

# Citologia em meio líquido para exame de citologia cérvico-vaginal. Estudo comparativo sobre a atividade fixadora de etanol e de formaldeído

The use of formaldehyde and ethanol as fixative agents in the liquid-based cytology technique for performing cervical cytology exams (Pap test)

RIALA6/1168

Jacqueline Plewka MACHADO\*, Aguinaldo José NASCIMENTO, Maria Suely Soares LEONART.

\* Endereço para correspondência: Rua Curitiba, 440 apto. 22, CEP: 85802-000, Centro, Cascavel, PR/Brasil. Fone: (45) 3321-5286, e-mail: jacquelineplewka@yahoo.com.br Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. Av. Pref. Lothário Meissner, 632 Jardim Botânico, Curitiba, PR/Brasil, CEP 80210-170  
Recebido:06/11/2007 – Aceito para publicação: 21/06/2008

## RESUMO

A citologia em meio líquido tem sido considerada importante alternativa para o ganho de sensibilidade do exame de Papanicolaou. Este trabalho teve o objetivo de estudar variações no método de citologia em meio líquido. Foram coletadas 150 amostras cérvico-vaginais, em duplicata, de pacientes atendidas no Ambulatório do Hospital Universitário do Oeste do Paraná e em Unidades de Saúde do Município de Cascavel-PR, após a assinatura do consentimento informado. Foram preparadas 150 amostras em meio líquido, sendo 100 em etanol 95% e 50 amostras em formaldeído 1% em tampão fosfato pH 7,4. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 289 x g. Com os sedimentos obtidos, foram preparados esfregaços circulares em lâminas, os quais foram fixados em etanol 95% e corados segundo a técnica de Papanicolaou. As amostras em meio líquido de etanol e formaldeído, demonstrou celularidade satisfatória, adequabilidade em morfometria e na identificação morfológica de células, bem como sensibilidade e especificidade satisfatórias na identificação de microrganismos e de alterações celulares. As propriedades fixadoras e preservadoras do etanol e do formaldeído observadas no presente estudo os apontam como alternativas viáveis para uso em citologia em meio líquido, porém a realização de estudos complementares é necessária para efetuar aperfeiçoamento do método.

**Palavras chave.** citologia em meio líquido, Papanicolaou, citologia cérvico-vaginal.

## ABSTRACT

The liquid-based cytology technique has been considered an important alternative for achieving the sensitivity of cervix-vaginal cytology exams. This study aimed to assess the variations in the liquid-based cytology technique. A total of 150 cervical samples were collected in duplicate from patients attended at the Clinic of the Hospital Acadêmico do Oeste do Paraná and Health Units of the Municipal District of Cascavel-PR, after the written informed consent form had been signed by them. The 100 collected samples were fixed and preserved in liquid media containing 95% ethanol and 50 samples in 1% formaldehyde in phosphate buffer pH 7.4. The samples were centrifuged at 289 x g and circular smears of the sediment were prepared on microscope slides, which were fixed in 95% ethanol followed by Papanicolaou staining, and mounted in Entellan®. The liquid-based cytology technique showed satisfactory cellularity, adequacy in morphometry and in cells morphology identification. Satisfactory sensitivity and specificity for detecting microorganisms and cellular alterations were also observed. Owing to the fixation and preservation properties of ethanol and formaldehyde, the present study points up that both preparations might be used as alternative fixative agents in liquid-based cytology technique, although further studies for method improvements have to be done.

**Key word.** pap test, liquid-based cytology, cervical cytology.

## INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm apontado para índices não ideais de sensibilidade do preparado convencional de Papanicolaou<sup>1</sup>. As causas citadas são: insuficiente representatividade das células escamosas, endocervicais e da junção escamo-colunar (JEC), secagem e ou má fixação do material, distribuição não homogênea das células no esfregaço, presença de leucócitos, hemácias e restos celulares em excesso<sup>2</sup>.

Recentemente, desenvolveu-se um sistema de preparo de amostras de citologia em meio líquido, que tem sido considerado, nos últimos anos, importante alternativa para melhorar a sensibilidade do exame citológico cérvico-vaginal. Em especial pela melhoria na qualidade da fixação do material e na homogeneidade da distribuição celular no esfregaço, a citologia em meio líquido vem sendo apresentada não como substituta, mas sim, como um aprimoramento do teste de Papanicolaou. Possivelmente devido a estes fatores, tem-se obtido menores índices de resultados falso-negativos com esta metodologia em relação à convencional<sup>1-3</sup>.

Os sistemas disponíveis para citologia cérvico-vaginal em meio líquido apresentam um custo muito mais elevado por exame em relação ao método convencional, chegando a inviabilizar o seu uso como metodologia de escolha em unidades de saúde e em programas de prevenção do câncer do colo do útero, especialmente em países em desenvolvimento<sup>4</sup>.

