

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA EXPRESSÃO COILOCÍTICA EM DIFERENTES GRAUS DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL.

ARTIGO ORIGINAL

Autores: Amanda Carvalho Garcia¹, Maria Tereza Barros Shutz², Luiz Martins Collaço³

RESUMO: A maioria das lesões neoplásicas que acometem o colo uterino tem o seu surgimento na zona de transformação. Vários estudos clínicos, microscópicos e epidemiológicos foram realizados dados ao acesso à cérvix e ao desenvolvimento de um epitélio displásico anormal e da possível infecção viral pelo HPV (*Papilomavírus Humano*). A neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) depende da diferenciação e maturação do epitélio, pois na NIC I as anomalias nucleares permanecem limitadas ao terço inferior e apresentam coilocitose, já a NIC II e NIC III a desorganização arquitetônica é limitada da metade inferior do epitélio com figuras atípicas de mitoses. Alterações de efeito citopático do HPV na célula hospedeira são os coilócitos cuja prevalência é maior na NIC I e que na maioria das vezes decorre da infecção pelos tipos virais 6 e 11, os quais não se integram no genoma da célula hospedeira. Ao contrário dos HPVs tipos 16 e 18 que além de interagirem com o DNA da célula infectada produzem oncoproteínas E6 e E7 que bloqueiam o ciclo celular levando a lesões mais graves NIC II e NIC III. O objetivo deste estudo é a avaliação histológica da expressão coilocítica em diferentes graus de neoplasia intra-epitelial cervical. A metodologia baseou-se na quantificação dos coilócitos em campo de grande aumento 40x dos casos a serem analisados seqüencialmente, com diagnóstico de NIC nos diferentes graus. Portanto, concluímos que a NIC III é estatisticamente diferente dos outros dois NIC I e NIC II que por sua vez não são diferentes.

Descritores: EXPRESSÃO COILÓCITICA; EPITÉLIO; HPV; NIC.

¹ Graduada em Bacharel em Biomedicina das Faculdades Integradas do Brasil (UNIBRASIL). Endereço: Rua Konrad Adenauer, nº 442, Tarumã, CEP: 82821-020, Curitiba, PR, Brasil. Tel: (41) 3015-6977 e-mail: Amanda.ufpr@gmail.com

² Graduada em Bacharel em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (1970), mestrado em Farmacologia pela Universidade Federal de São Paulo (1979) e doutorado em Fisiologia Humana pela Universidade de São Paulo (1988).

³ Professor Adjunto do Departamento de Patologia Médica da UFPR; Mestre em Medicina pela UFPR Curso de Doutorado em Medicina Interna (2000 a 2002) – UFPR; Curso de Pós-Doutorado em Citopatologia – UFPR; Especialização em Punção Aspirativa por Agulha Fina - Instituto Karolinska- Estocolmo-Suécia

ABSTRACT

HISTOLOGICAL EVALUATION OF EXPRESSION IN DIFFERENT DEGREES COLOICITICA OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

Most neoplastic lesions that affect the cervix has its onset in the transformation zone, whose area is the of great interest to colposcopists. Several clinical studies, microscopic and epidemiological investigations have been conducted since access to the cervix and the development of an abnormal dysplastic epithelium and possible viral infection by HPV (Human Papillomavirus). CIN (cervical intraepithelial neoplasia) depends on the differentiation and maturation of the epithelium; CIN I as in the nuclear abnormalities remain limited to the inferior and have Koilocytosis already CIN II and CIN III is limited to architectural disorganization of the lower half of the epithelium with atypical mitotic figures. Changes in the cytopathic effect of HPV in host cells which are koilocytes higher prevalence of CIN I, which most often caused by infection with types 6 and 11, which remain outside the host cell genome. Unlike HPV types 16 and 18 that besides interacting with the DNA of the infected cell producing E6 and E7 oncoproteins that block the cell cycle leading to more severe lesions CIN II and CIN III. The aim of this study is the histological evaluation of the expression koilocytes in different degrees of cervical intraepithelial neoplasia. The methodology was based on the quantification of koilocytes 40x high power field of cases to be analyzed sequentially, with CIN in different degrees. Therefore, we conclude that CIN III is statistically different from the other two CIN grades I and II which in turn are not different

Keywords: EXPRESSION KOILOCYTES; EPITHELIUM; HPV, CIN.

