

FIPLIQ: uma solução alternativa para exames citológicos ginecológicos e bucais

FIPLIQ: an alternative solution for gynecological and oral cytology

Michelli Aparecida B. Silva; Thiago B. D. Batista; Bruna F. Duarte; Maria Suely S. Leonart

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

RESUMO

Introdução: A citologia em meio líquido foi desenvolvida para melhorar o teste de Papanicolaou. Alguns meios líquidos são comercialmente disponíveis, no entanto, devido ao alto custo, há dificuldades para sua implementação em programas de saúde pública em muitos países. **Objetivos:** Estudar a adequabilidade de meios líquidos alternativos para a coleta e a preservação de amostras para exames citológicos, comparando os resultados com a metodologia convencional de Papanicolaou. **Material e métodos:** Neste estudo, 127 diferentes composições de soluções alternativas de meios líquidos foram testadas com amostras de 10 voluntários para citologia oral e 20 amostras de voluntárias para citologia cervical. O fosfato de formaldeído-isopropanol (FIPLIQ) foi utilizado para preservar amostras cervicais preparadas e analisadas no mesmo dia e três, sete e 15 dias após coleta, em comparação com a citologia convencional. Avaliações de qualidade e adequação dos tipos celulares, de microrganismos ou seus efeitos citopáticos, de alterações celulares reativas, degenerativas e displásicas foram realizadas. **Resultados:** As amostras processadas com FIPLIQ apresentaram resultados semelhantes aos do teste convencional de Papanicolaou quando analisados coloração e apagamento de bordas citoplasmáticas, estrutura de cromatina, presença ou ausência de diferentes tipos de células e microrganismos, processo reparativo, pré-neoplásico e alterações celulares neoplásicas; as amostras foram conservadas por até 15 dias após a coleta. **Conclusão:** Os resultados preliminares sugerem que o FIPLIQ é adequado para a preparação e a preservação de espécimes citológicos por até 15 dias.

Unitermos: biologia celular; esfregaço vaginal; mucosa bucal; neoplasia intraepitelial cervical; neoplasias epiteliais e glandulares; lesões pré-cancerosas.

ABSTRACT

Introduction: Liquid-based solution for cytology has been developed to improve Pap test. Some liquid media are commercially available, however, due to the high cost there are difficulties in implementing it in the public health programs of many countries. **Objectives:** To study the suitability of alternative liquid media for the collection and preservation of samples for cytologic examinations, comparing the results with the conventional Papanicolaou methodology. **Material and methods:** In this study, 127 different compositions of alternative liquid-based solutions were tested with samples from 10 volunteers for oral cytology and 20 samples from volunteers for cervical cytology. Formaldehyde-isopropanol-phosphate (FIPLIQ) was used to preserve cervical samples prepared and analyzed on the same day and 3, 7, and 15 days after collection, compared with Pap smear. Evaluations on quality and adequacy of cell types, microorganisms or their cytopathic effects, reactive, degenerative and dysplastic cell alterations were performed. **Results:** Samples processed with FIPLIQ showed results similar to those of conventional Pap smear when analyzing staining cytoplasm with indistinct cytoplasm borders, chromatin structure, presence or absence of different types of cell and microorganisms, reparative process, preneoplastic, and neoplastic cell changes; the samples were stored for up to 15 days after collection. **Conclusion:** Preliminary results suggest that FIPLIQ is suitable for the preparation and preservation of cytology specimens for up to 15 days.

Key words: cellular biology; vaginal smears; oral mucosa; cervical intraepithelial neoplasia; epithelial and glandular neoplasms; premalignant lesions.

