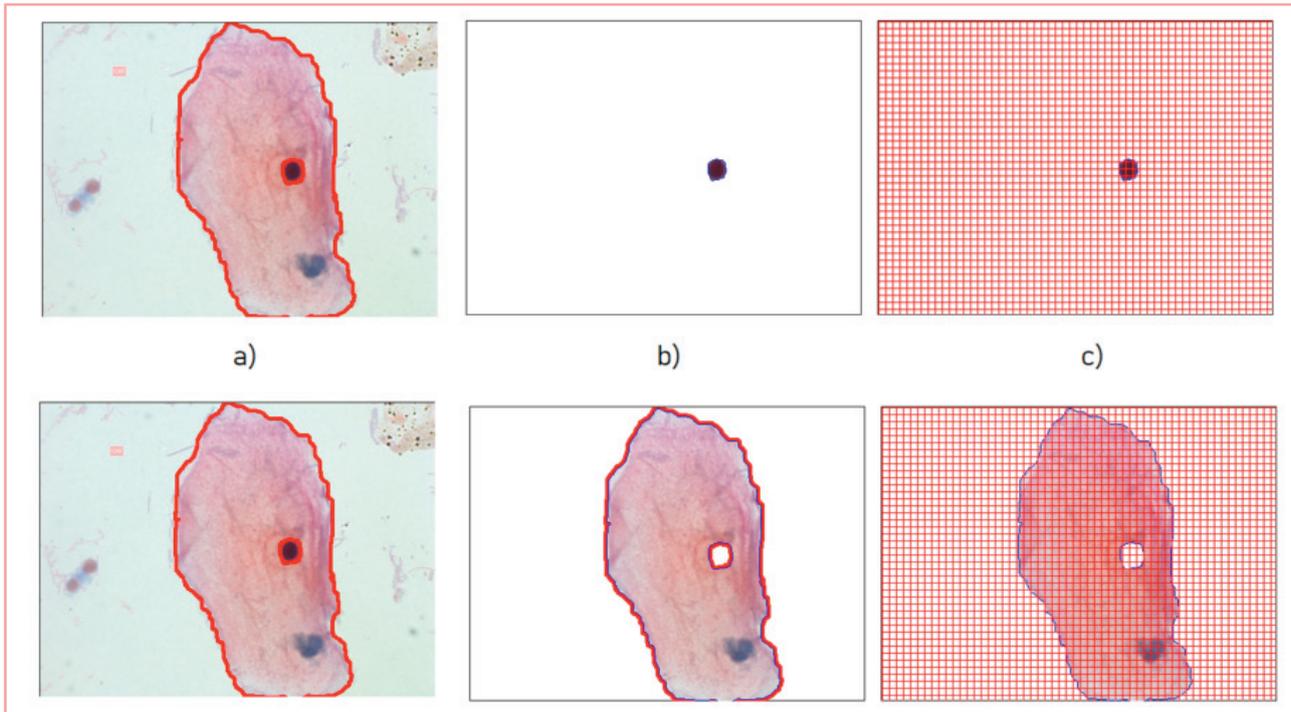


Figura 1. Célula normal donde a) está el núcleo (N) y el citoplasma (C) delineado; b) es el núcleo separado del total de la célula, c) superposición de la rejilla de 8 x 8 píxeles en el núcleo; d) es el citoplasma separado del total de la célula, e) superposición de la rejilla de 8 x 8 píxeles en el citoplasma.

dar en la célula. La generalización realizada en los trabajos de Rodríguez et al, es una muestra de esta amplitud de conocimiento, ya que permite tener la medida de todos los posibles prototipos celulares cervicales desde la normalidad hasta el carcinoma, incluyendo las células ASCUS^{14, 15}.

En un estudio reciente Rodríguez y et al, desarrollaron una nueva metodología diagnóstica de aplicación clínica, la cual caracteriza con mayor precisión la ocupación espacial de los núcleos de las células, los cuales son considerados en la histología como diferenciadores entre estados normales y de mayor lesión de la célula.