INTRODUÇÃO

A maioria das lesões neoplásicas que acometem o colo uterino tem o seu surgimento na zona de transformação, que geralmente corresponde à junção escamocolunar. Esta área é de grande interesse para colposcopistas devido a eventuais processos patológicos que levam ao desenvolvimento do câncer do colo uterino. Ao longo dos anos, sabe-se que as lesões precursoras do câncer cervical é uma displasia que pode ser leve, moderada e acentuada em virtude dos avanços de estudos clínicos, microscópicos e epidemiológicos. ^(1, 2, 3, 4)

O rastreamento nos últimos 50 anos utilizando a técnica de Papanicolaou feito em populações monitoradas apresentou uma redução de 99% na incidência do câncer do colo uterino. ⁽⁴⁾ Estima-se no Brasil que entre os 20.000 casos que surgem há mais de 3.000 óbitos por câncer cervical. ⁽¹⁷⁾

Quando Richart descreveu Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) em 1967 para classificar as atipias celulares respeitando o limite do epitélio, pensava-se que a displasia independente do grau de diferenciação poderia evoluir para carcinoma *in situ* (CIS) e carcinoma invasor. ^(3, 4) Acredita-se hoje, que há grande possibilidade do grupo das diferentes NIC que algumas regridem espontaneamente ou permanecem estáveis por tempo indeterminado e há pequena chance de progredir para carcinoma invasor. Sabe-se também que a lesão de baixo grau tem estimativa de até 80% de regressão. ⁽¹⁶⁾

O sistema Bethesda propôs em 1988 duas categorias citológicas de classificação no que diz respeito às alterações de atipias celulares do epitélio da cérvix, ressaltando o grau de acometimento da mesma. Sendo assim, algo que era antes classificado como displasia leve ora passou a ser considerado como lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (NIC I - Condiloma), e as displasias moderada e acentuada passaram a ser denominadas lesões intraepiteliais de alto grau (NIC II e NIC III – *Carcinoma in situ*). Na histopatologia essas lesões pré-cancerosas que acometem o colo uterino têm como característica o grau de diferenciação, maturação e estratificação das células em relação à espessura do epitélio da amostra tecidual cervical. Desta forma, a proporção da espessura das células maduras e diferenciadas do epitélio é de critério significativo para a classificação da NIC. ^(1, 2, 4, 5, 6, 7)

A análise microscópica das anomalias nucleares leva em consideração a maior diferença da razão núcleo anisocariose citoplasma, a presença de núcleo aumentado, diferença do tamanho do núcleo, coloração mais intensa (hipercromasia) e polimorfismo nuclear. Devido à espessura do epitélio em maturação e o estágio da anomalia nuclear estão correlacionados. No epitélio normal as mitoses não são visualizadas com muita frequência em células superficiais, e menos ainda em células parabasais. Na NIC é possível visualizar figuras de mitoses nas diferentes camadas, superficial, de acordo com o grau, resultado da diminuição da diferenciação do epitélio resulta no aumento da divisão celular. ^(3,7)

Na análise histopatológica o coilócito é uma alteração celular provocada na infecção pelo HPV. ⁽¹⁵⁾ Richard em 1990 propôs um aperfeiçoamento na identificação dos coilócitos, que já haviam sido definidos em 1946 por Koss e Durfee, como sendo células atípicas que expressam em seu citoplasma celular halos perinucleares com núcleos volumosos e hipercromáticos com citoplasma na periferia da célula. ⁽³⁾ **(Figura 1).**