RESUMEN

Introducción: La citología en medio líquido fue desarrollada para mejorar la prueba de Papanicolaou. Algunos medios líquidos son comercialmente disponibles; no obstante, debido al costo elevado, hay dificultades para su implementación en programas de salud pública en muchos países. **Objetivos:** Estudiar la adecuación de medios líquidos alternativos para recolecta y la preservación de muestras para exámenes citológicos, comparando los resultados con la metodología convencional de Papanicolaou. **Material y métodos:** En este estudio, 127 diferentes composiciones de soluciones alternativas de medios líquidos fueron testadas con muestras de 10 voluntarios para citología oral y 20 muestras de voluntarias para citología cervical. El fosfato de formaldeído- isopropanol (FIPLIQ) fue usado para preservación de muestras cervicales preparadas y analizadas en el mismo día, y tres, siete y 15 días después de la recolecta, en comparación con la citología convencional. Se hicieron evaluaciones de calidad y adecuación de los tipos celulares, microorganismos o sus efectos citopáticos, cambios celulares reactivos, degenerativos y displásicos. **Resultados:** Las muestras procesadas con FIPLIQ presentaron resultados similares a los de la prueba convencional de Papanicolaou cuando analizados color y bordes citoplasmáticos mal definidos, estructura de cromatina, presencia o ausencia de diferentes tipos de células y microorganismos, proceso reparativo, pre-neoplásico y alteraciones celulares neoplásicas; las muestras se conservaron hasta 15 días después de la recolección. **Conclusión:** Los resultados preliminares sugieren que el FIPLIQ es adecuado para preparación y preservación de especímenes citológicos hasta 15 días.

Palabras clave: biología celular; frotis vaginal; mucosa bucal; neoplasia intraepitelial cervical; neoplasias glandulares y epiteliales; lesiones precancerosas.

INTRODUÇÃO

O exame convencional de Papanicolaou, amplamente utilizado em estudos populacionais, apresenta limitações quanto à adequação da amostra, do transporte, da preservação, da fixação e da representatividade⁽¹⁻³⁾.

Vários autores apoiam o uso da citologia em base líquida para o teste de triagem cervical, apontando vantagens, como ser menos invasiva e apresentar melhor distribuição celular e esfregaços representativos, com menos resultados falso-negativos. Um aprimoramento na triagem de pacientes de alto risco ao utilizar ensaios moleculares, além da citologia em meio líquido, foi relatado⁽⁴⁻⁸⁾. No entanto, o alto custo da citologia em meio líquido é um fator limitante para seu uso na triagem populacional em larga escala para o câncer do colo do útero⁽⁹⁻¹¹⁾. Dessa forma, é relevante o desenvolvimento de alternativas adequadas e acessíveis que melhorem o método citológico convencional (exame Papanicolaou).

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma solução adequada para a preservação de amostras para exames citológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Fase I

Amostras da mucosa bucal foram coletadas de 10 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 20 e 30 anos, não alcoolistas e não fumantes. A mucosa bucal foi esfoliada com escova de citologia cônica (Kolplast[®], São Paulo, Brasil) e transferida para um tubo Falcon de plástico de 15 ml (Becton Dickinson[®], New Jersey, EUA), contendo 2 ml de teste em meio líquido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob parecer de nº 777.445, de 20 de agosto de 2014. No mesmo dia e após três, cinco e 10 dias de armazenamento à temperatura ambiente, as amostras foram homogeneizadas por 20 s (AP56 Vortex Phoenix, Labor, São Paulo, Brasil) e centrifugadas a 289 × g por 5 min (centrífuga Sigma 4k15). Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento foi ressuspensão em 100 µl de solução de teste e homogeneizado em vórtex. Os esfregaços foram executados pela distribuição de 50 µl do sedimento em lâmina de vidro, circularmente com ponta de pipeta, secos à temperatura ambiente e em seguida fixados com etanol absoluto, por 30 min, corados pelo método de coloração Papanicolaou (Newprov[®], Pinhais, Brasil) e montados com Entellan (Merck[®], Darmstadt, Alemanha). Foram testadas 127 composições diferentes com os seguintes elementos: etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, formaldeído e glutaraldeído

(Tabela 1). Os meios líquidos com solução isotônica de tampão fosfato-salino, pH 7,4 foram avaliados. As lâminas foram analisadas por três citologistas, individualmente. Um mapeamento horizontal sistemático foi realizado utilizando um microscópio óptico (100×, 400×; Nikon E200), de acordo com critérios citomorfológicos bem estabelecidos⁽¹²⁻¹⁶⁾. Após a preservação celular, coloração do núcleo e citoplasma, o agora denominado FIPLIQ (formaldeído 1 ml/dl e isopropanol 1 ml/dl em solução isotônica de tampão fosfato-salino, pH 7,4) foi selecionado para avaliação adicional de celularidade, sobreposição celular, presença de microrganismos e análise de artefatos. Os critérios utilizados para descarte das soluções em meio líquido consideradas insatisfatórias são: cromatina mal definida e distorção significativa na morfologia celular.