Adicionalmente, la metodología logró establecer la totalidad de posibles rutas de alteraciones celulares que van desde la normalidad hasta el grado de lesión máximo establecido histológicamente¹⁷. Esto fue posible gracias al establecimiento de rangos de valores de la superficie de núcleo en el contexto del espacio fractal generalizado de Box Counting, los cuales permiten hacer distinciones más precisas entre las células. Por ejemplo, estos rangos de valores posicionan las células ASCUS en un rango de valores matemáticos asociados con la normalidad y los diferentes grados de lesión celular, lo cual evita la indeterminación de este tipo de células.

El propósito del presente estudio es confirmar la reproductibilidad y aplicabilidad clínica de la metodología diagnóstica de lesiones preneoplásicas y neoplásicas de células escamosas cérvicouterinas fundamentada en la ocupación espacial del núcleo en el espacio de Box Counting¹⁷, a partir del cual se facilite el seguimiento histológico en el tiempo.

Métodos

Para el estudio se seleccionaron 48 células de extendidos de láminas citológicas de cuello uterino seleccionadas por un patólogo experto, de mujeres con edades entre 20 y 55 años, provenientes de investigaciones previas del grupo Insight. Las células, cuya citología fue normal y con diferentes grados de lesión hasta carcinoma de acuerdo con los parámetros convencionales, la clasificación H-SIL incluye el estadio de carcinoma.

A continuación, los extendidos de láminas citológicas de cuello fueron observadas en un microscopio Leika DM-2500 con un aumento de 100X, y fotografiadas posteriormente. De cada fotografía se delinearon 10 células diagnosticadas histológicamente como normales, 12 ASCUS, 12 L-SIL y 14 H-SIL. Para que las imágenes fueran reconocidas por el *software*, estas fueron editadas en Microsoft Office Professional Plus 2010. Posteriormente se superpuso la rejilla de 8x8 píxeles para evaluar el espacio ocupado por la superficie del núcleo (N) y la del citoplasma sin núcleo (C), es decir, se hizo un conteo en píxeles del espacio que ocupan los objetos N y el C (ver figuras 1 y 2), tal y como es indicado por el método de Box Counting con la siguiente ecuación (1):

$$D = \frac{\text{Log}N(2^{-(k+1)}) - \text{Log}N(2^{-k})}{\text{Log}2^{k+1} - \text{Log}2^k}$$

En donde D es la dimensión fractal; N representa el número de cuadros ocupado por el objeto en la cuadrícula de grado de partición K.

Vale la pena resaltar que, en el presente estudio la ecuación 1 fue utilizada para el conteo de los espacios ocupados por los objetos al superponer la rejilla, no para