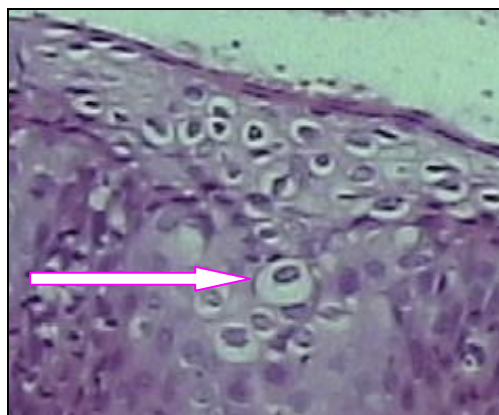
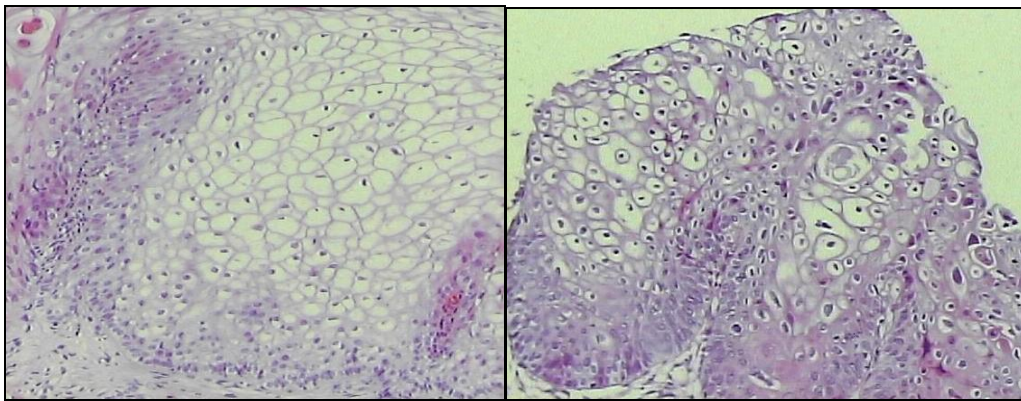


Figura 1- Representa biópsia de colo uterino: coilócito indicado pela seta. (do autor)

A maioria das NIC I em biópsia cervical apresenta células diferenciadas limitadas ao terço inferior do epitélio com anomalias nucleares e pouca mitose, com uma significativa expressão de coilocitos. (**figura 2**). Estas alterações celulares são sugestivas de infecção pelo *papilomavírus humano* (HPV). A ação do vírus HPV na célula hospedeira é chamada de efeito citopático, ou seja, ocorre a degeneração da célula, devido à integração do DNA viral do hospedeiro ao núcleo da mesma provocando a lise citoplasmática ou permanecer na forma epissomal sem a combinação com o genoma. Contudo podendo ocorrer a desregulação do ciclo celular e a possível progressão da lesão. (6, 8, 9, 3, 7)



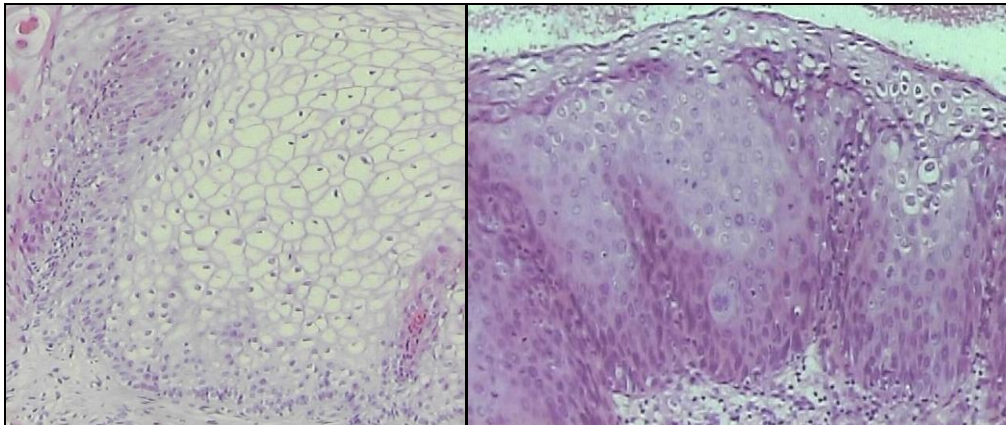
Normal

NIC I

Figura 2- Representa a biópsia de colo uterino: observe o aspecto normal do epitélio escamoso comparado com NIC I – desorganização da estrutura do epitélio no terço inferior acompanhado por figuras de mitoses atípicas e coilocitose. (do autor)