Fase II

Amostras cervicais de 20 mulheres com idade entre 19 e 64 anos foram utilizadas para a avaliação da solução selecionada. Para citologia convencional (grupo-controle), foi coletado material da junção escamocolumnar (JEC) com espátula de Ayre, enquanto as células endocervicais com escova cônica (Kolplast®, São Paulo, Brasil). O material foi aplicado em uma lâmina de microscópio e imediatamente fixado em etanol absoluto. Em seguida, o material restante foi transferido para um tubo Falcon de plástico de 15 ml (Becton Dickinson®, New Jersey, USA) contendo 2 ml de solução FIPLIQ. No mesmo dia, e aos três, sete e 15 dias após o armazenamento à temperatura ambiente, as amostras foram processadas em solução de meio líquido como no item anterior. Nessa etapa, a

análise citológica incluiu adequação e qualidade das amostras; tipos e estágios de diferenciação celular observados; presença de microrganismos; e alterações celulares reativas, reparativas, pré-neoplásicas e neoplásicas, estabelecendo comparações entre amostras processadas pelos métodos convencional e em meio líquido.

RESULTADOS

Entre as 127 formulações diferentes testadas com material citológico bucal, foram selecionadas oito formulações em meio líquido que apresentaram os melhores resultados de conservação (**Tabela 2**). O melhor meio líquido nesta fase foi o FIPLIQ, o qual foi testado na fase II com amostras de colo uterino. Nessa fase, a análise das amostras processadas com FIPLIQ apresentou os melhores resultados qualitativos em comparação com o exame de Papanicolaou convencional. Algumas amostras de FIPLIQ apresentaram citólise e células sobrepostas, mas isso não foi suficiente para determinar a não conformidade do método. Em apenas duas amostras com FIPLIQ observou-se obscurecimento por leucócitos polimorfonucleares, determinando suas exclusões (**Tabela 3**). Os tipos de células, microrganismos, alterações celulares reparadoras, degenerativas, pré-neoplásicas e neoplásicas observadas em amostras com FIPLIQ no período de 15 dias de preservação foram similares àquelas observadas na metodologia convencional (**Tabela 4**; **Figuras 1-5**). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as metodologias testadas (teste $z, p = 0,05$).

TABELA 1 – Reagentes testados e relações em diferentes composições de base líquida

Reagentes	Etanol	Metanol	Ácido acético	Isopropanol	Formaldeído	Glutaraldeído
	99,5	1	0,3	80	1	1
Concentração medida (ml/dl)	97			70	0,5	0,5
	95			50	3	
	70			22		
	77			20		
	50			3		
	30			2		
	20			1		
	10					

TABELA 2 – Testes preliminares: avaliação da qualidade citológica do esfregaço de mucosa oral após três dias de preservação

Composições de base-líquida	Núcleo corado	Citoplasma corado	Preservação celular	Sobreposição celular	Artefatos
Formaldeído 1 ml/dl; isopropanol 1 ml/dl; PBS	AS	AS	AS	AI	AS
Etanol 20 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl; isopropanol 1 ml/dl; PBS	AS	AS	AS	AI	AS
Etanol 20 ml/dl; formaldeído 3 ml/dl; isopropanol 1 ml/dl; PBS	AS	AS	AS	AI	AS
Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl; metanol 1 ml/dl; isopropanol 1 ml/dl; PBS	AS	AS	AS	AI	AS
Etanol 10 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl; metanol 1 ml/dl; isopropanol 1 ml/dl; PBS	AS	AS	AS	AI	AS
Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl; metanol 1 ml/dl; isopropanol 10 ml/dl; PBS	AS	AS	AS	AI	AS
Formaldeído 1 ml/dl; isopropanol 20 ml/dl; PBS	AS	AS	AS	AI	AS
FIPLIQ	AS	AS	AS	AS	AS

PBS: solução de tampão fosfato-salino, pH 7,4; FIPLIQ: solução de formaldeído-isopropanol; AS: amostra satisfatória; AI: amostra insatisfatória.

TABELA 3 – Avaliação da adequação e da qualidade das amostras pelo exame de Papanicolaou e pelo FIPLIQ

Parâmetros	Esfregaço de Papanicolaou	FIPLIQ 0 dias	FIPLIQ 3 dias	FIPLIQ 7 dias	FIPLIQ 15 dias
Formato celular	20	20	20	20	20
Preservação celular	20	19	18	19	20
Detalhes da cromatina	20	19	19	19	20
Celularidade	20	20	20	20	20
Citólise	20	19	17	19	19
Sobreposição celular	15	15	19	18	20
Obscurecido por leucócitos PMN	20	18	18	18	18
Obscurecido por hemácias	20	20	20	20	20

Formato celular: sem alterações significativas; preservação celular: características citológicas suficientes para reconhecê-la; detalhes da cromatina: visível; celularidade: suficiente; citólise: sem ocorrência significativa; sobreposição celular: não elevada; obscurecido por leucócitos PMN; obscurecido por hemácias: não mais que 70% da área de esfregaço (n = 20).