O presente trabalho visou o estudo da utilização do etanol ou formaldeído como fixadores, para o preparo de amostras cérvico-vaginais em meio líquido em comparação à citologia convencional.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de material

Coletou-se material cérvico-vaginal de 150 mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde, para a realização do exame de Papanicolaou, após assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Para o exame de citologia convencional, coletou-se material da exocérvice e da junção escamo-colunar (JEC) com o auxílio de espátula de Ayre, girando-se 360°; e da endocérvice, com escova cilíndrica, girando-se 360°. Os materiais obtidos foram cuidadosamente espalhados sobre duas lâminas de microscopia, de modo regular e em um único sentido, sendo a primeira encaminhada para o exame preventivo de rotina da paciente e; a segunda, fixada em álcool etílico 95% durante no mínimo 30 min (Controle). Em seguida, coletou-se material para citologia em meio líquido com o auxílio de escova cônica (Kolplast®), processado como segue. Em 50 pacientes atendidas no Ambulatório do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), colocou-se a escova com o material em tubo cônico contendo 2ml de etanol 95% (Etanol). Em outras 100

pacientes atendidas nas Unidades de Saúde Palmeiras, Parque São Paulo e XIV de Novembro, do Município de Cascavel-PR, colocou-se a escova com o material em tubo cônico contendo 2ml de formaldeído a 1% em tampão fosfato 150 mmoles/l, pH 7,4 (Formaldeído). Nas amostras de citologia em meio líquido, homogeneizou-se a suspensão de células em agitador tipo vortex por 15s, retirou-se a escova cônica e centrifugou-se a 289 x g durante 5 min, desprezando-se o sobrenadante por inversão. Ressuspendeu-se o sedimento das amostras formaldeído em 2ml de álcool etílico 95% durante 60 min e, após sedimentação espontânea, retirou-se o sobrenadante com micropipeta. Confeccionou-se esfregaços Etanol e Formaldeído, pelo espalhamento de 50 µl dos sedimentos em forma circular (30mm de diâmetro), com o auxílio de ponteira de micropipeta descartável, secando-os ao ar. Fixou-se as lâminas em etanol 95% durante 30 min e procedeu-se à coloração de Papanicolaou empregando-se corantes Newprov® e montagem com Entellan®.

### Avaliação citomorfológica

A leitura das lâminas foi procedida por varredura horizontal sistemática ao microscópio óptico (100x). Para observação minuciosa, utilizaram-se aumentos de 400x e 1000x. As lâminas de cada paciente foram observadas em dias alternados, para evitar indução na avaliação. A indicação dos tipos e alterações celulares, da presença de microorganismos e a classificação segundo Bethesda 2001<sup>6</sup>, foram feitas na forma de laudo descritivo, por consenso morfológico entre duas citologistas do laboratório de Citologia Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

### Celularidade

Observaram-se critérios mínimos de celularidade para citologia cérvico-vaginal em meio líquido pelo número médio de células em 10 campos representativos com objetiva de 40x, aumento 400x e diâmetro da ocular 20mm<sup>6</sup>.

### Homogeneidade na distribuição das células

Convencionou-se que apresentavam homogeneidade satisfatória esfregaços com 10 a 30 células na maioria dos campos em aumento de 100x.

### Presença de células epiteliais escamosas e glandulares

Avaliou-se a presença de células escamosas, metaplásicas e endocervicais, bem como de leucócitos polimorfonucleares, histiócitos, linfócitos e hemácias, em relação à quantidade, como: escassa (+), moderada (++), acentuada (+++) e abundante (++++), de acordo com os seus aspectos citomorfológicos<sup>6-11</sup>.

### Presença de alterações celulares e artefatos

Avaliou-se a presença de alterações reativas e degenerativas, como: pseudoesinofilia, metacromasia, vacuolização citoplasmática, halo perinuclear, grânulos queratohialinos, apagamento de bordos citoplasmáticos,

hiperqueratose, paraqueratose, homogeneização da cromatina, espessamento de bordos nucleares, cariorréxis, edema nuclear, binucleação, multinucleação, cariopcnose, cariólise e citólise. Observou-se também a ocorrência de alterações características de anormalidades epiteliais, como: coilocitose, hiperromasia, cariomegalia, aumento da relação núcleo/citoplasma, distribuição irregular da cromatina, contorno irregular do núcleo e pleomorfismo celular. Registrou-se a presença de artefatos como pleomorfismo celular, destruição celular, alterações tintoriais, fundo sujo, entre outros, sendo que alguns deles foram considerados como produtos da interferência da metodologia aplicada.

#### **Avaliação da microbiota**

Registrou-se a presença de microorganismos morfológicamente compatíveis com bacilos de Döderlein, flora mista, flora cocóide, flora bacilar, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Actinomyces spp*, *Candida spp*, *Mobilincus spp*, e *Leptotrix spp*, entre outros, segundo critérios descritos por Silva Filho e Longatto Filho<sup>12</sup>.