Já a lesão intraepitelial cervical de alto grau é caracterizada por lesões de acentuadas, alterações no aumento na relação núcleo/citoplasma em células não maduras que se observando menor diferenciação nas células em dois terços do epitélio. (6, 3) Na microscopia óptica é possível visualizar o núcleo e o citoplasma polimórficos com acentuada desorganização arquitetônica devido a várias mitoses ocasionadas. (6, 1)

Na histologia de NIC II é observada arquitetura desorganizada de células displásicas limitadas metade inferior do epitélio com figuras de mitoses e coilocitose. Acompanhada de alterações de paraqueratose superficial e hiperplasia de células parabasais. ⁽⁷⁾ **(figura 3)**



Normal

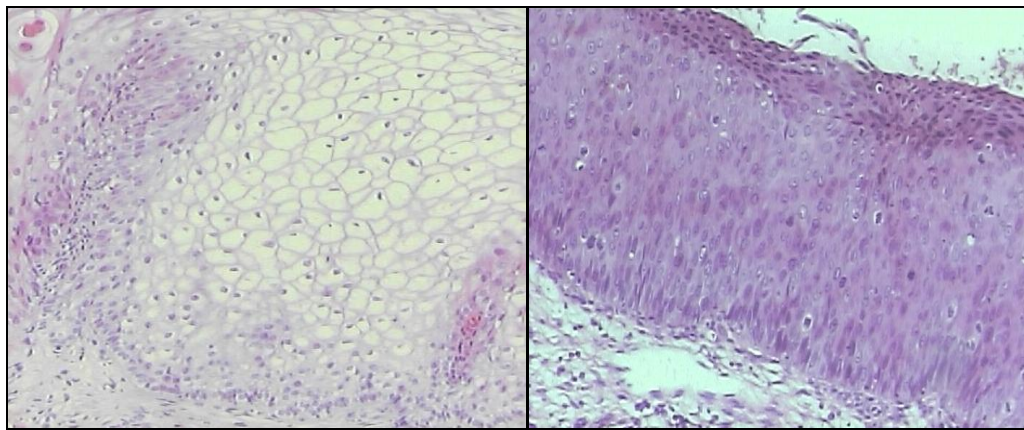
NIC II

Figura 3- *Representa a biópsia de colo uterino: observe o aspecto normal do epitélio escamoso comparado com NIC II – desorganização da estrutura do epitélio em dois terços inferior acompanhado por figuras de mitoses atípicas e coilocitose. (do autor)*

A NIC III apresenta um alto grau de anomalias nucleares e citoplasmáticas com menor diferenciação e estratificação em quase toda espessura do epitélio. São visualizadas anomalias de mitoses com freqüências. **(figura 4)**. ⁽⁷⁾

As lesões acentuadas do epitélio escamoso constituem uma variação no acometimento do tamanho de suas células no diz respeito à diferenciação citoplasmática e nuclear, por sua vez, pode-se visualizar lesão em células médias, grandes e até pequenas. ^(6, 3)

Há uma possibilidade variável de uma possível progressão de um grau menor no caso a NIC I para um grau maior NIC II ou para NIC III. ⁽⁵⁾



Normal

NIC III

Figura 4 – Representa a biópsia de colo uterino: observe o aspecto de um epitélio escamoso normal comparado com NIC III – desorganização da estrutura do epitélio no terço superior acompanhado de células atípicas com perda de diferenciação celular. (do autor)