FIPLIQ: fosfato de formaldeído-isopropanol; PMN: polimorfonuclear.

TABELA 4 – Alterações reativas, reparativas, degenerativas, pré-neoplásicas e neoplásicas em amostras de células cervicais por Papanicolaou e FIPLIQ, no mesmo dia e após 0, 3, 7 e 15 dias de preservação

Alterações	Exame Papanicolaou	FIPLIQ 0 dias	FIPLIQ 3 dias	FIPLIQ 7 dias	FIPLIQ 15 dias
Policromasia	13	16	15	16	16
Vacuolização citoplasmática	3	3	3	3	3
Halos perinucleares	16	13	10	14	14
Grânulos de cerato-hialina	3	3	3	3	3
Bordas mais externas do citoplasma	9	6	6	8	6
Coilócitos	2	1	1	2	2
Queratose	12	16	11	15	13
Espessamento da margem nuclear	2	5	5	5	4
Cariorrexe	2	2	1	1	1
Aumento nuclear	18	17	17	17	17
Binucleação	10	15	16	15	15
Cariopcnose*	12	12	12	10	12
Núcleos lisados	2	1	2	3	1
Hipercromasia	9	6	8	8	8
Proporção de núcleo/citoplasma aumentada	7	8	8	8	8
Cariomegalia	4	4	4	4	4
Cromatina aglomeradas e com irregularidades	4	2	2	2	2

FIPLIQ: fosfato de formaldeído-isopropanol; *presença de cariopcnose, exceto em células superficiais.

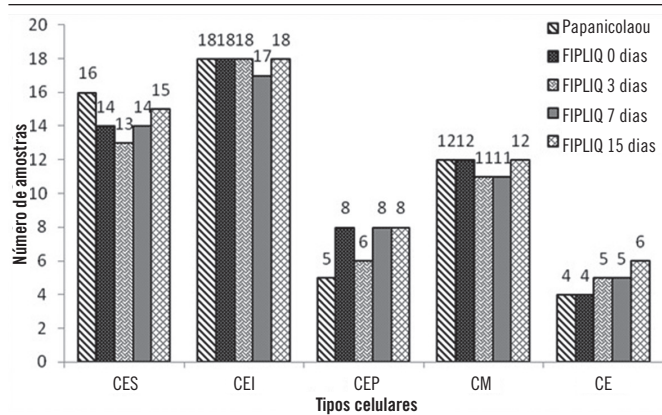


FIGURA 1 – Tipos celulares em amostras cervicais no exame de Papanicolaou e FIPLIQ após 0, 3, 7 e 15 dias de preservação celular

Não houve diferença estatisticamente significativa (teste z, p = 0,05).

FIPLIQ: fosfato de formaldeído-isopropanol; CES: células escamosas superficiais; CEI: células escamosas intermediárias; CEP: células epiteliais parabasais; CM: células metaplásicas; CE: células endocervicais.

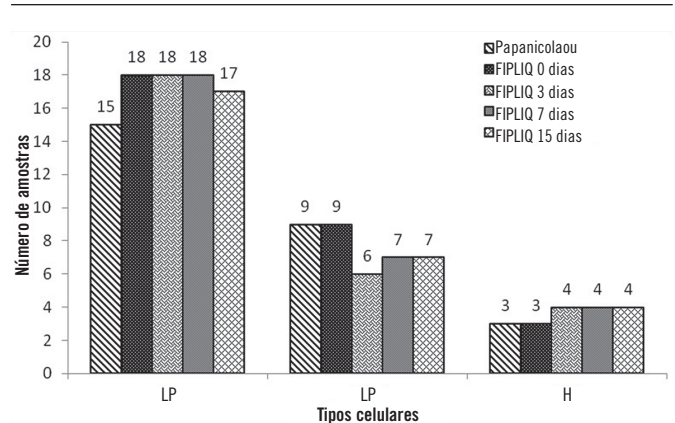


FIGURA 2 – Leucócitos polimorfonucleares, histiócitos e sangue em amostras cervicais de Papanicolaou e FIPLIQ após 0, 3, 7 e 15 dias de preservação celular

Não houve diferença estatisticamente significativa (teste z, p = 0,05).

