



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudio de Postgrado
e Investigación

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**

Título del trabajo:

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE ATIPIA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (ASC-US)
Y SIN PODER EXCLUIR LESIÓN INTRAEPITELIAL DE
ALTO GRADO (ASC-H) Y DETECCIÓN MOLECULAR DEL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO (VPH-AR) POR PRUEBA
DE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR).

**Trabajo de Investigación que presenta:
DR. DAMIÁN RAMÓN SÁNCHEZ ZAVALA**

**Para obtener el Diploma de la Especialidad de:
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**Asesor de Tesis
DR. FERNANDO ENRIQUE DE LA TORRE Y RENDÓN**



No. de registro de protocolo:
400. 2012

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Félix Octavio Martínez Alcalá

Coordinador de Capacitación,
Desarrollo e Investigación

Dr. Guilebaldo Patiño Carranza

Jefe de Enseñanza

Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano

Jefe de Investigación

Dr. Luis Cisneros Sotelo

Jefe del Servicio de
Anatomía Patológica

Dr. Fernando Enrique De La Torre y Rendón

Jefe de Laboratorio de Patología Quirúrgica
Asesor de Tesis

DEDICATORIA

En memoria de la
Doctora Esperanza Tamariz Herrera
por dirigir este trabajo.
Su apoyo, confianza y capacidad,
fueron fundamentales.
Gracias...

ACLARACIÓN

Este estudio fue diseñado y mejorado desde su inicio y en todo su desarrollo por la Dra. Esperanza Tamariz Herrera jefe del Laboratorio de Citopatología. Debido a su fallecimiento fue revisado en su etapa final por el Dr. Fernando E. De la Torre y Rendón

ÍNDICE

1.	MARCO TEÓRICO	
1.1.	Antecedentes.....	1
	Citología de cérvix.....	2
	Virus del Papiloma Humano.....	9
	Reacción en Cadena de Polimerasa.....	22
1.2.	Definición del problema.....	25
1.3.	Hipótesis.	
1.4.	Objetivo general.	
1.5.	Objetivos específicos.	
1.6.	Justificación.	
2.	MATERIAL Y MÉTODO.	
2.1.	Diseño.....	26
2.2.	Grupo de estudio.	
2.3.	Tamaño de la muestra.....	27
	2.3.1. Criterios de inclusión.	
	2.3.2. Criterios de exclusión.	
	2.3.3. Criterios de eliminación.	
3.	RESULTADOS.....	29
4.	DISCUSIÓN.....	37
5.	CONCLUSIONES.....	38
6.	ASPECTOS ÉTICOS.	
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
8.	ANEXOS.....	42

RESUMEN

Establecer cuál es el significado citológico del diagnóstico de ASC-US o de ASC-H en relación a la positividad de la prueba de PCR con VPH de alto riesgo (VPH-AR) es importante debido a la falta de concordancia en el diagnóstico morfológico y a la conducta clínica subsecuente.

Se recolectaron del archivo de laboratorio de citopatología el total de muestras con tinción de Papanicolaou tomadas por el servicio de colposcopia del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos y de las clínicas de medicina familiar de la Delegación Zona Sur del ISSSTE con diagnóstico de ASC-US y ASC-H; posteriormente se identificaron los casos con prueba de PCR para VPH de alto riesgo en el periodo comprendido entre diciembre de 2011 a septiembre de 2012.

El análisis de resultados nos indica que la frecuencia de VPH de alto riesgo esta presente en los casos con diagnóstico citológico de ASC en un 33%, consecuentemente es importante el seguimiento de las pacientes con este diagnóstico, ya que sin existir una lesión colposcópica evidente, podemos hacer un diagnóstico con factores de riesgo reales, lo cual cambia la conducta clínica y de tratamiento subsecuente.

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes.

A fines de 1988 y con motivo de elaborar un sistema para diagnosticar la citología cérvico – vaginal, un grupo de expertos en patología cervical se reunieron en el Instituto Nacional del Cáncer en Bethesda, Maryland, EUA; de lo que se desencadenó el desarrollo del conocido sistema Bethesda que modificaría de manera sustancial el diagnóstico en grados y utilizado hasta ese momento por la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica.

Posteriormente en la conferencia de Bethesda de 1991 se introdujo el término de atipia de células escamosas de significado indeterminado, enunciado bajo el acrónimo ASC-US y definido como aquellos cambios citológicos sugestivos de lesión intraepitelial escamosa (LIE), pero que carecen de algunos criterios que nos permitan una interpretación definitiva. En principio, éste fue resistido por la mayoría de la comunidad científica y no se plasmó de forma rutinaria en los informes de la citología cervicovaginal. (1)

Comprendiendo la resistencia de muchos a utilizar este diagnóstico, en la siguiente conferencia de Bethesda realizada en el año 2001, se modifica el acrónimo ASC-US utilizando solamente la denominación de “células escamosas atípicas” (ASC), a la que se dividió en dos grupos. El ASC-US como células escamosas atípicas de significado indeterminado y el ASC-H como células escamosas atípicas en las que no es posible excluir una lesión de alto grado o que de alguna manera sugiere una probable lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG).

En alrededor del 20 al 30% de los casos de mujeres con ASC-US se detecta LIEAG en el seguimiento, mientras que las mujeres con ASC-H tienen un valor predictivo mayor en relación con ASC-US. (2,3)

Establecer cuál es el significado citológico del diagnóstico de ASC-US o de ASC-H en relación a la positividad de la prueba de PCR con VPH de alto riesgo (VPH-AR) es importante debido a la falta de concordancia en el diagnóstico morfológico y a la conducta clínica subsecuente.

A continuación se abordan tres temas que debemos estudiar para comprender y desarrollar este trabajo de investigación.

Citología de cérvix.

El diagnóstico citológico del cérvix puede realizarse con el extendido convencional o la citología líquida.

La tinción indicada es la de Papanicolaou que utiliza tres colorantes:

1. Hematoxilina de Harris. Es muy concentrada y permite efectuar una intensa coloración nuclear (1-2 min.) Se diferencia de la fórmula original en que no contiene mercurio, y que se le ha añadido un estabilizante glicólico.
2. OG-6. Para tinción citoplásmica, sin metanol. Colorea los elementos queratinizados rosa-anaranjado.
3. EA-50, Para tinción citoplásmica, sin metanol. Permite diferenciar las células cianófilas (citoplasma celeste - verde).

El cuello uterino está tapizado por dos tipos de epitelio: el exocervical que es plano, escamoso, estratificado, no queratinizado y el endocervical que es alto, cilíndrico mucosecretor. (4)

A continuación se detalla cada uno de estos.

Exocérvix:

En el extendido celular se identifican los cuatro tipos de células de epitelio escamoso:

Células superficiales.

Tienen un diámetro de 50 a 60µm de citoplasma eosinófilo, de forma poligonal, transparente y homogéneo, limitado con nitidez hacia su parte externa. Las células se presentan aisladas o en grupos laxos, se pueden identificar gránulos queratohialinos.

El núcleo puede medir 7µm con forma de vesícula con cromatina distribuida fina y regularmente, o bien, puede ser picnótico, compacto, en el que la cromatina está condensada.

Células intermedias.

Tienen un tamaño aproximado de 30 a 50µm y su núcleo mide alrededor de 8µm, de citoplasma basófilo, con forma poligonal a redondeada y sus núcleos generalmente son vitales, de cromatina finamente granular, vesiculosos, con pequeño nucleolo. Pueden diferenciarse células intermedias grandes y pequeñas; las grandes contienen glucógeno, que puede visualizarse de color amarillo perinuclear.

Células parabasales.

Tienen un diámetro de 20µm y un núcleo de alrededor 9µm. Se tiñen intensamente basófilas y muestran una forma oval alargada o redondeada. Pueden diferenciarse células parabasales grandes o pequeñas. En la posmenopausia, en la infancia, en el puerperio y en presencia de ciertas enfermedades endocrinas constituyen el tipo celular predominante.

Células basales.

Estas células tienen diámetro citoplasmático de 12 a 14µm y el diámetro del núcleo es de 8 a 10µm de modo que la relación Núcleo: Citoplasma a favor del núcleo; el citoplasma toma una tinción basófila intensa y el núcleo con frecuencia muestra cambios por degeneración, si la estructura de la cromatina está conservada puede ser visible un nucléolo pequeño. (5)

Endocérvix: Epitelio glandular.

El epitelio del canal endocervical es cilíndrico alto mucosecretor y reviste tanto la superficie, como las hendiduras y criptas subyacentes a la mucosa superficial. Las mucinas secretadas constan de cadenas de macromoléculas dispuestas en filamentos que forman unidades o micelios. Los núcleos son basales de cromatina granular con diminuto nucleolo.

Las células pueden aparecer aisladas o en conglomerados, debido a la cantidad de secreción contenida en el citoplasma pueden presentar varias formas, desde cúbicas hasta globosas. (4)

El arreglo de los conglomerados puede asemejar un panal de abejas o estar dispuestas en empalizada o teclado de piano.

Zona de transición: Unión escamo-columnar.

El sitio de unión de los dos epitelios (escamoso y cilíndrico) es llamada la zona de unión escamo-columnar (UEC); es la porción dinámica del cérvix sujeta a fenómenos proliferativos y de remodelación, donde se transforman el epitelio endocervical cilíndrico mucosecretor en epitelio pavimentoso. (4)

El sitio de unión de ambos epitelios puede ser muy variable ya que está relacionado con la edad y depende de la acción de las hormonas ováricas, menarca, menopausia y del embarazo.

Zona de transformación: Metaplasia de células escamosas.

Definición: Zona tapizada de células de metaplasia escamosa que se localiza entre la unión escamo-columnar primitiva hasta el epitelio columnar.

El cambio del epitelio cilíndrico al epitelio plano se denomina metaplasia, siendo fundamentalmente un fenómeno fisiológico, que se desarrolla a lo largo de toda la vida de la mujer.

Los cambios morfológicos de la metaplasia escamosa se dividen en:

1. Hiperplasia de las células de reserva.
2. Metaplasia inmadura.
3. Metaplasia madura.
4. Atipia.
5. Displasia.
6. Carcinoma.

Las células escamosas metaplásicas normales pueden ser citológicamente semejantes a las células parabasales, tener variabilidad considerable de tamaño y forma, tamaño nuclear y relación Núcleo: Citoplasma (N:C). (5)

Los núcleos son redondos a ovales, de cromatina granular fina y reticular con nucléolo aparente. Usualmente el citoplasma es denso y cianófilo, en ocasiones con vacuolas secretoras (Alonso), se les llama células en araña por las prolongaciones de los puentes intercelulares.

Las células de metaplasia inmadura se descaman en pequeños grupos, láminas o cadenas atrapadas en estrías de moco.

Las células metaplasia escamosa inmadura tienen un área celular promedio de $318\mu\text{m}^2$, a diferencia de las células metaplásicas maduras, que tienen un área promedio de $640\mu\text{m}^2$. El promedio del área nuclear de las células metaplásicas ronda los 50 a $60\mu\text{m}^2$, con lo cual la relación N:C es mucho más alta que cualquiera de las células escamosas normales. (5)

Células escamosas atípicas.

Definición.

El término ASC representa cambios citológicos que sobrepasan los cambios inflamatorios pero que no son concluyentes de lesión intraepitelial escamosa, que son cualitativa o cuantitativamente insuficientes para elaborar un diagnóstico citológico definitivo.

Para determinar la interpretación ASC es imprescindible hallar núcleos de aspecto anómalo; sin embargo, los cambios citoplasmáticos que a menudo están asociados a la infección por VPH, tales como la eosinofilia densa (paraqueratosis) y los halos perinucleares (coilocitos), deberían impulsar una búsqueda minuciosa de células que justifiquen la interpretación de ASC o LIE.