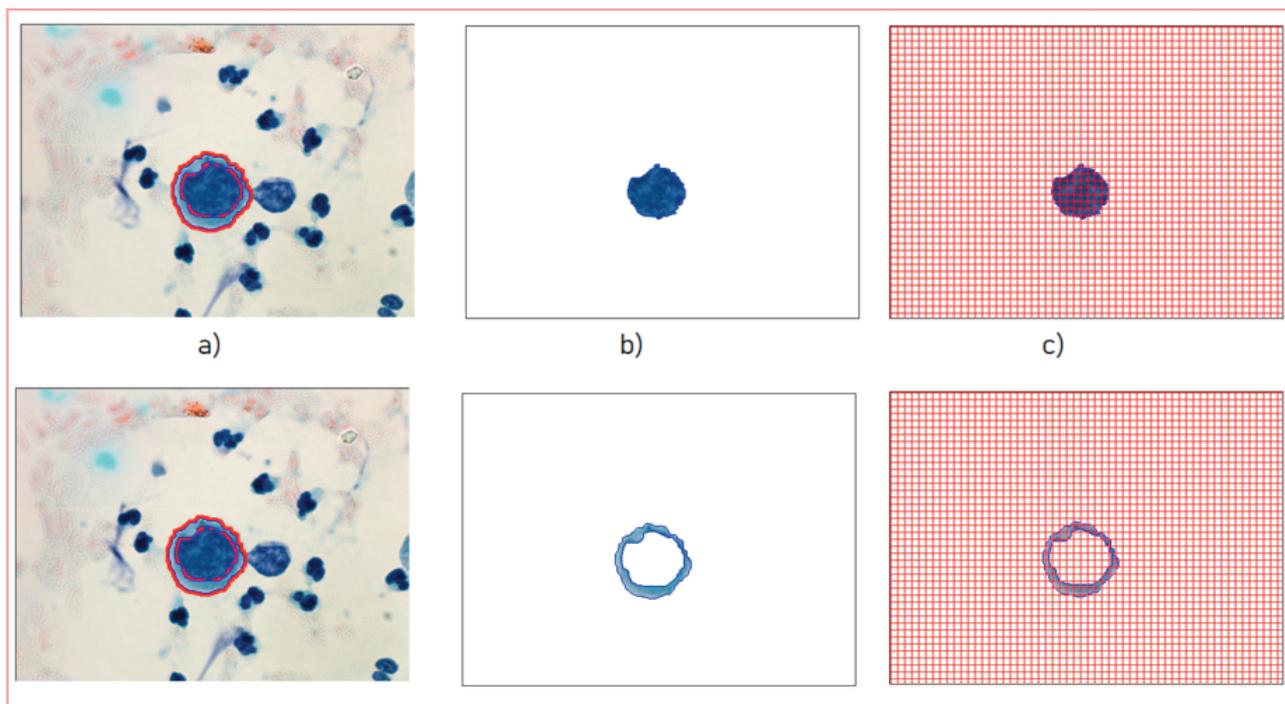


Figura 2. Célula H-SIL donde a) está el núcleo (N) y el citoplasma (C) delineado; b) es el núcleo separado del total de la célula, c) superposición de la rejilla de 8 x 8 píxeles en el núcleo; d) es el citoplasma separado del total de la célula, e) superposición de la rejilla de 8 x 8 píxeles en el citoplasmas.

hallar los valores de la dimensión fractal. Finalmente, se procedió a calcular la proporción entre el C/N a partir de los valores hallados para cada célula, es decir, se halló el cociente entre el número de espacios ocupados en la rejilla de 8x8 píxeles por el C y el N.

Posteriormente, los resultados de este estudio fueron contrastados con los valores diagnósticos establecidos previamente¹⁶, cuyos rangos de valores máximos y mínimos permiten establecer diferencias y comparaciones histológicas entre las células de la siguiente manera, una célula es histológicamente normal cuando se caracteriza por una superficie del núcleo que varía entre 41 y 14, y la del citoplasma sin en núcleo varía entre 1724 y 358; es L-SIL cuando la superficie del núcleo varía entre 170 y 47, y la del citoplasma sin en núcleo varía entre 1132 y 170; es H-SIL cuando la superficie del núcleo varía entre 221 y 185, y la del citoplasma sin en núcleo varía entre 896 y 584.

Para realizar el análisis estadístico fueron desenmascarados los resultados de los diagnósticos histológicos, los cuales fueron considerados como *gold-standard*. Para confirmar tanto la aplicabilidad y reproductibilidad de la metodología desarrollada en el presente estudio, se diseñó una tabla de contingencia 2x2 así: el grupo de células cuyo diagnóstico histológico y matemático son de lesión corresponden a los verdaderos positivos (VP); el grupo de células cuyo diagnóstico histológico y matemático es de normalidad corresponde a los verdaderos negativos (VN); en cambio, el grupo de células cuyos diagnóstico histológico es normal pero matemáticamente están dentro de los rangos de lesión corresponden a los falsos positivos (FP); finalmente el grupo de células evaluadas matemáticamente como normales

pero con diagnóstico histológico de lesión corresponden a los falsos negativos (FN).

Una vez hallados estos valores se calculó la sensibilidad y especificidad, evaluado el nivel de concordancia entre el *gold-standard* y el diagnóstico físico matemático con el coeficiente Kappa. Vale la pena resaltar las células clasificadas como ASCUS, no cuentan con un diagnóstico histológico específico de lesión o normalidad; por ello, al no contar con un *gold-standard*, se excluyeron del análisis estadístico. Con referencia a lo anterior, la evaluación matemática busca para estos casos establecer relaciones diagnósticas de estas células con los estadios de normalidad y lesión con los cuales se pueda precisar diferenciaciones cuantitativas.