A associação do HPV com as lesões pré-cancerosas que afetam o colo uterino é alvo de vários estudos epidemiológicos e de análise laboratorial. ⁽¹⁰⁾ Sabe-se hoje que existem mais de 100 tipos diferentes do vírus HPV, sendo assim sugere-se a hipótese de possíveis 30 tipos propensos ao tropismo do epitélio escamoso cervical. ⁽¹¹⁾ Dentre a variedade dos sorotipos virais os HPVs de baixo risco como, por exemplo, 6, 11, 42, 44, 70 e 81 estão relacionados à lesão intraepitelial cervical e a verrugas elevadas ou planas de critério benigno. Já os tipos virais de HPVs de alto risco como, por exemplo, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 81 são considerados carcinogênicos, sendo a principal causa do desenvolvimento do câncer do colo uterino. Principalmente os tipos 16 e 18 possuem uma capacidade de produzir oncoproteínas, as quais impedem a maturação e diferenciação do epitélio escamoso metaplásico correspondentes a zona de transformação. ^(12, 13, 11, 14)

Quando o ciclo celular é afetado pelo vírus do HPV através de microlesões no epitélio da mucosa cervicovaginal, as partículas virais infectam as células basais, as quais são responsáveis pela renovação do tecido epitelial, ocorrendo à retificação e ativação do DNA viral na célula hospedeira, acarretando a replicação clonal. Esta proliferação celular é regulada por meio de proteínas L1 e L2 (proteínas do capsídeo viral) que proporcionam a propagação de partículas virais expressas nas lesões de baixo grau de superfície de caráter condiloma (verrugas). Já a área de replicação viral E1 interage com a E2 responsável pela transcrição da partícula viral, codifica as oncoproteínas E6 e E7 que atuam na proliferação celular. Essas proteínas oncogênicas inibem os genes supressores de tumor p53 e Rb significando o desenvolvimento de um epitélio displásico anormal, ou seja, alterações na espessura do epitélio das células maduras e diferenciadas. (5, 13, 7, 3, 15, 17)

Desta forma, o principal objetivo desta pesquisa foi avaliar a expressão coilocítica em diferentes graus de NIC, ou seja, caracterizar a distribuição da expressão de coilócitos nas lesões pré-neoplásicas que acometem colo uterino devido à infecção pelo HPV e com isso contribuir para uma melhora no processo de diagnóstico de NIC I, NIC II, NIC III.

METODOLOGIA

Casuística

Esta pesquisa consistiu em fazer um levantamento de 60 casos no arquivo de lâminas de pacientes que apresentaram diagnóstico histopatológico de neoplasia intra-epitelial cervical na NIC I, NIC II, NIC III, através do sistema de laudos do computador do Laboratório de Citopatologia e Anatomia Patológica – Annalab, no período entre 2008 e 2009. Realizar a quantificação da expressão coilocítica nos diferentes graus de NIC, na microscopia óptica.

Os 60 casos distribuídos por 20 casos NIC I, 20 NIC II e 20 NIC III, foram analisados pela padronização da objetiva do microscópio para o campo de grande aumento (40x) e determinamos 10 campos nos quais foram feitas a contagem de coilócito para todos os casos estudados. Os dados foram tabulados em uma planilha no sistema Excel do computador, posteriormente e utilizamos esses dados no Software para análise estatística da expressão coilocítica em diferentes graus de NICs.

Amostra – Procedimento Histopatológico

A amostra utilizada nesta pesquisa é lâminas biópsias de colo uterino e de produto de histerectomia do útero, que se encontravam no arquivo de lâminas do laboratório. O processamento histológico do material bióptico são as seguintes etapas: análise macroscópica do anatomopatológico, preparo do tecido pelo aparelho autotécnico, o qual contém bateria de cinco cubas de álcool absoluto, três cubas de xilol e duas cubas de parafina, por sua vez, são acondicionadas no aparelho histocente para inclusão em bloco de parafina e posteriormente é feito o corte de cada bloco no micrótomo de aproximadamente quatro micras de espessura para extrair o fio do material, que é fixado na lâmina após o banho-histológico com água quente, logo depois passa pela bateria de coloração de HE (hematoxilina e eosina) é feito a montagem com lamínula e uma ou duas gotas de balsamo do Canadá, para a leitura na microscopia pelo patologista. ⁽²⁰⁾