El diagnóstico de Atipia de Células Escamosas (ASC) solamente expresa cambios citomorfológicos que pueden estar inducidos por diferentes factores biológicos y sugieren seguimiento citológico, colposcópico e histológico.(6)

En la actualidad, todo laboratorio de patología que posea control de calidad aceptable tiene un 5% global de diagnósticos de ASC. Si se excede este límite se entiende que se está realizando un sobrediagnóstico y que algunos parámetros internos del laboratorio deberían ser rápidamente corregidos, debido a que ante un diagnóstico de ASC se ponen en acción una serie de estudios complementarios, colposcópicos, histológicos, citológicos, prueba de detección del VPH; los que implican un alto costo para la paciente y para los sistemas de salud. (7,8)

Por ello, para que un estudio citológico sea catalogado como ASC, debe mostrar 3 características básicas:

- 1) Diferenciación escamosa.
- 2) Aumento de la relación núcleo-citoplasma.
- 3) Hiperchromasia nuclear que suele ser mínima, pero con carga cromatínica irregular y distribuida de forma granular, con sectores condensados adheridos a la membrana nuclear.

Puede ocurrir gigantismo celular y ocasional multinucleación.

Las células intermedias normales constituyen una fuente adecuada de comparación para determinar si el tamaño y el aspecto del núcleo de las células atípicas cumplen con los criterios de ASC-US.

El Sistema Bethesda-2001 establece que las células con ASC-US tienen el tamaño y la forma de las células escamosas intermedias o superficiales; con menor frecuencia pueden ser redondas parabasales o intermedias profundas o metaplásicas, mientras que las células con ASC-H son pequeñas, con marcada alteración de la relación núcleo- citoplasmática y de igual o menor tamaño al de las células metaplásicas.

Podemos deducir que aquellas alteraciones observadas en el ASC-H son similares a las presentes en las LIEAG, mientras que las de ASC-US nos sugieren una LIEBG.

La categoría ASC fue creada para calificar la muestra citológica en su totalidad y no para definir células por separado y no nos permite diferenciar si existe asociada una infección por VPH de alto riesgo, sólo sugerirlo, lo cual conlleva a que la conducta terapéutica inmediata no es siempre la más pertinente. (9)

Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US).

Las células de ASC-US típicas tienen el tamaño y la forma de células escamosas intermedias o superficiales.

También entran dentro de esta categoría las células redondeadas u ovoides que tienen alrededor de un tercio del tamaño de las células superficiales y se asemejan a células intermedias pequeñas o metaplásicas grandes.

Criterios. (citología líquida y convencional)

1. Los núcleos tienen aproximadamente entre dos veces y media y tres veces el tamaño del área del núcleo de una célula escamosa intermedia normal (alrededor de $35\mu\text{m}^2$)
2. Leve aumento de la relación existente entre el área nuclear y el área citoplasmática.
3. Hiperchromasia nuclear mínima e irregularidad de la distribución cromatínica o de la morfología nuclear.
4. Anomalías nucleares asociadas a citoplasma eosinófilo denso (paraqueratosis atípica).
5. En citología líquida, las células pueden parecer más grandes y más planas.

Células escamosas atípicas, no es posible descartar lesión intraepitelial escamosa de alto grado (ASC-H).

Las células ASC-H suelen ser escasas. Pueden presentar la siguiente morfología:

a) Células pequeñas con relación núcleo: citoplasma alta: “metaplasia atípica (inmadura)”.

Criterios:

1. Las células suelen estar aisladas o agrupadas en pequeños fragmentos de menos de 10 células; a veces, en extendidos convencionales, las células pueden observarse en hilera dentro del moco.
2. Las células tienen el mismo tamaño que las células metaplásicas y un núcleo que es entre una vez y media y dos veces y media más grande de lo normal.
3. La relación núcleo: citoplasma puede ser similar a la de lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG).
4. Son signos representativos de LIEAG la Hiper Cromasia, irregularidad cromatínica y la morfología nuclear anómala con irregularidad focal.
5. En citología líquida, pueden ser muy pequeñas y tener el núcleo sólo entre dos y tres veces más grande que el de un neutrófilo.

b) Disposición en lámina densa.

Criterios

1. Microbiopsia de células en lámina densa cuyo núcleo puede mostrar pérdida de la polaridad o ser difícil de observar.
2. La presencia de citoplasma denso, morfología celular poligonal y fragmentos de bordes lineales nítidos por lo general inclina la interpretación hacia la diferenciación escamosa más que hacia la glandular.

Es importante destacar que los núcleos con alteraciones degenerativas, siempre que no se confirme histológicamente LIE, suelen ser irregulares o hiper cromáticos, pero las irregularidades suelen afectar a la totalidad del contorno nuclear, lo que les otorga un aspecto plegado, y la cromatina es granular. Las células ASC-H suelen ser escasas; cuando se identifica gran cantidad de pequeña células atípicas, es más probable que se trate de una verdadera lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG).

La configuración en lámina densa puede representar LIEAG, células endocervicales neoplásicas o reactivas o atrofia con artificio por aplastamiento. Por lo general, el hallazgo de citoplasma denso, células poligonales y fragmentos con bordes celulares nítidos es representativo de diferenciación escamosa más que glandular.

Postratamiento con radioterapia, las células benignas típicas irradiadas presentan agrandamiento proporcionado del núcleo y el citoplasma, asociados a degeneración.

Las células endometriales degeneradas y los macrófagos también pueden tener un núcleo que se asemeje a los de LIEAG, lo que puede generar interpretaciones falsas positivas; así mismo, en mujeres con uso de DIU pueden presentar células benignas anómalas con una relación N:C muy alta, que asemejan LIEAG y la interpretación de ASC-H puede ser apropiada si la causa de los cambios observados no es certera o referida. **(10)**

Virus del Papiloma Humano.

La familia de virus de papiloma humano (VPH) contiene más de 200 genotipos con heterogeneidad molecular y claras diferencias de afinidad y especificidad con el tipo de lesiones que originan, los cuales se han clasificado en 16 grupos (A a P) (Dimmock, Kradin, Forbes).

La clasificación de los virus del papiloma humano se basa en la homología de la secuencia de ADN.

También se han clasificado atendiendo a la especificidad tisular (cutáneos y de mucosas) y de acuerdo con su asociación con lesiones benignas o malignas (oncogénicos o no oncogénicos). (11)

Estructura génica.

Son virus sin envoltura, el virión mide entre 45 a 55nm, la cápside es icosaédrica, y está formada por dos proteínas estructurales que forman 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros). El genoma es circular y consta de una cadena doble (bicatenario) de ADN de 7800 a casi 8000 pares de bases el cual se replica y ensambla en el núcleo; genoma de tamaño limitado que no codifica enzimas limitantes de la replicación viral y por tanto depende de la maquinaria genética de la célula hospedera y de su replicación para reproducirse y desarrollarse, esta compuesto por tres regiones:

Una región no codificante, pero si reguladora (upstream regulatory region, URR o región larga de control: RLC) de 400 pares de bases adyacente al origen de la replicación viral en dirección 5' que contiene secuencias a las que se unen factores de transcripción tanto de tipo positivo como negativo, entre ellos se incluye la proteína activadora 1 (AP 1), el factor 1 de transcripción específico de queratinocitos (KRF 1), un factor nuclear (NF-1/CTF), así como factores transcripcionales codificados por la región precoz. La región URR controla la transcripción y con ello la síntesis de proteínas de las regiones precoz y tardía.

Debido a su capacidad de unir gran número de factores específicos de transcripción, juega un papel crítico determinando las posibilidades de infección y genotipos para un determinado huésped.

El ADN del VPH codifica 7 u 8 genes de expresión temprana (E1 a E8), dependiendo del virus, y dos genes de expresión tardía o estructurales (L1-L2):

La Región Precoz (Early region: E) le sigue a la región URR y contiene seis regiones codificantes (E1, E2, E4, E5, E6, E7) de las cuales la E6 y E7 generan proteínas con alto poder oncogénico que se traduce en poder transformante y de inmortalización celular. El resto de segmentos sintetizan proteínas propias de la estructura y función del virus. (12) (fig.1)

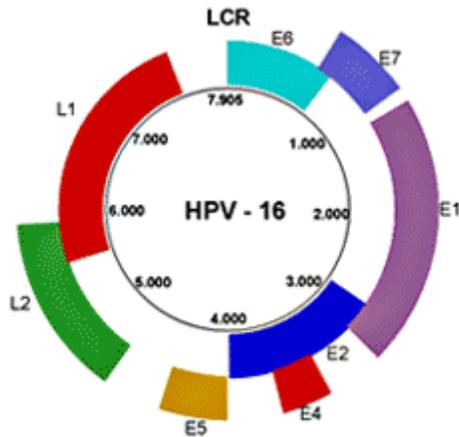


Figura 1. Murray P R, Rosenthal K S. Microbiología Médica. 2007.

La proteína (gen) E1: Es el más grande y de los más conservados de los VP, casi 2 Kb de secuencia y de 67.5 (VPH 47) a 76.2 kDa (VPH 10) para la proteína nuclear y con 593 (VPH 48) a 681 aminoácidos (VPH 10).

Codifica dos proteínas requeridas para la replicación extracromosómica del ADN viral y para completar su ciclo vital. Algunos de los "cebadores de consenso" ("consensus primers") amplifican esta región como es el Cpl-CpIIIG.

La proteína se divide en tres regiones: un dominio amino terminal, que se sospecha regula las actividades de E1 residentes en el C-terminal, pues es blanco de una serie de fosforilaciones que influyen positiva o negativamente en la función; una región espaciadora de longitud variable y una región carboxilo terminal más grande, relacionada en función a las ATPasas y helicasas. E1 es una 3' → 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del DNA viral. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática y se hallan codificadas en el dominio carboxilo terminal. E1 se une al origen de replicación, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la RLC, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al DNA de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexamérico. La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, crítica para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas de desenrollamiento de la doble hélice.

E1 interacciona directamente con la DNA- polimerasa α , mientras que esta necesita las proteínas RPA, que estabilizan la cadena sencilla del duplex abierto, topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA y RFC (factor de replicación C) para que se lleve a cabo la replicación.

La unión de E1 a su sitio en la RLC depende a su vez de su acoplamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-DNA. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1, E2 es finalmente desplazado mediante una reacción dependiente de ATP. Se ha demostrado recientemente que el dominio de unión al DNA de E1 (E1DBD) estimula la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1, lo que sugiere que la interacción E1DBD - E2TAD funciona más en la regulación de la actividad transcripcional que en la replicación del DNA viral. (13)

La proteína (gen) E2: El producto del gen E2, de aproximadamente 1100pb, es una proteína nuclear de 45 kDa.

Se divide en tres dominios funcionales:

El primero, en el extremo amino-terminal, es el dominio de activación (E2TAD), responsable de regular la transcripción y la replicación del DNA viral, promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al DNA en sitios distantes provocando una curvatura en la molécula de DNA y otros cambios conformacionales. (14)

El segundo dominio es el de bisagra o dominio central, de longitud y secuencia más variables entre los VPs; en VPH 11 es importante para regular la función de E2 durante la transcripción del ARNm y la replicación viral, además que le da estabilidad al complejo E2 - DNA.

El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al DNA, de casi 100 aminoácidos. E2 se une al palíndromo de 12 pb ACCgNNNNcGGT, llamado el sitio de unión de E2 (E2BS), que sufre un cambio de conformación al unirse a la proteína. Las letras en minúsculas son las bases preferenciales pero no requeridas para la unión al DNA. La región NNNN se llama espaciadora, su longitud es conservada entre los VPs pero la secuencia varía con el tipo viral. El genoma de los VPH-AR contiene 4 sitios E2BS ubicados en la RLC o URR, que se hallan hacia el 5' del promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos. La unión de E2 al DNA provoca la represión o activación de dicho promotor y la replicación del DNA viral. A su vez, estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2, así como del sitio, de los cuatro existentes, al que se haya unido. La unión al sitio más próximo del promotor, BS1 afecta la estabilidad del complejo de preinicio de la transcripción. La unión a los sitios BS2 y BS3 también contribuye a la represión del promotor compitiendo con factores de transcripción como SP1. La unión a BS3 es necesaria para la replicación viral. E2 es más afín a BS4 y la unión a este sitio regula positivamente la expresión génica, aunque los mecanismos para que se lleve a cabo no son del todo claros.