Resultados

Los valores de los espacios de ocupación de la superficie del citoplasma sin núcleo presentaron valores para las células histológicas evaluadas como normales entre 388 y 11167, para L-SIL entre 235 y 736, y entre 591 y 824 para H-SIL. Los valores de la relación C/N variaron entre 9,7 y 40,241 para las células evaluadas histológicamente como normales, entre 1,451 y 13,143 para L-SIL, y para H-SIL variaron entre 2,995 y 980 (ver tabla I).

Los espacios de ocupación de la superficie del núcleo variaron entre 29 y 40 para la normalidad, entre 47 y 169 para L-SIL, entre 192 y 213 para L-SIL (ver tabla I).

De los resultados anteriores se puede observar cómo los espacios de ocupación de la superficie nuclear permiten realizar distinciones histológicas más precisas, a partir del aumento progresivo de la superficie del núcleo, que es característico de una lesión celular más grave.

Tabla I
Mediciones matemáticas de 12 células analizadas con la rejilla de 8x8 píxeles
y el respectivo diagnóstico convencional y matemático

No Célula	Diagnóstico matemático	C	N	C/N	Evaluación histológica
1	N	1167	29	40.241	N
2	N	735	29	25.345	N
3	N	1509	19	79.421	ASCUS
4	N	388	40	9.7	N
5	LSIL	428	47	9.106	LSIL
6	LSIL	235	162	1.451	LSIL
7	LSIL	464	169	2.746	LSIL
8	LSIL	736	56	13.143	LSIL
9	HSIL	768	188	4.085	ASCUS
10	HSIL	638	213	2.995	HSIL
11	HSIL	591	192	3.078	HSIL
12	HSIL	824	207	3.981	HSIL

C: ocupación espacial del citoplasma. N: Ocupación espacial del núcleo. C/N: proporción entre ambas medidas. Evaluación histológica emitida por el experto según los parámetros convencionales y diagnóstico matemático basado en la metodología desarrollada previamente por Rodríguez et al.

En el caso de las células histológicas evaluadas como ASCUS, los valores de la superficie del citoplasma variaron entre 247 y 1509. Los valores de la superficie del núcleo variaron entre 21 y 209 y los valores de la relación C/N variaron entre 1,65 y 71,16 (ver tabla I). De los resultados de los espacios ocupados por la superficie del núcleo, se observa que 3 células ASCUS tienen un diagnóstico matemático de normalidad, 7 corresponden a LSIL y 2 corresponden a H-SIL, lo que hace que este tipo de células esté completamente diferenciadas (ver tabla I).

Los cálculos de concordancia entre la evaluación histológica y la metodología diagnóstica arrojan resultados de sensibilidad y una especificidad del 100%, una razón de probabilidad negativa de cero y un coeficiente de Kappa de uno, que evidencia la aplicabilidad clínica de la presente metodología.

Discusión

Este es el primer trabajo que confirma la aplicabilidad clínica de la metodología diagnóstica la cual caracteriza el núcleo de la célula, en el contexto de las nociones matemáticas como son la superficie de la geometría euclidiana y la irregularidad de la geometría fractal. La metodología permite hacer distinciones más precisas entre células de cuello uterino normal y los diferentes estadios de la lesión, a partir de la cuantificación de la ocupación espacial de la superficie del núcleo mediante lo cual se establece un diagnóstico físico-matemático objetivo y reproducible. El cálculo de los espacios ocupados por el núcleo de las células seleccionadas para el estudio, al ser sus valores comparados permitieron establecer diferencias entre normalidad, H-SIL y L-SIL, encontrando como resultado que dentro del grupo de células histoló-

gicamente clasificadas como ASCUS, sus valores matemáticos las ubicaron dentro del grupo de células normales y LSIL, evitando de esa manera la indeterminación de este tipo de células. La prueba diagnóstica dio como resultado una sensibilidad y especificidad del 100%, un coeficiente Kappa de 1 y un Negative Likelihood Ratio de 0, comparada con los métodos clínicos convencionales.