Análise estatística

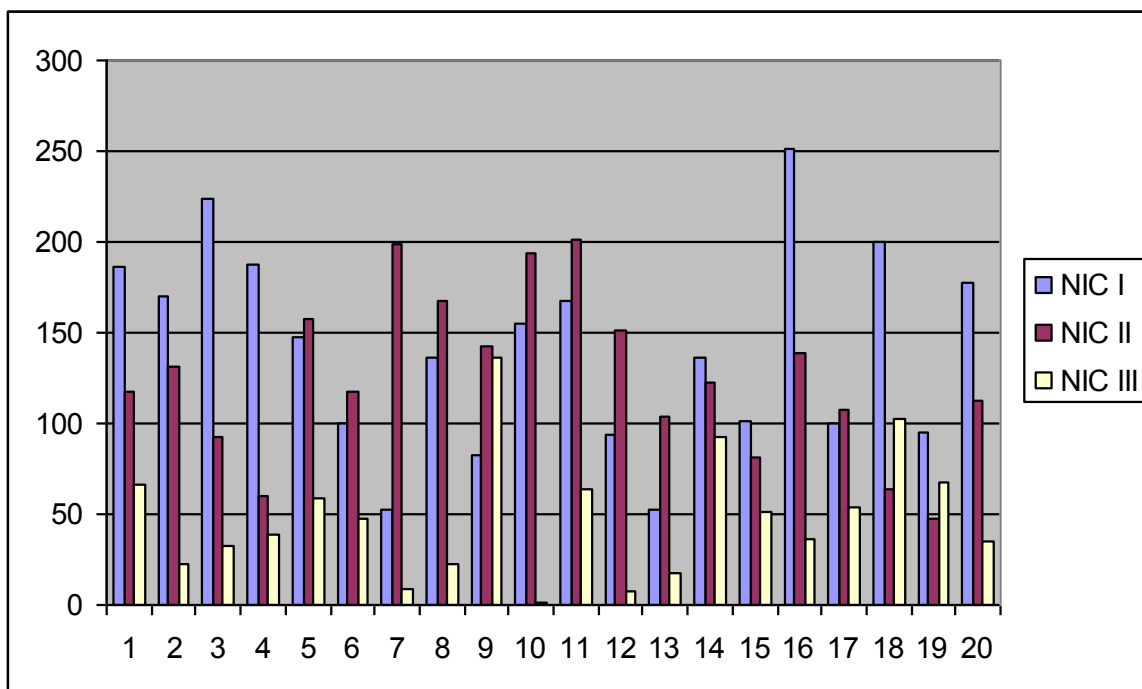
Para verificar o nível de diferença estatisticamente significativa entre as diferentes amostras utilizamos o teste de Análise da Variância (ANOVA) para comparar a diferença entre as a expressão de coilócito em NIC I, NIC II, NIC III, por

sua vez, para concluirmos a existência da diferença significativa entre as NICs, foi feito o teste F de Takey, ^(18, 19) para a magnitude desta diferenças.

RESULTADOS

Os dados referentes ao somatório do número de colócitos dos 10 campos padronizados que foram contados para as 20 amostras de NIC I, NIC II, NIC III, de acordo com a **Figura 5**.

Representa-se a coordenação de informações quantitativas em dois eixos perpendiculares; no eixo das abscissas os 20 de casos da NIC I, NIC II e a NIC III e nas ordenadas à variação da magnitude da quantificação feita nos 10 campos padronizados das amostras estudadas. Pode-se observar que a barra da NIC I em lilás apresenta uma magnitude maior em comparação às barras de NIC II em vermelho e NIC III em amarelo.