E2 puede también invocar al complejo de preinicio de la transcripción (PIC) e influye en el remodelaje de la cromatina, interactuando con el coactivador CBP/p300, el cual se sabe tiene una actividad de acetilación de histonas (HAT). La interacción es débil pero se sabe que E2 también se une a la proteína celular AMF-1/Gps2, quien también interactúa con el coactivador p300. Por tanto la unión de E2 a AMF-1 atrae a p300 y el resultado es la sobre expresión génica por un efecto aditivo. E2 también tienen una función anti-proliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, mediante la represión de la transcripción de E6 y E7 y por el consecuente aumento de P53. E2 induce arresto en G1 por medio de la activación del complejo p21/WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2. (13)

La proteína (gen) E4: La proteína E4 parece ser importante para la maduración y replicación viral; la proteína E4 del HPV 16 en queratinocitos humanos produce un colapso y acumulación de las queratinas citoplasmáticas que podría ser la causa del característico halo perinuclear de los "coilocitos".

La secuencia codificante de E4, aproximadamente 260 pb, está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4 de 10 a 44 kDa, se expresa a partir de un ARNm procesado, de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del DNA viral. La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales.

La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma, durante las LIE causadas por VPH 16, pero también se halla de manera difusa en regiones perinucleares y citoplasmáticas. E4 causa el colapso de dichas queratinas y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones de VPH 16. Causa arresto en la fase G2 del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1, E4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral. (15)

E4 puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección. El hecho de que ambas proteínas, E2 y E4, pueden inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral. La expresión elevada de E2 y E4 en células epiteliales en cultivo provoca la acumulación de E2 en el citoplasma y co-localización de esta con E4. La adición de E4 incrementa o disminuye la transcripción mediada por E2, dependiendo de las concentraciones relativas de ambas proteínas. A las concentraciones fisiológicas hay un incremento de la actividad transcripcional del promotor P97. Esta evidencia sugiere que durante la infección productiva, E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas.(13)

La proteína (gen) E5: Es de aproximadamente 230 a 250 pb, codifica una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa. Es una proteína de membrana e hidrofóbica que se halla principalmente en el retículo endoplásmico y Golgi, pero también en la membrana citoplasmática.

La función principal de la proteína E5 es acomplejarse y sobre regular la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el del factor de crecimiento epidérmico(EGFR) o el del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR).

La ATPasa es un complejo proteico, de unión a membrana, cuya subunidad de 16 KDa forma el poro por lo que pasan los iones H⁺ que acidifican el contenido de los endosomas.

E5 de VPH-16 inhibe la acidificación de los endosomas, lo que resulta en la retención del receptor, en la prolongación de su señal activa y en el reciclaje del 40% de los receptores para anclarse de nuevo en la superficie en ausencia del ligando. Esto quizás explique el incremento en el número de EGFR observado en los queratinocitos que expresan E5.

La RLC de los VPHs tiene sitios de unión a AP – 1 y en presencia de E5 aumenta la actividad transcripcional del promotor en células NIH3T3 que expresan E5, influyendo así en la producción de los mensajeros tempranos. Dado que el EGF es necesario en la fase G1 del ciclo celular, se sugiere que la actividad de E5 estimula a las células a través de esta fase y en S.

Si E5 inhibe la acidificación de los endosomas tardíos en los HFK, podría también afectar la interacción de los péptidos antigénicos con las moléculas del MHC-II. (16)

La molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) es una proteína heterodimérica compuesta de las subunidades α y β que entrega péptidos antigénicos desde los compartimentos endocíticos hasta la superficie celular para ser reconocidos por las células T CD4⁺. Los antígenos del MHC-II son sintetizados en el RE donde las subunidades α y β se asocian a una chaperona llamada cadena invariante (Ii). En los compartimentos endocíticos, Ii del trímero $\alpha\beta Ii$ es secuencialmente degradado por medio de cisteín y no cisteín - proteinasas hasta convertirse en el péptido inducido por leupeptina (LIP), en el pequeño péptido inducido por leupeptina (SLIP) y en el péptido Ii asociado a la clase II (CLIP). CLIP es finalmente intercambiado por un péptido antigénico, proceso catalizado por HLA – DM. Luego el dímero $\alpha\beta$ – péptido antigénico es expresado en la superficie celular como una molécula MHC-II madura. En la epidermis los queratinocitos humanos normalmente no expresan moléculas MHC-II, pero sí las de Langerhans. los queratinocitos pueden expresar moléculas MHC-II, tales como HLA – DR, – DP y – DQ en muchos desórdenes de la piel, lo que les permite funcionar como células presentadoras de antígenos e inducir una respuesta inmune. Los queratinocitos de prepucio también muestran actividad inmune (expresando HLA – DR, - DM y Ii) cuando son estimulados por interferón γ . La degradación proteolítica secuencial de Ii es dependiente del pH. Por tanto E5 afecta la maduración de la molécula $\alpha\beta$ de MHC-II inhibiendo la acidificación de los endosomas donde Ii es digerido por

proteasas que funcionan solo a pH ácido. E5 entonces podría disminuir el reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados interrumpiendo la función de las proteínas MHC clase II. (12)

La proteína (gen) E6: De aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante.

E6 es de las que se expresan muy tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa.

E6 también puede retener a P53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación. En consecuencia E6 inhibe la capacidad de P53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de P53, así E6 interactúa con Bak, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación. El incremento de P53, que se daría por la proliferación inducida por el VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, probablemente mataría a una célula infectada por VPH antes de que la replicación de este ocurriera. Por tanto la modulación de los niveles de P53 por parte de E6 es importante para una infección productiva. (12,13)

La proteína (gen) E7: De aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa.

E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F. La familia pRB controla la replicación celular (40). La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular. (17)

E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. Como resultado de la liberación de E2F se expresa ciclina E, importante para el progreso de la fase S. Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de P53 que normalmente contrarrestaría esta replicación celular, anormalmente estimulada, mediante el incremento de la apoptosis.

Sin embargo la proteína E6 – AR degradaa P53 y por tanto bloquea esta respuesta celular. (fig. 2)

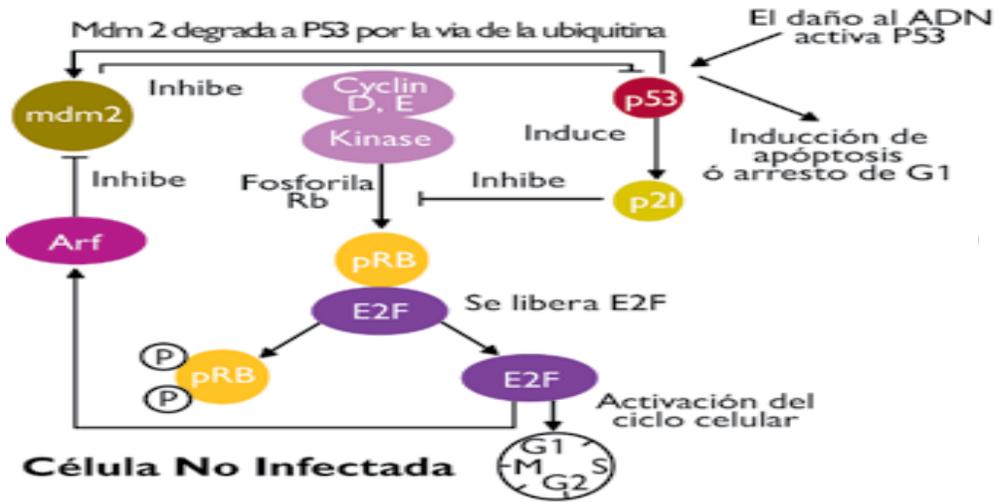


Figura 2. López S A, Lizano S M. *Cancerología* 2006.

La región tardía (Late región: L) contiene dos regiones codificantes: **L1** y **L2** que generan proteínas que forman parte de la cápside viral, esta contiene 60 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros.

La proteína L1: de 57 kDa y que conforma cerca del 80 % de la cápside, se expresa después de L2; codifica la más importante de las proteínas que es una forma muy extendida entre los distintos virus específicos de especie. Tienen la capacidad de generar anticuerpos que pueden ser detectados en pacientes infectadas.

La proteína L2: de 43 a 53 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4 (74); de la región L2 se codifican proteínas de menor tamaño y mayor variabilidad interespecies de la cápside viral, se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios.

La transcripción de L1 y L2 está regulada por factores reguladores de transcripción que se producen únicamente en aquellas células epiteliales más diferenciadas de la capa superficial del cérvix; esto explica porque la producción de viriones y el efecto citopático es más pronunciado en las lesiones histológicamente de más bajo grado. Muchos de los "cebadores de consenso" ("consensus primers") que detectan un amplio grupo de genotipos de HPV, amplifican la región L1 como son Oli-1b/Oli-2i, My09/My11, Gp5/Gp6, Gp5+/Gp6+ o como el recientemente descrito SPF1/SPF2. (12,13)

Mecanismos Oncogénicos

Los genes de E6 y E7 son necesarios para el mantenimiento del fenotipo transformante de las células, E7 puede immortalizar queratinocitos humanos en cooperación con las oncoproteínas ras; E6 no puede immortalizarlos por si sola, pero transforma células epiteliales mamarias.

La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo (E6 – AR) es inhibir la función de P53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina (36, 37). Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP); esta proteína reemplaza a Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a P53. Este cambio reduce dramáticamente la vida media de P53 (desde 3 horas hasta 20 minutos) y el nivel de proteína en las células de CaCu a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (E6 – BR) no se unen a P53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. La proteína codificada por E6 del VPH 16 une átomos de Zn, alterando el crecimiento celular al interferir con la proteína p53, lo que lleva consigo una disminución de la cantidad de p53, estimulación del ciclo celular y de la actividad mitótica.

Recientemente se ha descrito otro mecanismo por el cual E6 puede inhibir la normal función reguladora de p53; E6 provocaría una disrupción del complejo p53-ADN y subsecuentemente disminuiría la transactivación transcripcional de p53 en un proceso independiente de ubiquitina.

En el caso de E7, que codifica una pequeña fosfoproteína nuclear también se une a un átomo de Zn. Contacta con la proteína del gen de retinoblastoma (Rb) y sus proteínas relacionadas p107 y p130 y con ello disocia el complejo E2F-Rb con la consiguiente liberación de E2F, que actúa de manera positiva sobre el ciclo celular.

La proteína E1 tiene actividad helicasa muy importante para la replicación viral mientras que E2 inhibe la expresión de E6 y E7 interfiriendo con los promotores de éstos dos últimos genes, suprimiendo la proliferación de las células tumorales. La integración viral ocurre dentro de la región E1-E2 de manera que la disrupción que lleva consigo interrumpe las funciones fisiológicas de las proteínas codificadas por dichas regiones del genoma viral, liberando así la expresión de E6 y E7. En la mayor parte de las lesiones de bajo grado el virus se encuentra en forma episomal (no integrado en el ADN celular) mientras que en un alto porcentaje de casos de carcinomas el virus está integrado.

El efecto de la integración viral provoca que por una parte la proteína E7 rompa los complejos fosforilados de Rb con E2F, liberando a éste último que activa de forma directa la transcripción de factores de crecimiento de tipo positivo. Por su parte E6 se une a p53 induciendo su degradación, y liberando al ciclo celular de uno de sus elementos represores y controladores. La sobreexpresión de E6 y de E7 puede ponerse de manifiesto mediante el estudio del ARNm de cada una de ellas.

Estas determinaciones se han puesto en relación con la severidad de las lesiones histológicas acompañantes aunque también se han descrito su existencia en mujeres sin lesión alguna. (12,13), (fig. 3).