*Morfometria*: Analisou-se área e perímetro do citoplasma e do núcleo, bem como relação núcleo/citoplasma de células escamosas intermediárias pelo programa, UTHSCSA® *Image Tool*, em microscópio Nikon ECLIPSE® E 200, capturando-se imagens com câmera digital SANSUNG® FCC131.

#### **Análise estatística**

Empregou-se o teste Z para duas proporções, com categorias mutuamente excludentes, para análise de concordância e discordância, em relação às diferenciações celulares. Determinou-se a sensibilidade e a especificidade relativas à presença de microorganismos e de alterações celulares, em relação ao controle. Para os dados morfométricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA, um critério) e o teste de Tukey para comparações de médias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em levantamentos populacionais realizados pelo exame de Papanicolaou convencional, demonstrou-se que a coleta de material pode ser responsável por até 90% entre os 15 a 50% de resultados falsos negativos relatados na literatura<sup>13</sup>. A citologia em meio líquido pode ser mais sensível em relação à convencional na detecção de anormalidades, uma vez que as células coletadas são transferidas para um meio preservador, vindo a compor uma preparação mais homogênea e representativa<sup>14,15</sup>.

Com o intuito de desenvolver uma metodologia alternativa viável e de baixo custo para citologia em meio líquido, testou-se vários meios para preservação e fixação de células epiteliais em lâmina, entre eles o etanol, amplamente empregado como fixador celular; e o formaldeído, rotineiramente empregado

como fixador de células e tecidos. Ao se testar o formaldeído 1 a 5% em tampão fosfato 150 mmoles/l pH 7,4, obteve-se satisfatoriedade apenas com 1%, com presença de artefatos e alterações morfotintoriais em concentrações maiores.

Solomon e Nayar<sup>7</sup> de acordo com o Sistema Bethesda 2001, recomendam a presença de ao menos 5000 células em preparações de citologia cérvico-vaginal em meio líquido. Neste trabalho, obteve-se ao menos 10.000 células em 50% das preparações, com celularidade média na faixa de 15.000 células, demonstrando uma boa fixação do material citológico em lâmina.

Em relação às células analisadas, houve concordância nas amostras Etanol e Formaldeído em relação ao Controle (Figura 1), com exceção das células endocervicais e histiócitos, apenas para as amostras Formaldeído,  $p < 0,05$ . Com o emprego de formaldeído, em relação às células endocervicais, a estrutura da cromatina foi alterada, tornando-se compactada e hiperromática; enquanto nos histiócitos, observou-se alterações nas estruturas citoplasmáticas, não se conseguindo perceber a vacuolização, característica morfológica relevante para a identificação destas células.

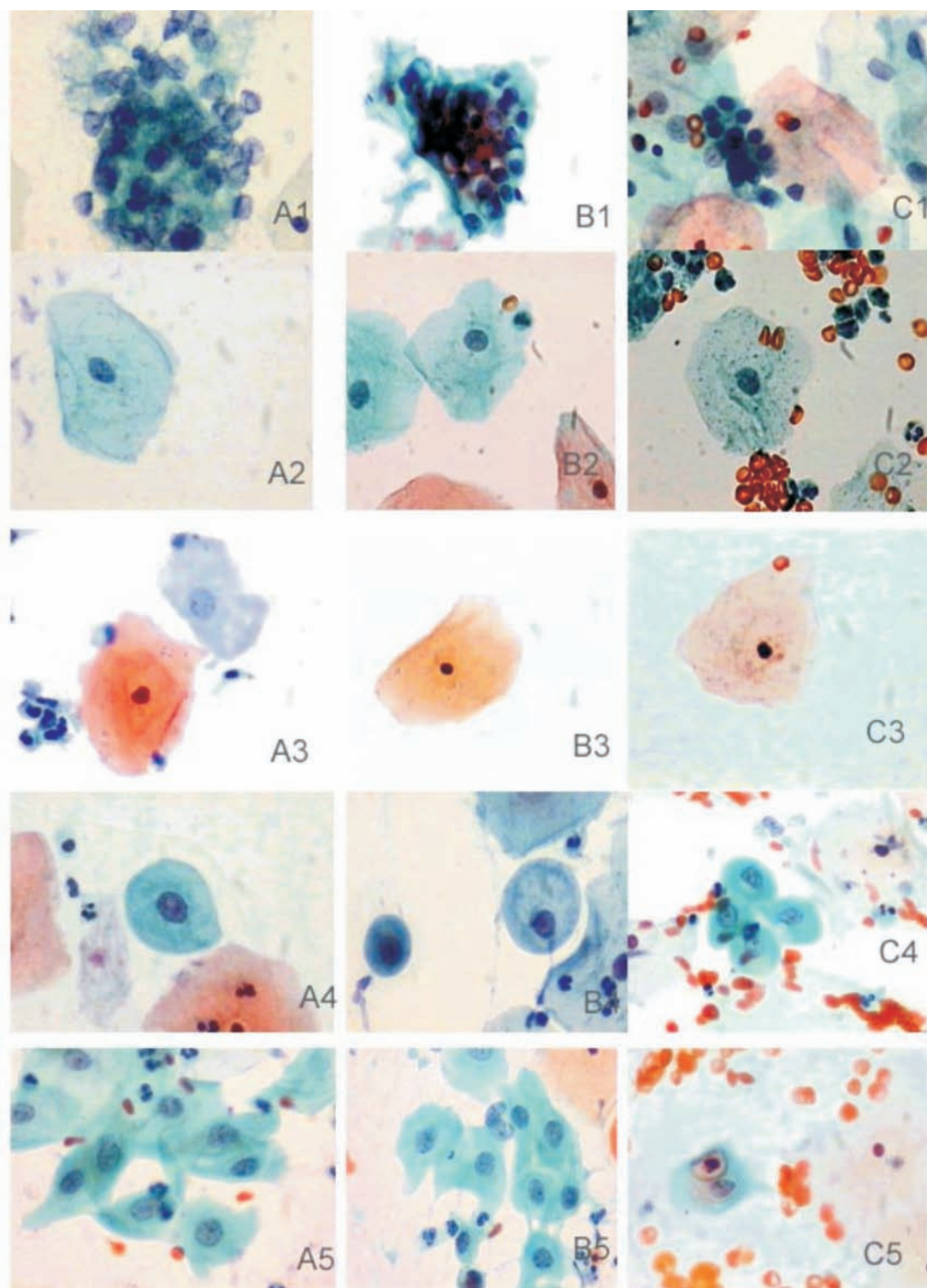
A sensibilidade e a especificidade obtidas na avaliação da microbiota em preparações Etanol e Formaldeído, em comparação com as de citologia convencional, foram satisfatórias. Todos os microorganismos observados na citologia convencional também o foram na citologia em meio líquido, de um modo geral com melhor qualidade morfotintorial (Figura 2). Observaram-se apenas dois casos com resultados falso-negativos, para *Actinomyces spp* e *Candida spp*, nas preparações em meio líquido Formaldeído.