En la actualidad se está buscando el diseño de programas que simulen los detalles mínimos de las imágenes de las células adquiridas mediante microscopía de fluorescencia, debido a que, al trabajar con datos biológicos el desafío de estos programas está en hacer frente a la amplia variación presente en las muestras⁶. En cambio, la presente metodología cuenta con la capacidad de medir el núcleo y el citoplasma, así como todas las posibles variaciones de las células, a partir de fotografías tomadas de células observadas en el microscopio, lo cual reduce costos y hace más certero el diagnóstico y la diferenciación entre células de cuello uterino normal y los diferentes estadios de la lesión¹⁷. Esto resulta posible debido al lenguaje matemático que sustenta este trabajo, mediante el cual se puede cuantificar de forma objetiva el cambio de la ocupación espacial del núcleo, y mediante este realizar un seguimiento de su evolución, así como el acercamiento progresivo hacia un estadio celular de mayor gravedad¹⁷.

Las células ASCUS se caracterizan por su indeterminación a la hora de clasificarlas dentro de los grupos de lesiones ya establecidos. La presente metodología al establecer rangos de valores que caracterizan la normalidad y los diferentes grados de lesión permite cuantificar histológicamente qué tan cerca o lejos se encuentra de valores matemáticos relacionados con normalidad. Los

parámetros de anormalidad, permiten identificar con mayor facilidad una progresión hacia estadios malignos, lo cual contribuye a superar las dificultades diagnósticas y de reproducibilidad observadas en los sistemas de medida utilizados en el sistema Bethesda, lo que podría permitir una unificación de estos sistemas¹⁹⁻²².

La presente metodología logra hacer distinciones matemáticas entre los núcleos de las células, a partir de la medida del espacio ocupado por la superficie del núcleo, en el contexto de la geometría fractal. Vale la pena resaltar que el éxito de la presente metodología se basa en que se están haciendo medidas en instantes donde la célula va tendiendo a estadios de menor o mayor gravedad de la lesión.

Lo anterior también se puede entender desde el contexto de Prigogine el cual afirma que para la evaluación de los fenómenos en el tiempo, disponemos de ventanas temporales, es decir, observaciones discretas en momentos puntuales del proceso²³.

Consideraciones éticas

Según las guías éticas del artículo 11 de la resolución 008430 de 1993 establecidas por el Ministerio de salud de Colombia, el presente estudio fue realizado conforme a estos principios establecidos, el cual se clasifica dentro de la categoría de investigación sin riesgo, ya que realiza medidas matemáticas y geométricas en resultados de exámenes de la práctica clínica que han sido prescritos médicamente, protegiendo la integridad y el anonimato de los participantes¹⁸.

Financiación

Producto derivado del proyecto INV-ING-2361, financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Militar Nueva Granada-Validez 2016.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Militar Nueva Granada por su apoyo a nuestra investigación, especialmente al Fondo de Investigación de la Universidad, el Vicerrectorado de Investigación y la Facultad de Ingeniería. Agradecemos a los doctores Yanneth Méndez, vicerrectora Académica; Marcela Iregui, vicerrectora de Investigación; Elsa Adriana Cárdenas, directora de Investigación de la Facultad de Ingeniería; y al Ing. José Octavio Duque, decano de la Facultad de Ingeniería.

Extendemos nuestra gratitud al Centro de Investigación de la Clínica de Campo, especialmente a los médicos Tito Tulio Roa, director de Educación Médica; Jorge Alberto Ospina, director Médico; y Alfonso Correa, director del Centro de Investigación, por el apoyo de nuestro grupo.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no presentar conflictos de intereses.