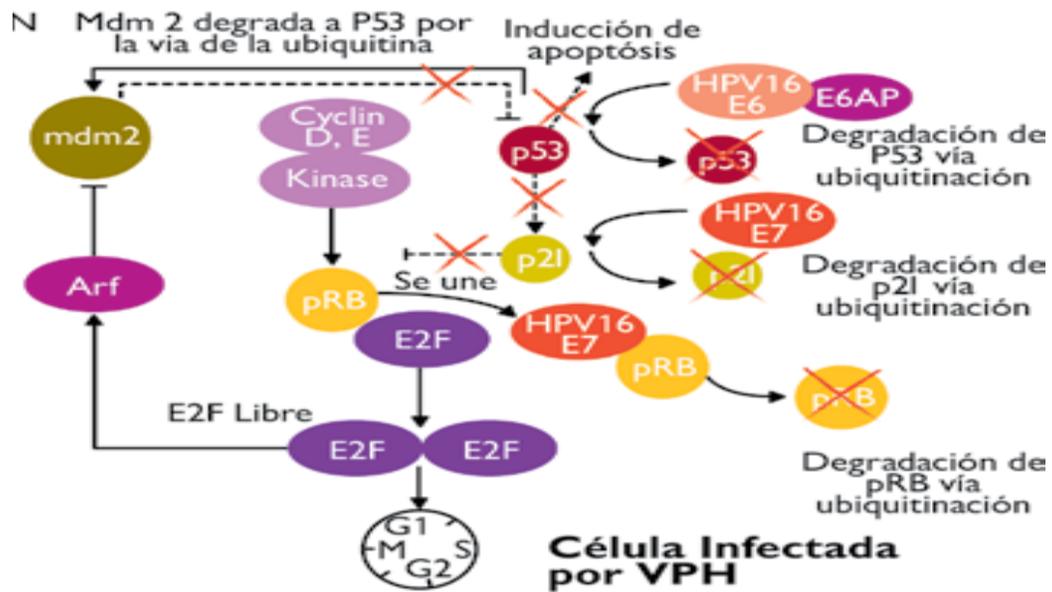


Figura 3. López S A, Lizano S M. Cancerología 2006.

Patogenia e historia natural de la infección.

Estos virus afectan células epiteliales escamosas como la piel y de mucosas oral, vaginal, cervical o anogenital.

Inicialmente era considerado como una infección de transmisión sexual, pero se ha visto implicado en carcinoma orofaríngeo, de esófago, pulmón y piel. (18)

Es resistente a la inactivación y por lo tanto se puede transmitir con los fómites (por contacto directo a través de lesiones pequeñas de piel o mucosas), contacto sexual o durante el paso del feto a través del canal del parto. (19) (fig.4)

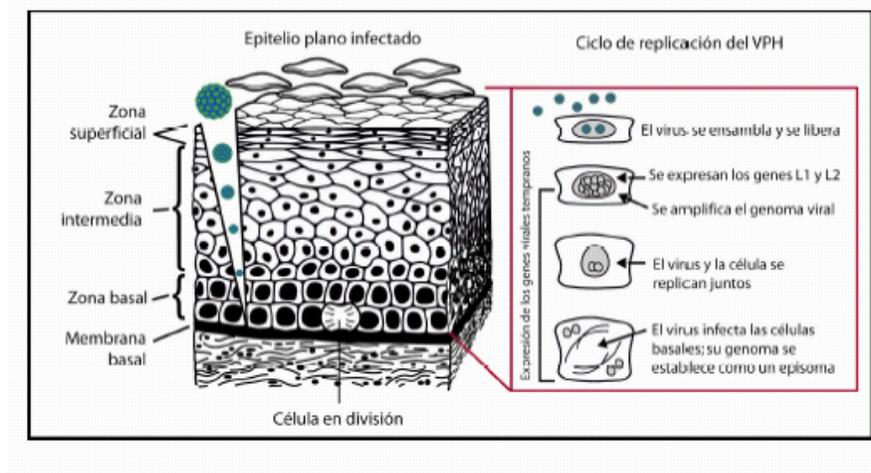


Figura 4. Murray P R, Rosenthal K S. Microbiología Médica. 2007.

Es relativamente estable y debido que no tiene envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por tres meses.

El VPH tiene preferencia por el epitelio inmaduro del cérvix (células metaplásicas y células del estrato basal o de reserva) el cual posee actividad mitótica, y éste se presenta con mayor frecuencia en mujeres jóvenes, en la zona de transformación cervical y una vez infectadas, con su proliferación favorecen la progresión e infección del virus; aun así, las infecciones genitales por VPH pueden detectarse en cérvix, vagina y vulva en mujeres; glande, prepucio y piel del pene y escroto en hombres; y en canal anal y perianal tanto de mujeres como de hombres.

Tanto hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica de la infección, pudiendo ser acarreadores asintomáticos, transmisores y también víctimas de la infección por VPH. Es por ello que los factores asociados con la infección por VPH esencialmente están relacionados con el comportamiento sexual, como es la edad de inicio de vida sexual, un alto número de parejas sexuales a lo largo de la vida, o contacto sexual con individuos de alto riesgo. (20)

Aun cuando en personas jóvenes la infección por VPH es muy frecuente, la mayoría de las mujeres infectadas resuelven la infección espontáneamente (alrededor del 90%), persistiendo solo en una pequeña fracción de la mujeres. (21)

Es este grupo de portadores crónicos de VPH de alto riesgo quienes presentan un riesgo incrementado de desarrollar lesiones del tracto anogenital. Algunos determinantes que han sido asociados a la progresión de las lesiones son: tipo viral y variaciones intra-tipo de VPHs de alto riesgo, integración del genoma viral al celular y probablemente carga viral. Otros factores adicionales incluyen la alta paridad, tabaquismo y dieta pobre en vitaminas y minerales.

Muchos tipos de VPH inducen solamente lesiones que no se asocian a cáncer humano. En dichas lesiones, la expresión de los productos de los genes virales se encuentra cuidadosamente regulada, de modo que las proteínas virales se expresan en momentos definidos y en cantidades controladas a medida que la célula infectada migra hacia la superficie epitelial.

Los eventos que dan lugar a la producción de partículas virales en las capas superiores del epitelio, parecen ser comunes tanto en virus de alto como de bajo riesgo oncogénico. De esta manera, el cáncer es una consecuencia poco frecuente de la infección por VPH y los eventos iniciales que conducen a la transformación maligna por virus oncogénicos no están del todo esclarecidos. Una posibilidad es que la zona de transformación del cérvix es un sitio del epitelio donde los VPH de alto riesgo no logran regular apropiadamente su ciclo productivo; por lo tanto, la variación tanto en el nivel de expresión de las proteínas virales, como del momento en que esta expresión ocurre, puede repercutir en el desarrollo de cáncer en estos sitios.

Después de una infección natural solo la mitad de las mujeres desarrollan anticuerpos contra VPH detectables, los cuales probablemente no son protectores. Los VPH infectan el epitelio cervical sin entrar en la circulación, por lo que las partículas no se exponen eficazmente al sistema inmune. Como resultado, la vigilancia inmunológica típica, que involucra el tráfico de células especializadas desde el sitio de la infección hasta órganos linfoides secundarios, se encuentra limitada o abatida. Aunado a esto, una vez dentro de la célula, la partícula del papilomavirus puede utilizar múltiples mecanismos para abatir la respuesta inmune que es necesaria para la eliminación de la infección. (22)

Los papilomavirus humanos también pueden alojarse de forma latente en las células epiteliales, evadiendo la detección por el sistema inmune y permitiendo una reactivación futura. Actualmente, solo hay evidencias indirectas de las infecciones latentes de VPH en humanos, pero se especula que aun cuando el VPH no pueda ser detectado en una muestra en un momento dado, permanece la posibilidad de que el virus se encuentre en forma latente. La reactivación de infecciones latentes de VPH se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos. (23)

La historia natural del cáncer cervicouterino implica la progresión gradual de una serie de etapas secuenciales en que las células del cérvix presentan ciertas anomalías histológicas: Neoplasia

Intraepitelial Cervical, NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada), NIC III (displasia severa/carcinoma in situ) y finalmente cáncer invasor.

La etiopatogenia de esta enfermedad se ha investigado detalladamente gracias al avance de la biología celular, molecular e inmunología. Estos avances han permitido conocer el papel del virus del papiloma humano en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino.

La infección por el virus de papiloma humano se puede clasificar en:

1. Infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo el virus esta ahí, en ocasiones puede ser detectado por técnicas específicas como Hibridación in situ o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
2. Infección subclínica, que se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos de los tejidos afectados. La presencia de VPH en este punto se puede verificar mediante el uso de un colposcopio que evidencia cambios de coloración en el cuello uterino después de aplicar una solución de ácido acético; estos cambios se asocian a la infección con VPH y una posible lesión premaligna.
3. Infección clínica, que se manifiesta por la aparición de tumores visibles y es en esta etapa donde podemos encontrar gran cantidad de tejido positivo para VPH (12)

Estos virus se encuentran viables y con capacidad de infectar otros tejidos. Sin embargo, no siempre la enfermedad se manifiesta durante esta última etapa ya que varios casos llegan a permanecer en periodo de latencia o subclínico, tiempo durante el cual se puede adquirir un estado de resistencia o regresión de las lesiones, o bien de progresión hacia cáncer invasor en donde el proceso puede tomar de 1 a 10 años.

Por otro lado, se ha demostrado que la infección con VPHs oncogénicos tiene un promedio de duración aproximada de 8 meses, mientras que la duración con VPHs no oncogénicos se estima en 4 meses. (24)

Epidemiología.

Los dos géneros de VPH mas importantes son los papilomavirus Alpha (α) y los Beta (β). La mayoría de los VPH que infectan área genital pertenecen al género Alpha. (11)

Estudios transversales de la historia natural del cáncer cervical indican que cerca del 85% de las lesiones cervicales de alto grado presentan DNA de VPH, mientras que el 100% de los canceres invasores de cérvix contienen secuencias de estos virus.

Es una enfermedad a nivel mundial, pero en varios estudios se ha demostrado que la incidencia y prevalencia de la infección por VPH y lesiones causantes son mayores en países en vías de desarrollo.

De igual forma la prevalencia de VPH por grupos de edad muestra una distribución similar a su incidencia. En mujeres jóvenes la incidencia es alta y se acompaña además con infección de múltiples tipos de VPH, mientras que hay una disminución en la detección de VPH en los grupos de mujeres pre y postmenopáusicas. (25)

En mujeres asintomáticas de la población general, la prevalencia de infección por VPH oscila entre un 2 y 44%, siendo América Latina la región más afectada, y con variaciones importantes por la edad; mientras que en hombres la prevalencia varía entre 2.3 y 45% tanto para los virus de bajo y alto riesgo. Se ha demostrado hasta un 40% de incidencia en mujeres jóvenes con 3 años de seguimiento y en hombres se han observado tasas de incidencia entre el 14 y 21% después de 3 a 8 meses de seguimiento. (26)

Se han identificado veintitrés tipos que infectan el tracto anogenital: 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 42-45, 51-58, y el 61.

Los tipos 6, 11, 16 y 53 son los tipos más frecuentemente en mujeres con enfermedad cervical y vulvar, encontrándose algún subtipo al menos en el 80% de las lesiones displásicas.

En las lesiones de bajo grado (Condiloma y CIN I) predominan los tipos 6 y 11 en aproximadamente 20-22% de los casos.

En las displasias de alto grado (CIN II-CIN III) predomina el subtipo 16 entre 30-77%; tres cuartas partes de estas lesiones están también relacionadas con el 18 y algunos del grupo de los treinta (31, 33, 35, 39).

En lo que respecta al carcinoma invasor de cérvix, en el grupo de alto riesgo se incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; se considera a los tipos 26, 53 y 66 como de probable capacidad de carcinogénesis.

En el grupo de bajo riesgo están los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108. Los tipos 26, 53, 66, 73 y 82 han sido reclasificados de un grupo anteriormente como de riesgo indeterminado a ser incluidos en los de alto riesgo. Los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 suman el 95% de los carcinomas escamosos y no parecen encontrarse diferencias significativas de prevalencia entre las distintas zonas geográficas estudiadas. (27)

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar cadenas de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las cadenas de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las cadenas de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico.

Para realizar la técnica se necesitan:

Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP): sustratos para polimerizar nuevo ADN:

Dos cebadores o iniciadores (en inglés, *primers*), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos cadenas de ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de dieciocho a veintidós, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

Iones divalentes: Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso (Mn^{2+}), para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de Mn^{2+} incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.

Iones monovalentes, como el potasio.

Una solución tampón o *buffer* que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la polimerasa Taq).

ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.

Termociclador: el aparato que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

Proceso.

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura (> 90 °C), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los dNTP en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar.

Los pasos en el proceso son:

Inicio: Consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (ó 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

Desnaturalización: En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos cadenas de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95 °C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la cadena, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

Alineamiento o unión del cebador: A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos, permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde.