Os resultados obtidos para a presença de microorganismos na citologia em meio líquido corroboram os achados de outros autores, que apontam para sensibilidade e especificidade ótimas para o método. Roberts et al.<sup>16</sup> referem-se ao fato de que os microorganismos são facilmente identificados em citologia em meio líquido, em comparação à citologia convencional.

A análise de alterações celulares nas preparações estudadas, em comparação com a citologia convencional, mostrou índices satisfatórios de sensibilidade e especificidade. Observou-se sensibilidade superior a 70%, em amostras Etanol, para pseudoesinofilia, metacromasia, hiperqueratose, edema nuclear, halo perinuclear, grânulos querato-hialinos, citólise, cariopcnose, paraqueratose, cariólise, coilocitose e binucleação, e; em amostras Formaldeído, para pseudoesinofilia, metacromasia, halo perinuclear, grânulos querato-hialinos, hiperqueratose, edema nuclear, cariopcnose, citólise e coilocitose (Figura 3). Em relação à especificidade, obteve-se valores maiores que 86% para todas as alterações observadas.

Em apenas três amostras, observou-se critérios morfológicos suficientes para classificação como lesão intraepitelial cervical de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial cervical de alto grau (HSIL) e carcinoma escamoso invasor, não permitindo o emprego de análise estatística em relação a critérios