Bibliografía

- Mandelbrot B. The Fractal Geometry of Nature. San Francisco: Freeman Ed; 1972. p. 341-348.
- Mandelbrot B. Introducción. En: Mandelbrot B, editores. Los Objetos Fractales. Barcelona: Tusquets Eds. S.A; 2000. p.13-26.
- WHO. Cervical Cancer. [Actualizado 2019; citado el 8 marzo 2019] Disponible en: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>.
- Saslow D. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. A Cancer Journal for Clinicians. 2012; 62(Issue 3):147-172. 2012.
- Peluffo M. Revoluciones Conceptuales en Patología Cervical. Ascune Hermanos. 2a edición. Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2003.
- Patrik Malm, Anders Brun, Ewert Bengtsson. Simulation of bright-field microscopy images depicting pap-smear specimen. Cytometry A. 2015; 87(3): 212-226.
- Lehmussola A, Ruusuvoori P, Selinummi J, Huttunen H, Yli-Harja O. Computational framework for simulating fluorescence microscope images with cell populations. IEEE Trans Med Imaging. 2007; 26(7):1010-6.
- Svoboda D, Kozubek M, Stejskal S. Cytometry A. Generation of digital phantoms of cell nuclei and simulation of image formation in 3D image cytometry. 2009; 75(6):494-509.
- Ellenberger SL. CN Delft, Netherlands Delft University of Technology Influence of defocus on measurements in microscope images. 2000.
- Svoboda D, Kozubek M, Stejskal S. Generation of digital phantoms of cell nuclei and simulation of image formation in 3D image cytometry. Cytometry A. 2009; 75(6):494-509
- Svoboda D, Kasik M, Maska M, Hubeny J, Stejskal S, Zimmermann M. On simulating 3D fluorescent microscope images. In: Kropatsch W, Kampel M, Hanbury A, editors. Computer Analysis of Images and Patterns. Berlin Heidelberg: Springer; 2007. pp. 309-316.
- Mejía M, Rubiano A, Alzate M. Segmentación de imágenes de células cervicales y evaluación de características para detección de lesiones neoplásicas. Ingeniare. Rev. Chil. Ing. 2016; 24(2):
- Rodríguez J. Nuevo método fractal de ayuda diagnóstica para células preneoplásicas del epitelio escamoso cervical. Rev UDCA Act & Div Cient 2011; 14:15-22.
- Rodríguez J, Prieto S, Correa C, Posso H, Bernal P, Viteri S, Puerta G, Rojas I. Generalización fractal de células preneoplásicas y cancerígenas del epitelio escamoso cervical de aplicación clínica. Rev Fac Med. 2010; 18(2):173-181.
- Rodríguez J, Prieto S, Melo M, Domínguez D, Cardona D, Correa C, López F, Rodríguez L. Simulación de rutas de alteración de células de cuello uterino desde el estado normal hasta lesión intraepitelial de bajo grado. Rev UDCA Act & Div Cient. 2014; 17(1): 5-12.

- 16 Prieto S, Rodríguez J, Correa C, Soracipa Y. Diagnosis of cervical cells based on fractal and Euclidian geometrical measurements: Intrinsic Geometric Cellular Organization. *BMC Medical Physics* 2014, 14(2):1-9.
- 17 Velásquez J, Prieto S, Catalina C, Dominguez D, Cardona DM, Melo M. Geometrical nuclear diagnosis and total paths of cervical cell evolution from normality to cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2015; 11(Issue 1): 98-104.
- 18 Ministerio de Salud-Colombia. Resolución número 8430. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá D.C., 1993.
- 19 Lacruz C. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol* 2003; 36:5-10.
- 20 Smith AE, Sherman ME, Scott DR, Tabbara SO, Dwor-kin L, Olson J, et al. Review of the Bethesda System atlas does not improve reproducibility or accuracy in the classification of atypical squamous cells of undetermined significance smears. *Cancer* 2000; 90:201-6.
- 21 Stoler MH, Schiffman M, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates for the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001; 285:1500-5.
- 22 Lachman MF, Cavallo C. Qualification of atypical squamous cells of undetermined significance in an independent laboratory: is it useful or significant? *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:421-9.
- 23 Fernández A. Introducción. En: Fernández-Rañada A, editor. *Orden y Caos*. Barcelona: Prensa Científica S.A.; 1990. p. 4-8.