La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

Extensión o elongación de la cadena: Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la cadena molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la cadena de ADN creciente (la cual se extiende).

Elongación final: Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

Conservación: Este es un paso que se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 15-100 µL, en pequeños tubos de 0.2-0.5 mL que se colocan en el termociclador. (28,29)

1.2. Definición del problema.

El diagnóstico citológico de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) y células escamosas atípicas, sin poder excluir lesión intraepitelial de alto grado (ASC-H), es subjetivo y poco reproducible.

La prueba de PCR para detección de VPH de alto riesgo es altamente sensible y específica.

El motivo del presente trabajo es evaluar el significado del diagnóstico citológico de ASC-US y ASC-H correlacionado con la prueba positiva de PCR para VPH de alto riesgo.

1.3. Hipótesis.

Las mujeres con diagnóstico citológico de ASC-US o ASC-H pueden ser diferenciadas hacia el diagnóstico histológico final de lesión intraepitelial escamosa o a carcinoma, según sea el caso, apoyado en la detección molecular de VPH de alto riesgo con la técnica de PCR (Cobas Roche).

1.4. Objetivo general.

Analizar el significado citológico de ASC-US y ASC-H en relación a la prueba de PCR positiva a VPH de alto riesgo, para conocer esta asociación y determinar el seguimiento clínico.

1.5. Objetivos específicos.

1. Identificar la relación directa entre la prueba de PCR positiva para VPH de alto riesgo y la atipia de células escamosas (ASC-US, ASC-H).
2. Conocer la incidencia de pruebas de PCR positivas para VPH de alto riesgo, en diagnósticos citológicos de ASC-US y ASC-H.

1.6. Justificación.

En los laboratorios de citopatología, el diagnóstico citológico de ASC-US y ASC-H, tiene un promedio global de 5% del total de casos positivos; sin embargo al realizar dicho diagnóstico debemos considerar la posibilidad de la existencia de infección por VPH, siendo la prueba diagnóstica de elección la PCR, por medio de la cual realizamos una búsqueda intencionada de VPH-AR: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 73; y genotipificación de VPH-16 y 18.

De esta manera, se realiza un diagnóstico fundamentado, con el subsecuente beneficio de un mejor seguimiento y tratamiento de la paciente de riesgo clínico para LIEAG o carcinoma.

Así mismo, resulta importante conocer la relación del diagnóstico de ASC-US y ASC-H con el resultado positivo a VPH-AR, para orientar el algoritmo de seguimiento y tratamiento en cada caso.

MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Diseño.

Se recolectaron del archivo de laboratorio de citopatología el total de muestras con tinción de Papanicolaou tomadas por el servicio de colposcopia del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos y de las clínicas de medicina familiar de la Delegación Zona Sur del ISSSTE con diagnóstico de ASC-US y ASC-H; posteriormente se identificaron los casos con prueba de PCR para VPH de alto riesgo en el periodo comprendido entre diciembre de 2011 a septiembre de 2012.

2.1.1. Tipo de investigación.

1. Observacional. No se están modificando las variables de estudio.
2. Transversal. El estudio se está realizando en un período de 10 meses.
3. Prospectiva. Investigación planteada a futuro.
4. Descriptiva. El fenómeno es estudiado sin establecer comparaciones.
5. Abierta. Se conocen las condiciones que pueden modificar el estudio.
6. Básica. El objeto es generar nuevos conocimientos sobre los hechos observables.
7. Clínica. Encaminada a generar nuevos conocimientos sobre los procesos patológicos que afectan al ser humano como individuo y que se relacionan con los procesos de desarrollo, etiopatogenia, fisiopatogenia diagnóstico, pronóstico, tratamiento y complicaciones, tomando como referencia la historia natural de la enfermedad.

2.2. Grupos de estudio.

Estudios de Papanicolaou de mujeres de 35 a 64 años de edad con diagnóstico citológico de ASC-US y ASC-H diagnosticados en el Laboratorio de Citopatología de muestras provenientes del servicio de colposcopia del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos y de clínicas de medicina familiar de la Delegación Sur del ISSSTE.

2.3. Tamaño de la muestra.

De acuerdo a incidencia entre diciembre de 2011 y septiembre de 2012, ya que dependerá del número de pacientes a las cuales se les tome muestra para citología y que tengan resultado positivo para ASC-US o ASC-H, del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos y de clínicas de medicina familiar de la subdelegación sur del ISSSTE.

2.3.1. Criterios de inclusión.

Mujeres de 35 a 64 años de edad, derechohabientes del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos y de clínicas de medicina familiar de la subdelegación sur del ISSSTE con toma de muestras para estudio citológico entre diciembre de 2011 y septiembre de 2012, con diagnóstico citológico de Atipia de Células Escamosas de Significado Indeterminado (ASC-US) o de Atipia de Células Escamosas sin poder excluir lesión intraepitelial de alto grado (ASC-H) y que tengan prueba de PCR.

2.3.2. Criterios de exclusión.

Pacientes fuera del rango de edad (35-64 años).

Fuera del rango de tiempo establecido.

No derechohabientes.

Pacientes sin diagnóstico de atipia de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) y de atipia de células escamosas sin poder excluir lesión intraepitelial de alto grado (ASC-H).

Pacientes sin PCR.

2.3.3. Criterios de eliminación.

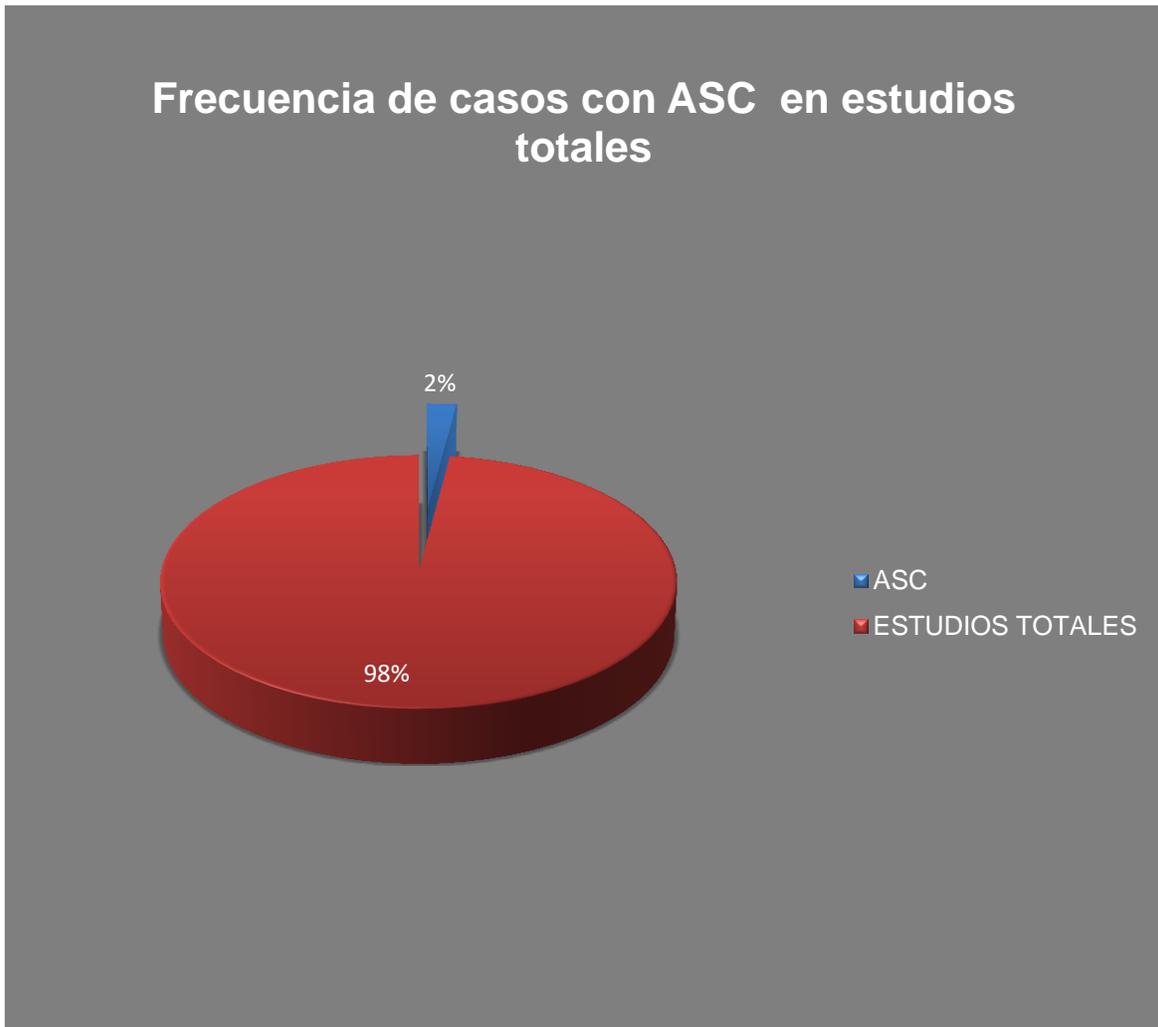
Diagnóstico de ASC-US y ASC-H con PCR pero que hayan sido inadecuadas por falta de beta-globina como control interno.

2.4. Descripción general del estudio.

1. En mujeres de 35 a 64 años de edad, derechohabientes del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos y de clínicas de medicina familiar de la subdelegación sur del ISSSTE se tomarán muestras de cérvix por especuloscopia o colposcopia, con Cervex-Brush, Rovers, entre diciembre de 2011 y septiembre de 2012 para estudio citológico convencional (Prueba de Papanicolaou) y estudio de PCR (Cobas 4800 ROCHE) para VPH de alto riesgo.
2. La muestra para citología convencional se fijará de la manera habitual y enviará al Servicio de Patología. La tinción se realizará con técnica de Papanicolaou. La revisión rutinara (screening) la realizarán citotecnólogos. Ante la sospecha de diagnóstico de ASC-US o ASC-H, se revisa por el Patólogo. En caso de confirmarse se incluirá al grupo de estudio.
3. Durante la misma toma se deposita material en un vial (PreservCyt Solution) para el estudio de PCR (Cobas 4800 ROCHE) para VPH-AR y genotipo 16/18.
4. Toda la información será concentrada en cédula digital de datos excel.
5. Se realizará análisis estadístico descriptivo para frecuencia y proporción de tipo de VPH-AR en ASC-US y ASC-H.
6. Se realizará análisis estadístico de frecuencia y proporción de VPH-AR por edad con diagnóstico citológico de ASC-US y ASC-H.
7. También se compararán nuestros hallazgos con las series publicadas de ASC-US y ASC-H evaluadas con técnicas de biología molecular (PCR) de otros autores.

RESULTADOS

Gráfica 1. De un total 9,432 estudios citológicos del periodo de diciembre de 2011 a septiembre de 2012, se encontraron 201 casos (2.13%) con diagnóstico citológico de ASC.