FIPLIQ: fosfato de formaldeído-isopropanol; LP: leucócitos polimorfonucleares; HIST: histiócitos; H: hemácias.

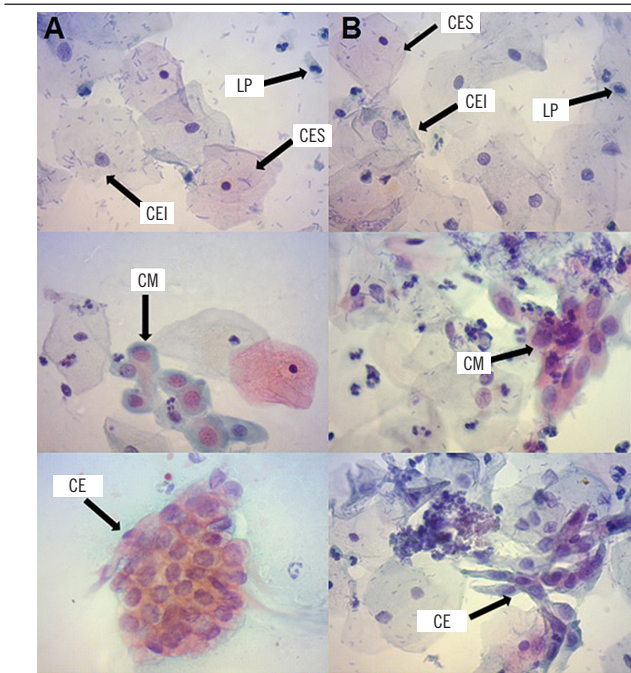


FIGURA 3 – Fotomicrografias de tipos celulares observadas em amostras cervicais por exame de Papanicolaou (A) e preservadas em FIPLIQ após 15 dias (B). Papanicolaou, 400×
 FIPLIQ: fosfato de formaldeído-isopropanol; LP: leucócitos polimorfonucleares; CES: células escamosas superficiais; CEI: células escamosas intermediárias; CM: células metaplásicas; CE: células endocervicais.

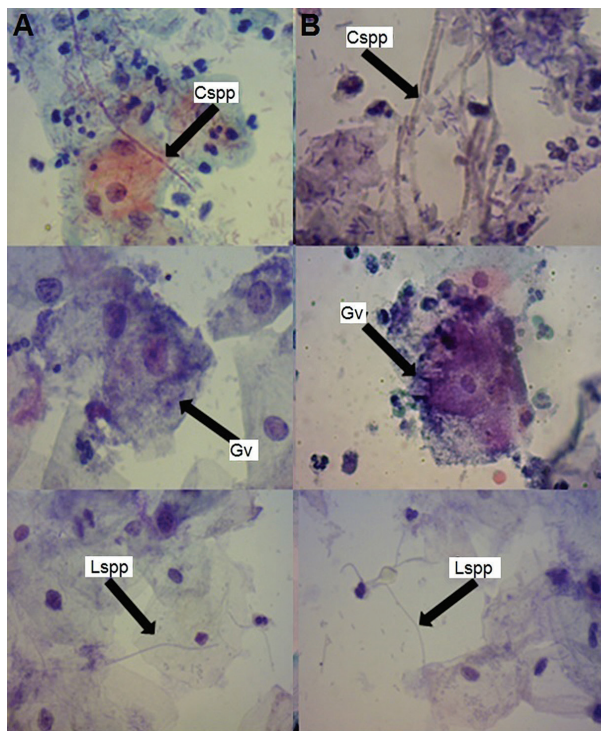


FIGURA 4 – Fotomicrografias de microrganismos observadas em amostras cervicais por exame Papanicolaou (A) e preservadas em FIPLIQ após 15 dias (B). Papanicolaou, 400×
 FIPLIQ: fosfato de formaldeído-isopropanol; Cspp: *Candida spp.*; Gv: *Gardnerella vaginalis*; Lspp: *Leptothrix spp.*