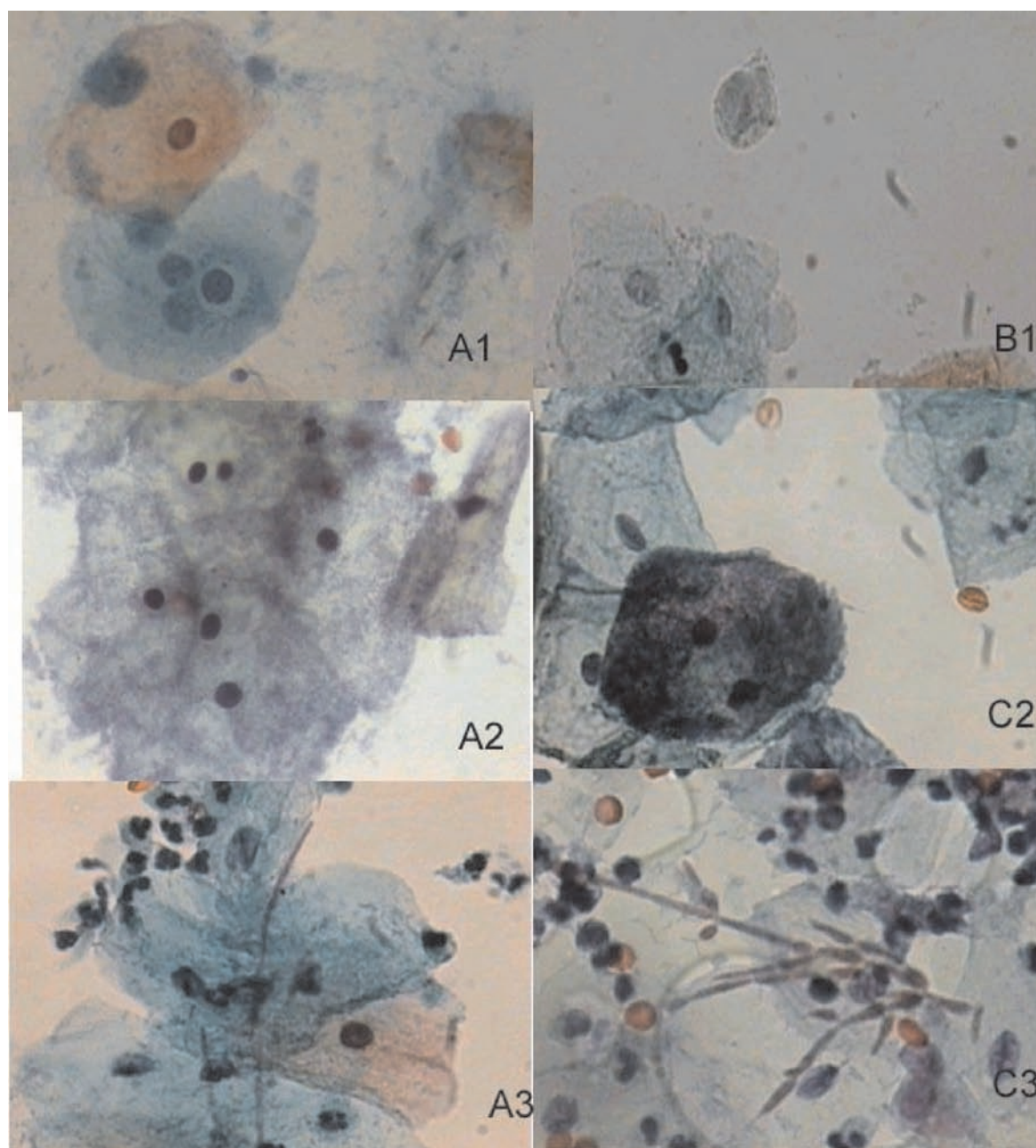


**Figura 1.** Fotomicrografias de células epiteliais cervicais em preparações convencionais e em meio líquido

Métodos: A - citologia convencional; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C- citologia em meio líquido com formaldeído 1%.  
Células epiteliais cervicais: 1 - células endocervicais; 2 - células escamosas intermediárias; 3 - células escamosas superficiais; 4 - células escamosas parabasais; 5 - células metaplásicas.  
Coloração de Papanicolaou (400x).

morfológicos de anormalidades epiteliais. No entanto, observou-se evidenciação de critérios relevantes como hiperchromasia, cariomegalia, aumento da relação núcleo-citoplasma, irregularidades na distribuição da cromatina, irregularidade do contorno nuclear, pleomorfismo celular e disqueratose nas amostras de citologia em meio líquido em relação ao controle (Figura 4).