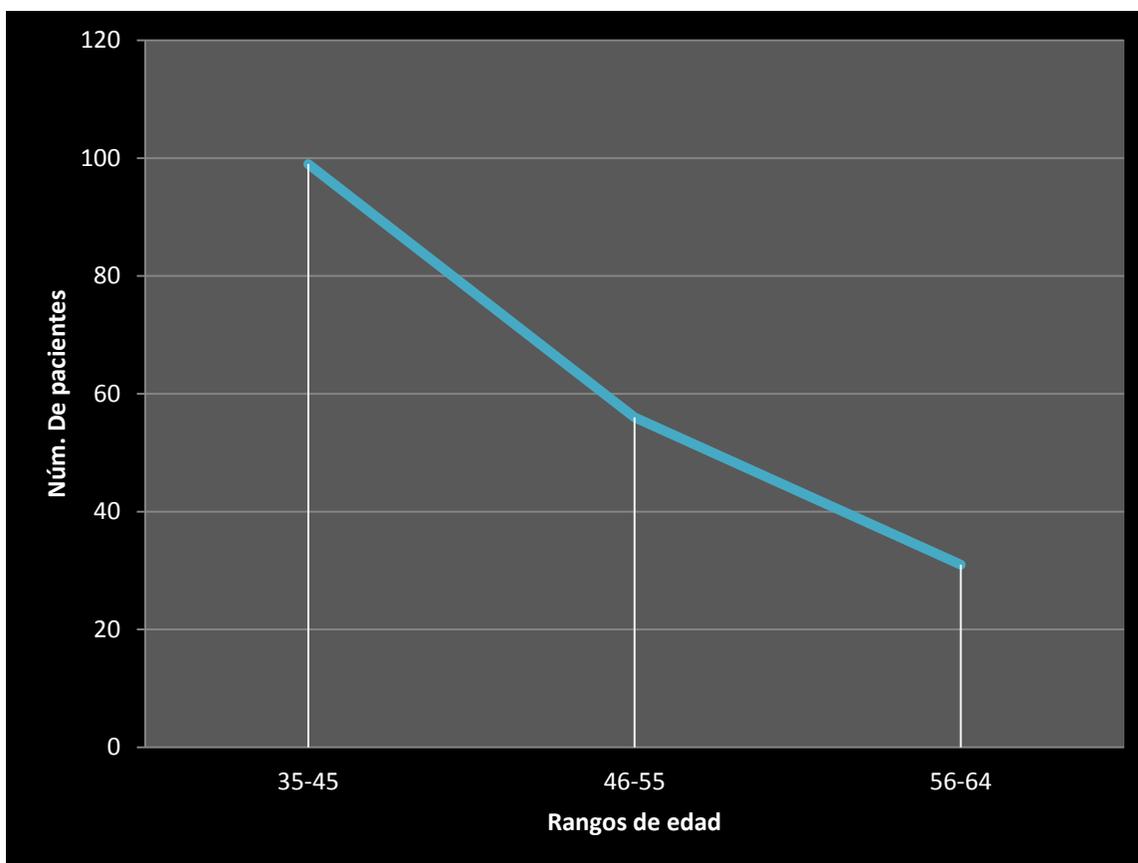
Gráfica 2. De los 201 casos con diagnóstico citológico de ASC: la frecuencia es de 15 (7%) para ASC-H y 86 (93%) para ASC-US.

MUJERES CON ASC-US	186
MUJERES CON ASC-H	15
TOTAL DE CASOS	201



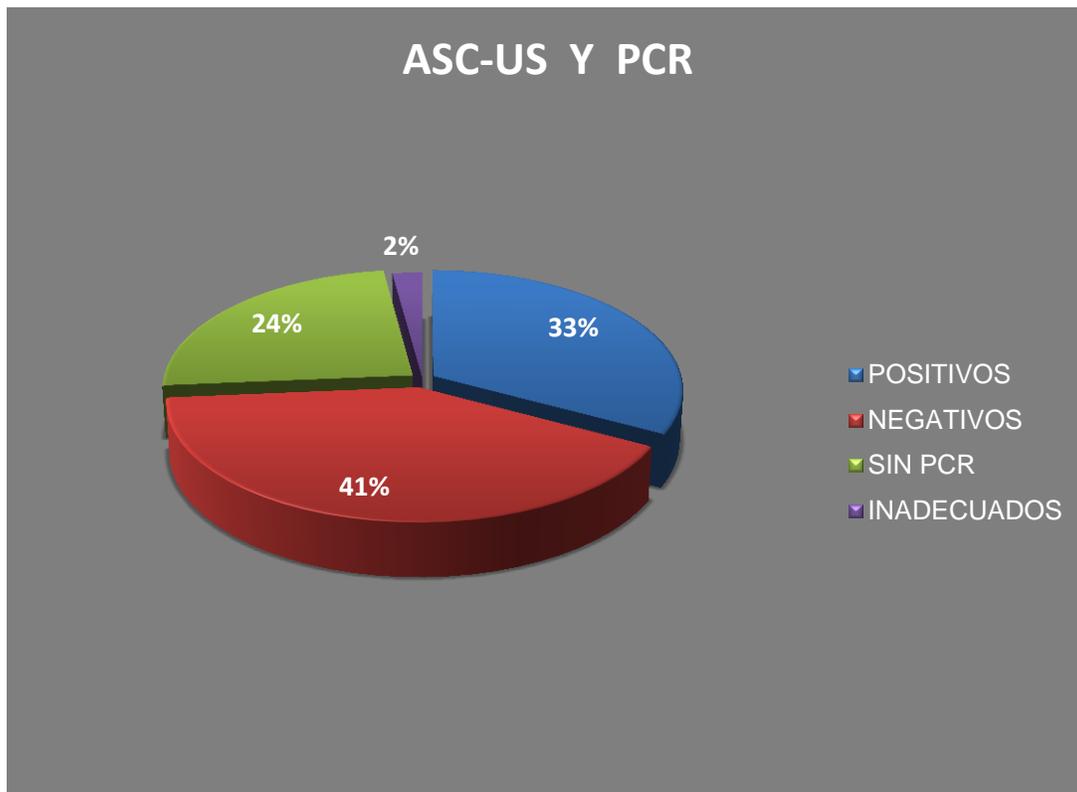
Gráfica 3. El total de casos de ASC-US fue de 186 (93%); el resultado de casos por edad es el expresado en la siguiente gráfica:

EDAD	CASOS
35-45	99
46-55	56
56-64	31
TOTAL	186



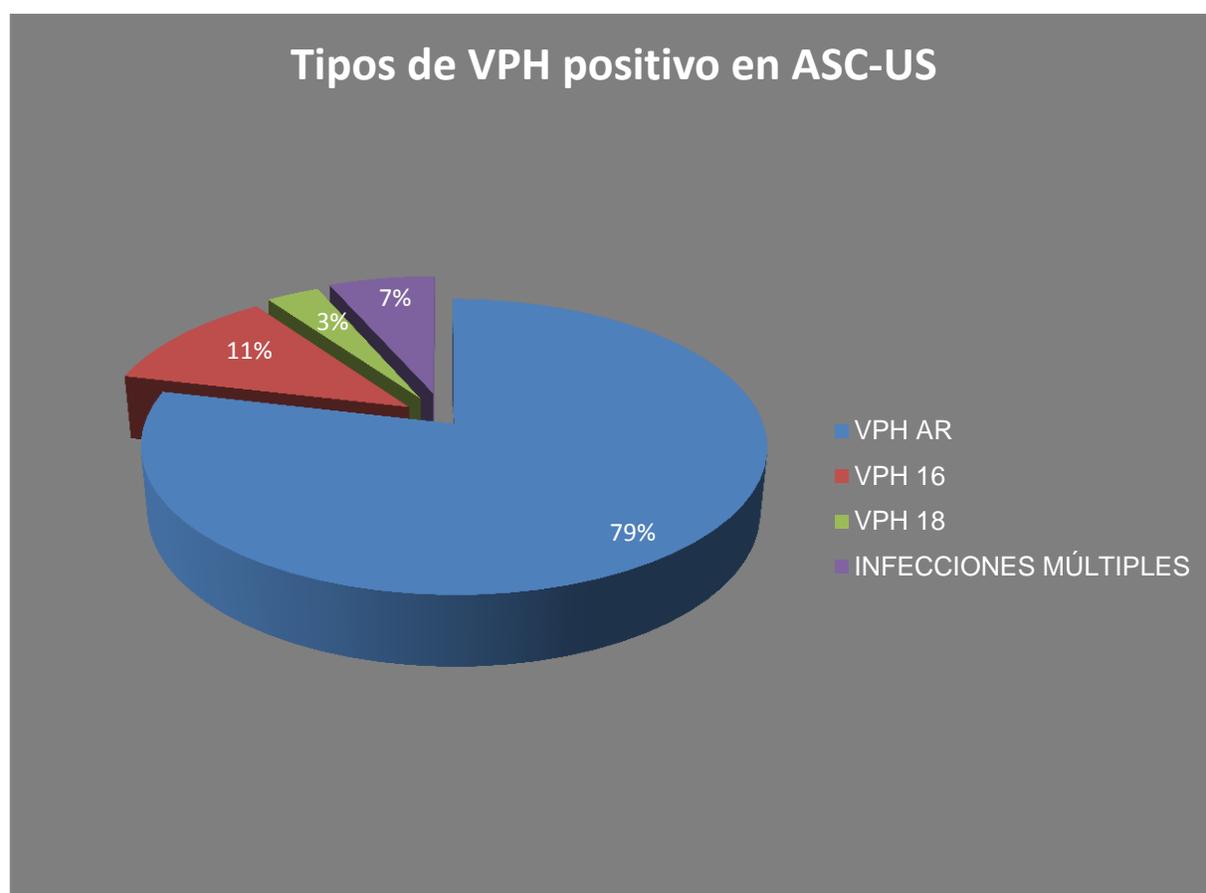
Gráfica 4. La frecuencia de casos con diagnóstico de ASC-US fue de 186 (93%) ; los resultados obtenidos en relación con estudio de PCR, son los siguientes:

ESTUDIO	CASOS
POSITIVOS	61
NEGATIVOS	76
SIN PCR	45
INADECUADOS	4
TOTAL	186



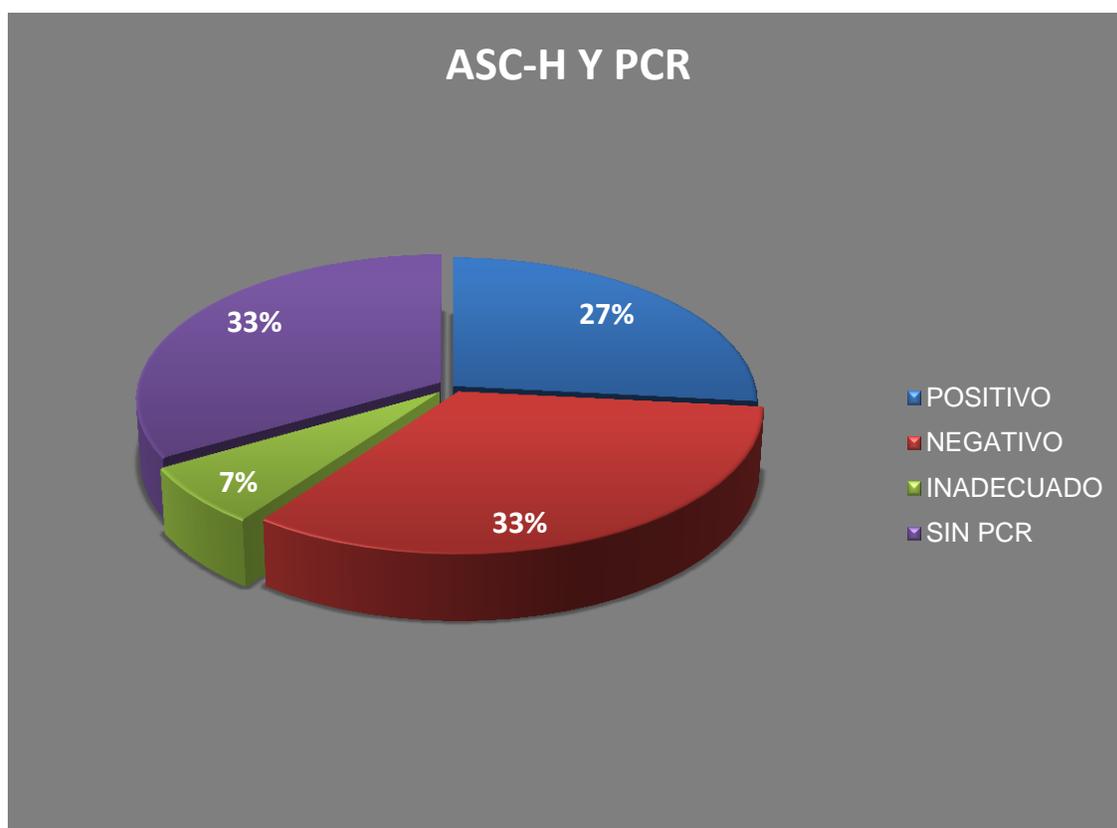
Gráfica 5. La frecuencia de casos positivos para PCR en ASC-US fue de 61 (33%), de los cuales 48 fueron positivos para VPH de alto riesgo; 7 para VPH 16; 2 para VPH 18 y 4 infecciones múltiples.