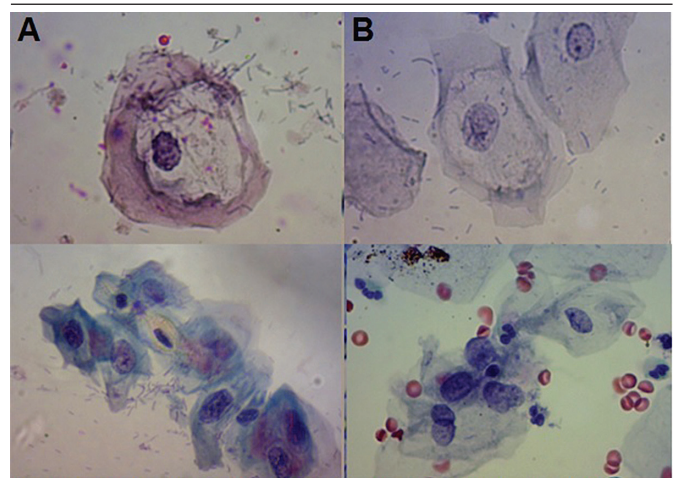


FIGURA 5 – Anormalidades citológicas em células cervicais pelo exame de Papanicolaou (A) e preservadas em FIPLIQ após 15 dias. Papanicolaou, 400×
 FIPLIQ: fosfato de formaldeído-isopropanol.

DISCUSSÃO

A metodologia de Papanicolaou tem sido questionada em alguns estudos que apontam para níveis de sensibilidade dos esfregaços citológicos convencionais com representação inadequada de tipos celulares. A citologia em meio líquido tem sido descrita como uma melhora do esfregaço citológico convencional, pois está relacionada com a qualidade da amostra, além de destacar a possibilidade de exames complementares no material coletado^(1-4, 17-19). Por ser um método mais caro que o exame de Papanicolaou convencional, a implementação da citologia em meio líquido nos sistemas públicos de saúde nos países em desenvolvimento não é viável^(11, 20, 21). Este estudo preliminar procurou desenvolver alternativas mais acessíveis com base no custo. Em testes com o FIPLIQ, o JEC permaneceu intacto em ambas as metodologias, independentemente do tempo de preservação, revelando a adequação da coleta e a conservação morfológica das células. A distinção entre os tipos celulares foi mantida, permitindo sua detecção (Figuras 1-3). A reprodutibilidade entre os métodos que se referem à presença de microrganismos e alterações citológicas também foi estudada (Figura 4). Além disso, a taxa de detecção de anormalidades epiteliais em ambas as preparações foi semelhante (Tabela 2; Figura 5).

Ao comparar as amostras de Papanicolaou e de FIPLIQ, observou-se semelhança em relação à adequação e à qualidade das amostras (Tabela 1). Alguns estudos relatam que a citologia em meio líquido apresentou sensibilidade e especificidade equivalentes aos esfregaços convencionais de Papanicolaou e indicou substancial vantagem da citologia em meio líquido devido à possibilidade de se realizar outros testes com as amostras^(2, 19, 22).

Outros autores, em estudos sobre comparações para o desempenho de amostras citológicas bucais pelo exame de Papanicolaou convencional e em meio líquido, observaram que a sobreposição celular, embora reduzida, não é eliminada pela solução em meio líquido^(22, 23). A preparação de amostras citológicas é difícil de padronizar, considerando a heterogeneidade das amostras coletadas em relação à celularidade e a outros fatores, que podem não estar sob o controle do técnico, tanto no momento da coleta como no processamento das amostras. Neste trabalho, a sobreposição de células foi um inconveniente em alguns casos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o FIPLIQ apresentou similaridade em relação à adequação e à qualidade das amostras quando comparados com os do Papanicolaou. Ele pode ser utilizado para preservação de amostras citológicas da mucosa cervicovaginal por 15 dias com preservação celular e preparação de esfregaços de qualidade. Novos estudos podem investigar a adequação do método a outros tipos de amostras citológicas.