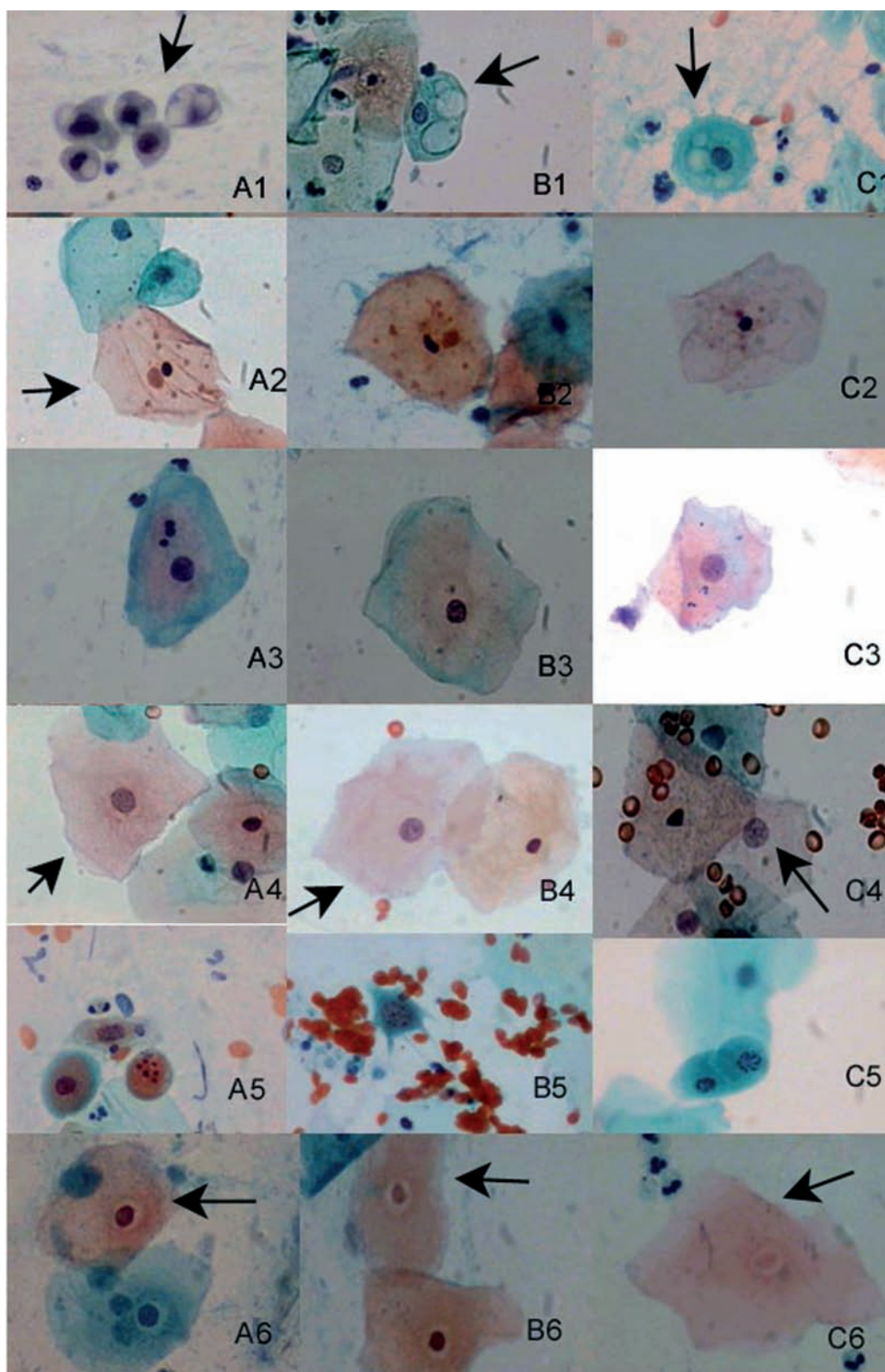
A maioria dos estudos atribui maior sensibilidade para a metodologia em meio líquido, com resultados variáveis, tanto na detecção de LSIL, quanto de HSIL<sup>17-22</sup> com aumento de 25% na sensibilidade para detecção de carcinoma cervical. No estudo de Davey et al.<sup>23</sup>, os autores encontraram 55% mais casos ao agruparem HSIL e carcinoma, com o emprego da citologia em meio líquido.



**Figura 2.** Fotomicrografias representativas da microbiota em preparações de citologia cervical convencional e em meio líquido

Métodos: A - citologia convencional ; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C - citologia em meio líquido com formaldeído 1% . Microbiota: 1 - *Trichomonas vaginalis*; 2 - *Gardnerella vaginalis* ; 3 - *Candida spp.*  
Coloração de Papanicolaou (400x).





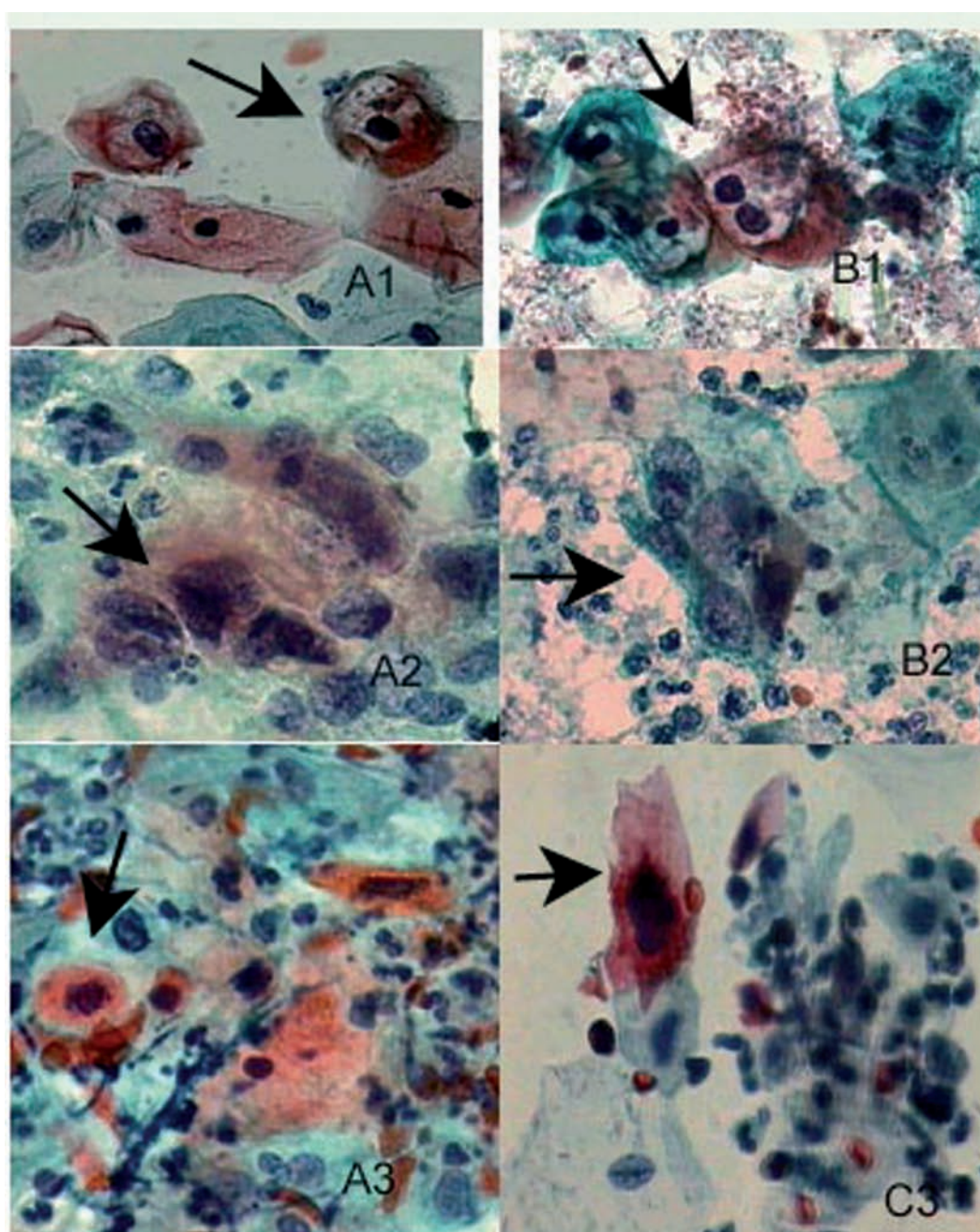
**Figura 3.** Fotomicrografias representativas de alterações celulares de material cérvico-vaginal em preparações convencionais e em meio líquido