RESULTADO PCR	CASOS
VPH AR	48
VPH 16	7
VPH 18	2
INFECCIONES MÚLTIPLES	4
TOTAL	61



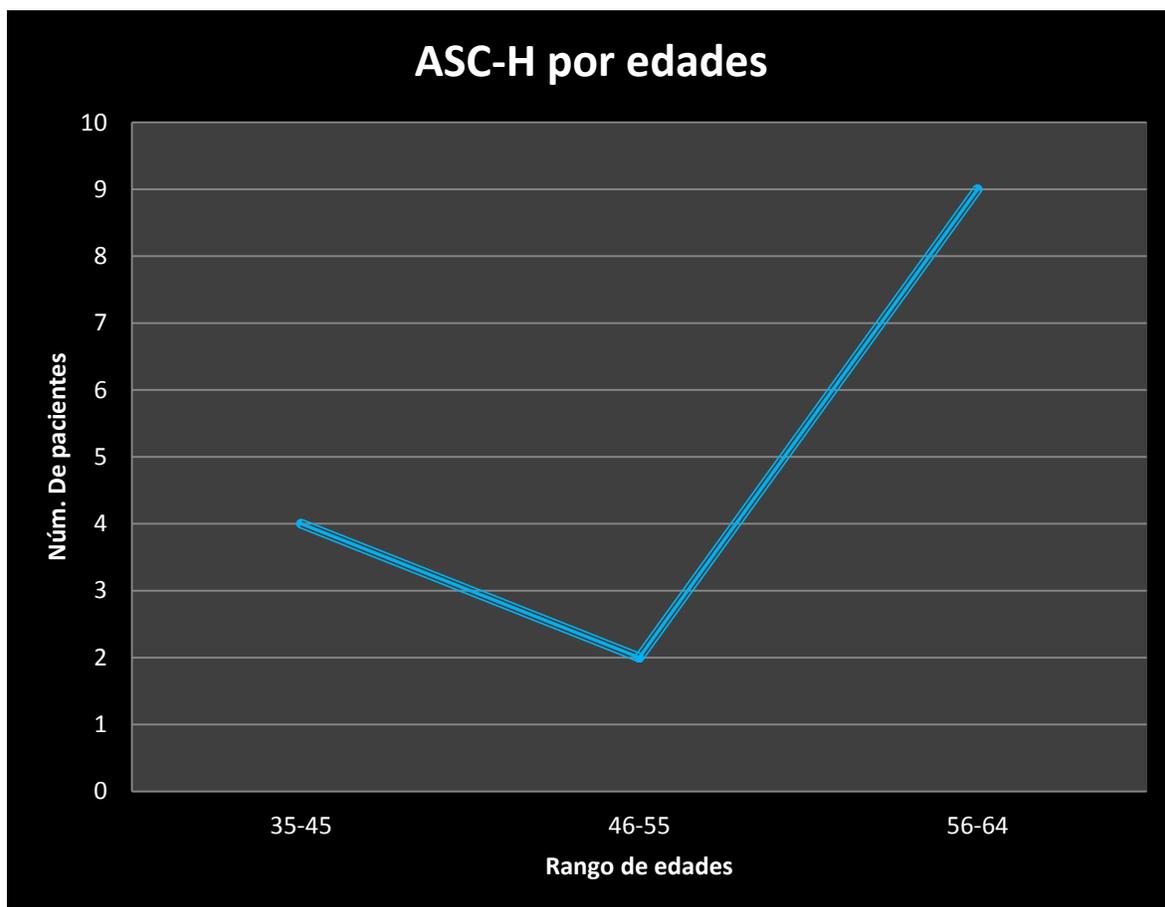
Gráfica 6. El total de casos con diagnóstico de ASC-H fue de 15 (7%), en relación con estudio de PCR los resultados son los siguientes:

ESTUDIO	CASOS
POSITIVO	4
NEGATIVO	5
INADECUADO	1
SIN PCR	5
TOTAL	15



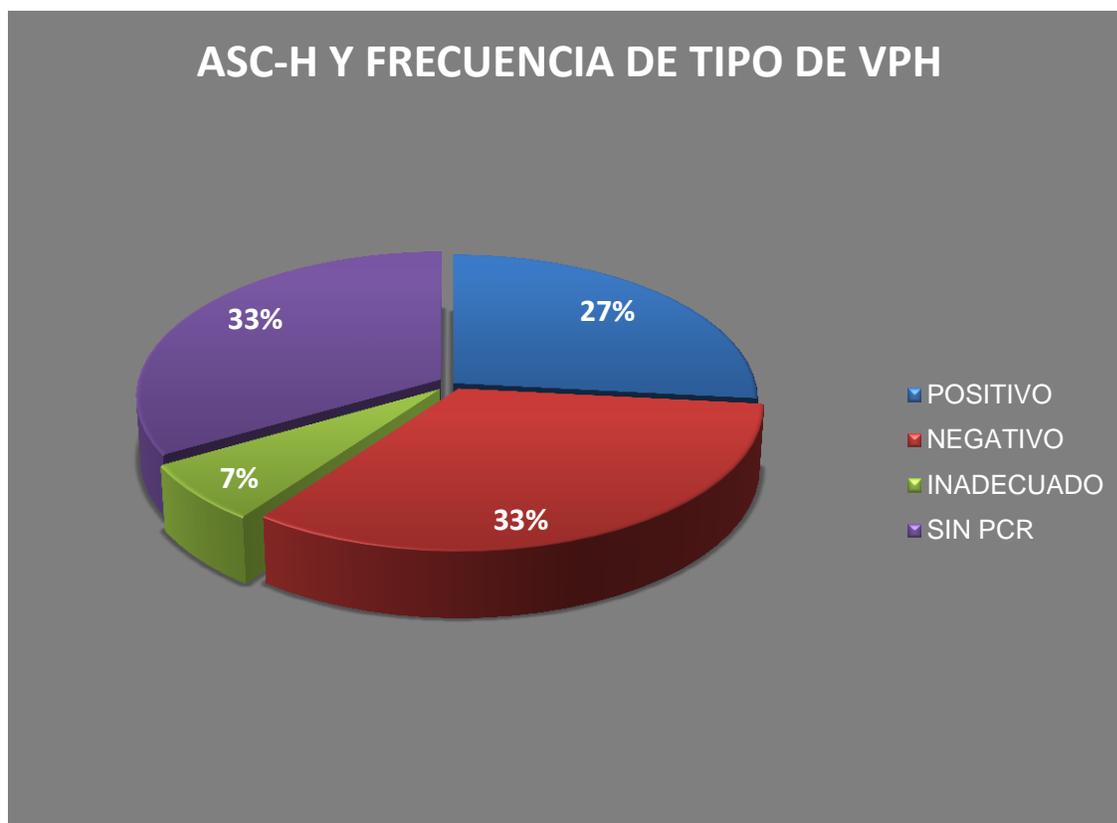
Gráfica 7. El total de casos de ASC-H fue de 15 (7%); el resultado de casos por edad es el expresado en la siguiente gráfica:

EDAD	CASOS
35-45	4
46-55	2
56-64	9
TOTAL	15



Gráfica 8. La frecuencia de tipo de VPH en casos con diagnóstico citológico de ASC-H, es la siguiente..

RESULTADO PCR	CASOS
POSITIVO AR	4
NEGATIVO	5
INADECUADO	1
SIN PCR	5
VPH 16/18	0
TOTAL	15



DISCUSIÓN

En el laboratorio de citopatología del Hospital Lic. Adolfo López Mateos, en el periodo comprendido de diciembre de 2011 a septiembre de 2012, en un total de 9,432 casos, el diagnóstico de casos de ASC es de 201, con frecuencia de 2.13%, el resultado esta dentro de los parámetros aceptados (hasta 5%) de control de calidad a nivel internacional para dichos laboratorios, lo cual nos permite llevar a cabo un estudio serio y con resultados congruentes en comparación con estudios internacionales.

La frecuencia de VPH positivo en el total de casos (9,432), en relación con diagnóstico de ASC (201 casos), es de 0.68% (65 casos).

La frecuencia de casos de ASC-US es de 1.98% (186 casos), con una curva de presentación decreciente de acuerdo a edad, siendo más diagnosticado en mujeres entre 35 a 55 años.

De los 186 casos con diagnóstico citológico de ASC-US, 61 (33%) casos fueron positivos para VPH por estudio de PCR.

El VPH de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) es el diagnóstico por estudio de PCR más frecuentemente encontrado con 48 (79%) casos positivos, en segundo lugar es el VPH 16 con 7 (11%) casos positivos y el VPH 18 con 2 (3%) casos positivos; las infecciones múltiples que son 4 (7%) del total de casos, son positivas simultáneamente a VPH 16/18.

En cuanto al diagnóstico citológico de ASC-H, el número de casos positivos es de 15 (0.15% del total de casos y 7% del total de casos con ASC), con curva por edad creciente, siendo más frecuente el diagnóstico entre los 55 y 64 años de edad. A 10 casos se les realizó estudio de PCR: 5 fueron negativos, uno inadecuado y 4 positivos para VPH de alto riesgo; ninguno fue positivo para VPH 16/18.

En programas de screening estadounidenses alrededor del 50% de mujeres con ASC están infectadas con VPH de alto riesgo o con genotipo 16/18 (30,31), igualmente la concordancia de edad con nuestro estudio es alta.

CONCLUSIONES

El análisis de resultados nos indica que la frecuencia de VPH de alto riesgo esta presente en los casos con diagnóstico citológico de ASC en un 33%, consecuentemente es importante el seguimiento de las pacientes con este diagnóstico, ya que sin existir una lesión colposcópica evidente, podemos hacer un diagnóstico con factores de riesgo reales, lo cual cambia la conducta clínica y de tratamiento subsecuente.

Es importante resaltar la frecuencia de VPH de alto riesgo presente (52 casos) en el diagnóstico citológico de ASC, con una frecuencia de 26%, siendo un porcentaje alto, el cual debe considerarse como factor de riesgo en la paciente y de esta manera se hace relevante el diagnóstico de ASC, tomando en cuenta que los criterios citológicos no son suficientes para el diagnóstico de lesión intraepitelial.

Así mismo, de acuerdo a las guías de seguimiento y tratamiento publicadas internacionalemnte, recomendamos el seguimiento de las pacientes con diagnóstico citológico de ASC y si es posible, la realización del estudio de PCR en busca de VPH de alto riesgo y con genotipo 16/18 para la prevención de cáncer cervicouterino,

ASPECTOS ÉTICOS

No existen inconvenientes de tipo ético ya que los estudios que se realizan forman parte de los estudios establecidos en la Institución para la detección de lesiones cervicales y VPH de alto riesgo y VPH con genotipo 16/18..

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Cancer Institute Workshop. **The 1991 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of 1991 Bethesda Workshop.** JAMA 1992; 267: 1892-93.
2. Pitman MB, Cibas ES, Powers CN, et al. **Reducing or eliminating use of the category of atypical squamous cells of undetermined significance decreases the diagnostic accuracy of the Papanicolaou smear.** Cancer Cytopathol 2002;96: 128-134.
3. Qudus MR, Sung CJ, Steinhoff MM, et al. **Atypical squamous metaplastic cells: reproducibility, outcome, and diagnostic features on ThinPrep Pap test.** Cancer Cytopathol 2001; 93: 16-22.
4. Alonso P, Lazcano E, Hernández M. **Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control.** Editorial Médica Panamericana. Segunda edición. México. 2005. P.p. 385.
5. Nauth HF. **Citodiagnóstico ginecológico.** Editorial Médica Panamericana. Primera edición. 2002. P.p. 14-20.
6. Davey DD, Woodhouse S, Styer P, et al. **Atypical epithelial cells and specimen adequacy. Current laboratory practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology.** Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 203-211.
7. Kurman J, Henson DE, Herbst AL, et al. **The 1992 National Cancer Institute Workshop. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology.** JAMA 1994; 271: 1866-1869.
8. Stoler MH, Schiffman M. **Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS LSIL Triage Study.** JAMA 2001; 285: 1500-1505.
9. Sherman ME, Solomon D, Schiffman M. **Qualification of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage Study.** Am J Clin Pathol 2001; 116: 386 -394.
10. Solomon D, Nayar R. **El Sistema Bethesda para informar la citología cervical. Definiciones, criterios y notas aclaratorias.** Ediciones Journal. 2010. P.p. 197.
11. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H: **Classification of papillomaviruses.** Virology 2004; 324: 17–27.
12. Lizano S M, Carrillo G A, Contreras P A. **Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, historia natural y carcinogénesis.** Cancerología 2009; 4: 205-216.