REFERÊNCIAS

- Longatto Filho A, Castelo A, Namiyama GM. Sistema DNA-Citoliq (Dcs): um novo sistema para citologia em base líquida – aspectos técnicos. *DST J Bras Doenças Sex Transm.* 2005; 17: 56-61.
- Singh VB, Gupta N, Nijhawan R, Srinivasan R, Suri V, Rajwanshi A. Liquid-based cytology versus conventional cytology for evaluation of cervical Pap smears: experience from the first 1000 split samples. *Indian J Pathol Microbiol.* 2015; 58: 17-21.
- Taylor S, Kuhn L, Dupree W, Denny L, de Souza M, Wright Jr TC. Direct comparison of liquid-based and conventional cytology in a South African screening trial. *Int J Cancer.* 2006; 118: 957-62.
- Doyle B, O'Farrell C, Mahoney E, Turner L, Magee D, Gibbons D. Liquid-based cytology improves productivity in cervical cytology screening. *Cytopathology.* 2006; 17: 60-4.
- Fremont-Smith M, Marino J, Griffin B, Spencer L, Bolick D. Comparison of the Surepath™ liquid-based Papanicolaou smear with the conventional Papanicolaou smear in a multisite direct-to-vial study. *Cancer Cytopathol.* 2004; 102: 269-79.
- Karnon J, Peters J, Platt J, Chilcott J, McGoogan E, Brewer N. Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess.* 2004; 20: 1-78.
- Mendéz MT, Izquierdo AF. Detección de virus papiloma humano (HPV) a partir de muestras celulares de cuello uterino em base líquida. Correlación com la inmunoreactividad de la proteína p16ink4a. *Invest Clin.* 2011; 52: 3-14.
- Whitlock EP, Vesco KK, Eder M, Lin JS, Senger CA, Burda BU. Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2011; 155: 687-97.
- Guo J, Cremer M, Maza M, Alfaro K, Felix JC. Evaluation of a low-cost liquid-based pap test in rural el salvador: a split-sample study. *J Low Genit Tract Dis.* 2014; 18: 151-5.
- Jager P, Singh E, Kistnasamy B, Bertram MY. Cost and cost-effectiveness of conventional and liquid-based cytology in South Africa: a laboratory service provider perspective. *S Afr J Obstet Gynaecol.* 2013; 19: 44-8.
- Machado JP, Nascimento AJ, Leonart MSS. Citologia em meio líquido para exame de citologia cérvico-vaginal. Estudo comparativo sobre a atividade fixadora de etanol e de formaldeído. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2008; 67: 148-55.
- Cibas ES. Cervical and vaginal cytology. In: Cibas ES, Ducatman BS, editors. *Cytology: diagnostic principles and clinical correlates.* 4 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2014. pp. 1-58.
- Abdul-Karim FW, Powers CN, Berek JS, et al. Atypical squamous cells. In: Solomon D, Nayar R, editors. *The Bethesda system for reporting cervical cytology.* 2 ed. New York: Springer Science; 2004. p. 123-56.
- Henry M, Keer SE. Benign proliferative reactions, intraepithelial neoplasia and invasive cancer of the uterine cervix. In: Bibbo M, Wilbur D, editors. *Comprehensive cytopathology.* 4 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2015. pp. 119-65.
- Koss LG, Melamed MR. The normal female genital tract. In: Koss LG, Melamed MR, editors. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases.* 5 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 2006. pp. 183-226.
- Wright TC, et al. Epithelial abnormalities: squamous cells. In: Solomon D, Nayar R, editors. *The Bethesda system for reporting cervical cytology.* 2 ed. New York: Springer Science; 2004. pp. 89-121.
- Beerman H, van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population – Based Cervical Cancer Screening Program. *Gynecol Oncol.* 2009; 112: 572-6.
- Hutchinson ML, Zahniser DJ, Sherman ME, et al. Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening. *Cancer.* 1999; 87: 48-55.
- Zhu J, Norman I, Elfgren K, et al. A comparison of liquid-based cytology and Pap smear as a screening method for cervical cancer. *Oncol Rep.* 2007; 18: 157-60.
- Caetano R, Vianna CMM, Thuler LCS, Girianelli VR. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. *Physis.* 2006; 16: 99-118.
- Hughes AA, Glazner J, Barton P, Shlay JC. A cost-effectiveness analysis of four management strategies in the determination and follow-up of atypical squamous cells of undetermined significance. *Diagn Cytopathol.* 2005; 32: 125-32.

22. Dias EP, Milagres A, Santos JB, Valladares CP, Souza ACB, Pinheiro RS. Comparative study of oral smears applying liquid-based cytology and conventional cytopathology. *J Bras Patol Med Lab.* 2008; 44: 25-9.

23. Navone R, Burlo P, Pich A, et al. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology.* 2007; 18: 356-60.

AUTOR CORRESPONDENTE

Michelli Aparecida Bertolazo da Silva  0000-0003-2457-4773
e-mail: michelli.bertolazo@yahoo.com.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.