Métodos: A - citologia convencional ; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C - citologia em meio líquido com formaldeído 1% .  
Alterações celulares: 1 - vacuolização citoplasmática; 2 - grânulos querato-hialinos; 3 - metacromasia; 4 - pseudo eosinofilia; 5 - cariorrexis; 6 - halo perinuclear. Cloração de Papanicolaou (400x).

As células escamosas intermediárias em amostras Etanol, monitoradas pelo programa *Image Tool® for Windows*, não mostraram diferenças de área e perímetro em unidades pixel (bit), em relação às preparações de citologia convencional  $p > 0,05$ . Porém, em amostras Formaldeído, a área e o perímetro citoplasmáticos das células escamosas intermediárias foram menores em relação aos obtidos com o

método convencional  $p < 0,05$ . Esses resultados sugerem uma possível influência do meio aquoso, que poderia ter provocado contração do citoplasma, nas amostras Formaldeído.

Não se encontrou diferença significativa na relação núcleo-citoplasma ao se comparar a citologia em meio líquido e a convencional. No entanto, houve diferença significativa entre



**Figura 4.** Fotomicrografias de citologia cérvico-vaginal de casos classificados como anormalidades epiteliais segundo o Sistema Bethesda 2001

Métodos: A - citologia convencional; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C - citologia em meio líquido com formaldeído 1% . Anormalidades epiteliais: 1 - lesão intraepitelial de baixo grau (sugestiva de infecção por HPV); 2 - lesão intraepitelial de alto grau; 3 - carcinoma cervical escamoso. Coloração de Papanicolaou (400x).



os grupos estudados, com uma tendência de se observar menor relação núcleo-citoplasma no grupo no qual se comparou amostras formaldeído com a citologia convencional em relação ao grupo no qual se comparou amostras etanol ao controle, evento não explicado.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos para celularidade, homogeneidade e identificação de células epiteliais e de suas alterações, bem como de microorganismos, as variações no método de citologia em meio líquido propostas neste trabalho apresentaram algumas limitações. Nas amostras Etanol houve precipitação de material protéico que causou algum obscurecimento, especialmente em materiais ricos em muco, polimorfonucleares ou hemácias. Nas amostras Formaldeído houve alterações em células endocervicais e histiócitos, que dificultaram a sua identificação. Apesar do número de resultados prejudicados durante a experimentação ter sido desprezível não significa que não devam ser levados em consideração. Desta forma, conclui-se que há necessidade de estudos complementares, que possibilitem a proposição de novas variações para o método de citologia em meio líquido.

O custo do material disponível atualmente no mercado para citologia em meio líquido poderia ser reduzido em até 90%, com a aplicação das metodologias propostas. O desenvolvimento de uma metodologia alternativa para citologia cérvico-vaginal em meio líquido, que seja simples e acessível economicamente para que possa ser empregada em rastreamentos populacionais, é relevante para o desenvolvimento de países como o Brasil e para a prevenção e controle do câncer cervical.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Irene Ermelino dos Santos por seu auxílio técnico, às Equipes do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), das Unidades de Saúde do Município de Cascavel-PR e do Laboratório de Análises Patológicas e Clínicas do Hospital Geral do Exército de Curitiba (LAPC/HGEC), e Laboratório Prevenção e Diagnóstico por terem disponibilizado suas estruturas, e às pacientes que concordaram em participar deste estudos.