13. López S A, Lizano S M. **Cáncer cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que no termina.** *Cancerología.* 2006; 1: 31-55.
14. Hegde RS. **The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology.** *Annu Rev Biomol Struct.* 2002; 31: 343–60.
15. Deborah E, Jackson J, Doorbar J. **Identification of a G2 Arrest Domain in the E1-E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16.** *Journal of virology.* 2002; 76(19): 9806–9818.
16. Benyue Z, Ping L, Exing W. **The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ .** *Virology.* 2003; 310, 100 – 108.
17. Munger K, Basile JR, Duensing S. **Actividades biológicas y blancos moleculares de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano.** *Oncogen.* 2001; 20: 7888–98.
18. Kradin R L. **Diagnostic Pathology of Infectious Disease.** Ed. Saunders Elsevier. EUA. 2010. P.p. 546-548.
19. Murray P R, Rosenthal K S, Pfaüer M A. **Microbiología Médica.** 5a edición. Elsevier. España. 2007. P.p. 523-28.
20. Castellsague X. **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.** *Gynecol Oncol* 2008; 110:S4-S7.
21. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA y cols. **Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia.** *J Am Med Assoc* 2001; 286:3106-3114.
22. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. **Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response.** *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:79–89.
23. Huh WK. **Human Papillomavirus Infection: A concise review of natural history.** *Obstetrics and Gynecology* 2009; 114:139-143.
24. Schiffman M, Kruger Kjaer S. **Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia.** *JNCI Monographs,* 2003; 31:14-19
25. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, Sanjose S, Bruni L y cols. **Epidemiology and natural history of human papillomavirus infection and type-specific implications in cervical neoplasia.** *Vaccine* 2008; 26S: k1-k16.
26. Carreras R C, Xercavins M J, Checa V MA. **Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello del Útero.** 1ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. P.p. 1-26.
27. Muñoz N, Bosch F X, Herrero R, De Sanjosé S, Castellsagué X, Shah K V y cols. **Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus types associated with Cervical Cancer.** *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
28. Dimmock N J, Easton A J, Leppard K N. **Introduction to Modern Virology.** Blackwell Publishing. Sexta edición. EUA. 2007. P.p. 132-135.

29. Forbes B A, Sahm D F, Weissfeld A S. **Diagnostic Microbiology**. Bailey & Scott's. Mosby Elsevier. 20a edición. EUA. 2007. P.p. 718-730.
30. The ALTS Group: **Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance**. Am J Obstet Gynecol 2003; 183: 1383-1392.
31. Wright TC Jr, Cox JT, Massad y cols. **Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities**. JAMA 2002; 287: 2120-2129.

ANEXO. Cédula de recolección de datos.

EDAD	FOLIO CITOLOGÍA	DIAGNOSTICO	No. PCR
28	010/12	ASC-US	18495
57	087/12	ASC-US	7638/11
32	1025/12	ASC-US	1736
32	1028/12	ASC-US	1732
53	1115/12	ASC-H	9550
37	1124/12	ASC-US	SIN PCR
18	1153/12	ASC-US	2500
64	1160/12	ASC-H	3268
66	1178/12	ASC-H	8422
50	1180/12	ASC-US	2315
43	1191/12	ASC-US	2326
23	1199/12	ASC-US	2697
86	12816/11	ASC-US	SIN PCR
65	12847/11	ASC-US	SIN PCR
57	12850/11	ASC-H	5843
41	12994/11	ASC-US	20571/11
46	131152/11	ASC-US	SIN PCR
45	13157/11	ASC-US	SIN PCR
37	13167/11	ASC-US	SIN PCR
74	1436/12	ASC-US	2918
31	1444/12	ASC-US	2851
40	1446/12	ASC-US	2847
33	1447/12	ASC-US	SIN PCR
37	1448/12	ASC-US	SIN PCR
48	1586/12	ASC-US	3206
58	1648/12	ASC-US	3198
52	1662/12	ASC-US	3399
47	1911/12	ASC-US	12747
52	1923/12	ASC-US	SIN PCR
69	2014/12	ASC-US	SIN PCR
23	2018/12	ASC-US	SIN PCR
61	211/12	ASC-US	15883
56	215/12	ASC-US	9354
47	216/12	ASC-US	287
69	217/12	ASC-H	SIN PCR
57	574/12	ASC-US	SIN PCR
63	2164/12	ASC-US	4807
45	2182/12	ASC-H	16087
73	2306/12	ASC-US	SIN PCR

76	2332/12	ASC-US	SIN PCR
62	2423/12	ASC-US	SIN PCR
30	2429/12	ASC-US	9702
64	2435/12	ASC-US	2917
49	2436/12	ASC-US	SIN PCR
29	2685/12	ASC-US	SIN PCR
43	2689/12	ASC-US	5799/12
40	2690/12	ASC-US	5789 SP
48	2700/12	ASC-US	5773
50	2702/12	ASC-US	5781
36	2708/12	ASC-US	5841
33	2709/12	ASC-US	1679
43	2710/12	ASC-US	5835
53	2711/12	ASC-US	5839
33	2024/12	ASC-H	17027
48	2720/12	ASC-US	5840
36	2721/12	ASC-US	5842
50	2725/12	ASC-US	SIN PCR
47	2726/12	ASC-US	6024
49	2867/12	ASC-US	6019
47	2870/12	ASC-US	6166
57	2959/12	ASC-US	7088
48	2964/12	ASC-US	7086
29	2978/12	ASC-US	6568
68	2979/12	ASC-US	6572
54	2981/12	ASC-US	7083
44	2982/12	ASC-US	6796
35	2987/12	ASC-US	SIN PCR
24	3007/12	ASC-US	6504
40	3332/12	ASC-US	SIN PCR
49	3343/12	ASC-US	390
66	3359/12	ASC-US	280
32	3064/12	ASC-US	6802
46	3066/12	ASC-US	6801 SP
40	3332/12	ASC-US	SIN PCR
33	3344/12	ASC-US	7257
66	3359/12	ASC-US	280
43	3360/12	ASC-US	7407
23	3381/12	ASC-US	SIN PCR
44	3542/12	ASC-US	SIN PCR
73	3580/12	ASC-H	SIN PCR

55	3608/12	ASC-US	23885
42	3635/12	ASC-US	7420
53	3933/12	ASC-US	8532
28	3941/12	ASC-US	8640
24	3942/12	ASC-US	8644
39	4113/12	ASC-US	8702
26	422/12	ASC-US	SIN PCR
42	423/12	ASC-H	7906
49	4311/12	ASC-US	3742
42	4313/12	ASC-US	9081
58	4325/12	ASC-US	SIN PCR
41	4329/12	ASC-US	9199
25	4331/12	ASC-US	9201
31	4342/12	ASC-US	9702
49	4443/12	ASC-US	7260
62	4524/12	ASC-US	SIN PCR
26	4814/12	ASC-US	SIN PCR
57	4826/12	ASC-US	22886
27	5087/12	ASC-US	6714
83	5090/12	ASC-H	11592
63	5170/12	ASC-US	12393
28	5176/12	ASC-US	12396
21	5184/12	ASC-US	SIN PCR
41	5189/12	ASC-US	SIN PCR
36	5322/12	ASC-US	SIN PCR
28	5358/12	ASC-US	11972
45	4954/12	ASC-US	11440
48	5453/12	ASC-US	13691
33	5486/12	ASC-US	13729
47	5674/12	ASC-US	SIN PCR
36	5790/12	ASC-US	SIN PCR
45	5791/12	ASC-US	18861
45	6028/12	ASC-US	13994
43	6031/12	ASC-US	SIN PCR
29	6041/12	ASC-US	14007
74	6150/12	ASC-US	SIN PCR
38	6262/12	ASC-US	13681
48	6273/12	ASC-US	SIN PCR
36	6279/12	ASC-US	14658/11
33	4591/12	ASC-US	9852
51	4597/12	ASC-US	16589

49	6455/12	ASC-US	14684
22	6583/12	ASC-US	7729
51	6584/12	ASC-US	SIN PCR
63	6592/12	ASC-H	16442
42	7911/12	ASC-US	19132
58	8272/12	ASC-US	20663
45	830/12	ASC-US	1210
36	8320/12	ASC-US	20978
39	846/12	ASC-US	1410
46	850/12	ASC-US	1413
75	8738/12	ASC-US	SIN PCR
71	8812/12	ASC-US	SIN PCR
79	8825/12	ASC-H	SIN PCR
32	8746/12	ASC-H	SIN PCR
48	9025/12	ASC-US	24002
54	9084/12	ASC-H	6975
55	9149/12	ASC-US	16130
55	9158/12	ASC-US	SIN PCR
51	9188/12	ASC-US	SIN PCR
65	9433/12	ASC-US	18016/11
29	9437/12	ASC-US	17410
45	9442/12	ASC-US	17591
40	9444/12	ASC-US	SIN PCR
52	9446/12	ASC-US	25759
59	9450//12	ASC-H	SIN PCR
40	9533/12	ASC-US	SIN PCR
36	9544/12	ASC-US	SIN PCR
68	9545/12	ASC-US	SIN PCR
46	9598/12	ASC-US	SIN PCR
53	9625/12	ASC-US	1341
48	6171/12	ASC-US	14455
40	8329/12	ASC-US	SIN PCR
59	8288/12	ASC-US	20674
43	8355/12	ASC-US	SIN PCR
40	8552/12	ASC-US	22950
44	SIN NUMERO	ASC-US	12480
33	SIN NUMERO	ASC-US	12497
37	7	ASC-US	12473
36	26	ASC-US	12494
41	39	ASC-US	12507
44	41	ASC-US	12509

50	43	ASC-US	12509
50	5768	ASC-US	5768
47	5779	ASC-US	5779
50	5781	ASC-US	5781
49	5786	ASC-US	5786
41	6159	ASC-US	6159
35	6167	ASC-US	6167
44	6215	ASC-US	6215
48	6804	ASC-US	6804
30	7064	ASC-US	7064
54	7073	ASC-US	7073
41	7085	ASC-US	7085
49	7148	ASC-US	7148
43	7150	ASC-US	7150
48	7154	ASC-US	7154
33	7257	ASC-US	7257
40	7258	ASC-US	7258
53	8532	ASC-US	8532
28	8640	ASC-US	8640
38	8641	ASC-US	8641
35	9694	ASC-US	9694
27	10344	ASC-US	10344
33	10467	ASC-US	10467
52	11316	ASC-US	11316
34	11323	ASC-US	11323
49	11439	ASC-US	11439
37	12746	ASC-US	12746
65	13666	ASC-US	13666
48	13667	ASC-US	13667
27	14438	ASC-US	14438
50	16137	ASC-US	16137
47	18436	ASC-US	18436
61	20676	ASC-US	20676
55	20682	ASC-US	20682
40	22340	ASC-US	22340
50	22629	ASC-US	22629
44	22633	ASC-US	22633
42	26158	ASC-US	26158
38	27758	ASC-US	27758

ABSTRACT

Establish what the meaning cytological diagnosis of ASC-US or ASC-H in relation to the positivity of PCR with high-risk HPV (HR-HPV) is important because of the lack of concordance in diagnosis and morphological subsequent clinical behavior.

File were collected cytopathology laboratory total Papanicolaou stain samples taken by the colposcopy service Regional Hospital Adolfo Lopez Mateos and family medicine clinics in the South Zone ISSSTE Delegation diagnosed with ASC-US and ASC-H; cases were subsequently identified with PCR testing for high-risk HPV in the period from december 2011 to september 2012.

The analysis of results indicates that the frequency of high-risk HPV is present in cases with cytologic diagnosis of ASC by 33%, therefore it is important to monitor patients with this diagnosis, since no clear colposcopic injury exist, diagnostic can make a real risk factors, which changes the clinical behavior and subsequent treatment.