## REFERÊNCIAS

1. Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C, Ghiringhello B, Giorgi-Rossi P, Minucci D, Parisio F, Pojer A, Schiboni ML, Sintoni C, Zorzi M, Segnan N, Confortini M. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ*. 2007; 7: 335: 28.
2. Klinkhamer JJMP, Meerding JW, Rosier MWFP, Hanselaar MJA. Liquid-based cervical cytology. A review of the literature with methods of evidence-based medicine. *Cancer*. 2003; 99(5): 263-71.
3. Renshaw AA, Mody RD, Molly W, Bentz SJ, Colgan JT. The significance of certification in liquid-based cytology and performance in the College of American Pathologists interlaboratory comparison program in cervicovaginal cytopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130: 1269-1272.
4. Montz FJ, Frederic LB, Ristow ER, Cornelison T. Impact of increasing Papanicolaou test sensitivity and compliance: a modeled cost and outcomes analysis. *Obstet Gynecol*. 2001; 97: 781-788.
5. Marchand L, Mundt M, Klein G, Agarwal SC. Optimal collection technique and devices for a quality pap smear. *WMG*. 2005; 104(6): 51-55.
6. Bethesda 2001. Disponível em <http://www.bethesda2001.cancer.gov.br>. acesso 16 de fevereiro 2007.
7. Solomon D, Nayar R. Sistema Bethesda para citopatologia cérvico vaginal. 2<sup>th</sup> ed Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
8. Cibas ES, Ducatman BS. Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates. 2nd. London W.B. Saunders Company, 2003.
9. Bibbo M. Comprehensive Cytopathology, 2nd. Philadelphia WB Saunders Company, 1997.
10. Atkinson BF, Silverman JF. Atlas de dificuldades diagnosticas em citopatologia. Harcourt, 2000.
11. Koss LG, Melamed MR. Koss' Diagnostic cytology and its histopathology bases. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: JB. Lippincott Company, 2006.
12. Silva Filho AM, Longatto-Filho A. Colo uterino e vagina: processos inflamatórios, aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. 1<sup>th</sup>ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
13. Sawaya GF, Sox HC. Trials that matter: liquid-based cervical cytology: disadvantages seem to outweigh advantages. *Ann Intern Med*. 2007; 147(9): 668-669.
14. Alves VAF, Bibbo M, Schmitt FC, Milanezi F, Longatto-Filho A. Comparison of manual and automated methods of liquid-based cytology. A morphologic study. *Acta Cytol*. 2004; 48(2): 187-193.
15. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2008; 111(1): 167-177.
16. Roberts JM, Thurloe JK. Comparative sensitivities of ThinPrep and Papanicolaou smear for adenocarcinoma in situ (AIS) and combined AIS/high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL): comparison with HSIL. *Cancer*. 2007; 111(6): 300-305.
17. Rinas AC, Mittman BW, Le LV, Hartmann K, Cayless J, Singh HK. Split-sample analysis of discarded cells from liquid-based Pap smear sampling devices. *Acta Cytol*. 2006; 50(1): 55-62.
18. Bishop JW, Bigner HS, Colgan JT, Husain MD, Howell PL, Mcintosh MK, Taylor QD, Sadeghi HM. Multicenter masked evaluation of AutocytePrep thin layers with matched conventional smears. Including initial biopsy results. *Acta Cytol*. 1998; 42: 189-197.
19. Ring M, Bolger N, O'Donnell M, Malkin A, Birmingham N, Akpan E, Mulcahy F, Turner MJ, Griffin M, O'Leary JJ. Evaluation of liquid-based cytology in cervical screening of high-risk populations: a split study of colposcopy and genito-urinary medicine populations. *Cytopathology*. 2002; 13(3): 152-159.
20. Negri G, Menia E, Egarter-Vigl E, Vittadello F, Mian C. ThinPrep versus conventional Papanicolaou smears in the cytologic follow-up of women with equivocal smears. *Cancer Cytopathology*. 2003; 99(6): 342-345.
21. Hodgson W, Kaplan JK, Rodriguez M, Mchale MT, Rose SG, Elkas CJ. The impact of converting to liquid-based cervical in a military population. *Gynecol Oncol*. 2005; 99(2): 422-426.
22. Longatto-Filho A, Pereira SMM, Di Loreto, C, Uttagawa ML, Makabe S, Maeda MY, Marques JA, Santoro CL, Castelo Filho A. DCS liquid-based system is more effective than conventional smears to diagnosis of cervical lesions: study in high-risk population whit biopsy-based confirmation. *Gynecol Oncol*. 2005; 97(2): 497-500.
23. Davey E, Assuncao J, Irwig L, Macaskill P, Chan SF, Richards A, Farnsworth A. Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPrep Imager compared with conventional cytology: prospective study. *BMJ*. 2007; 335(7609): 1-2.