Microsoft Office Excel 2003

Figura 5- Somatório do número de colócitos dos 10 campos padronizados nas 20 amostras de NIC I, NIC II e NIC III.

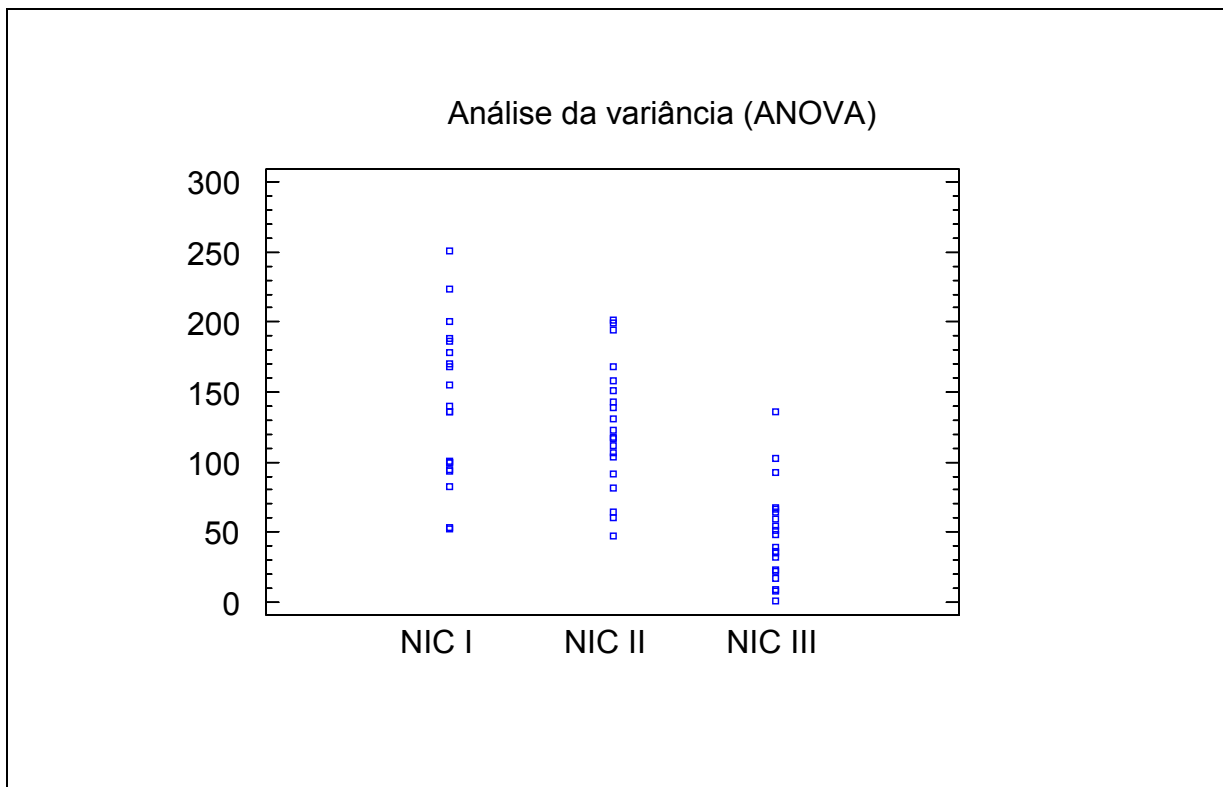


Figura 6 – representa análise da variância de NIC I, NIC II e NIC III em relação ao número de coilocitos.

A (**Figura 6**) mostra a distribuição das diferentes amostras três grupos NIC I, NIC II, NIC III pela análise da variância (ANOVA) ⁽¹⁹⁾. Estes resultados apresentaram um $F(2,57) = 5,6$ com $p = 0,0000$ que é menor 0,05% o que nos permite inferir que há diferenças estatisticamente significativas entre as amostras NIC I, NIC II e NIC III são diferentes.

Já com o valor de F da análise da variância significativo, por sua vez, aplicou-se o teste de comparação múltipla de Takey HSD ^(18, 19), o qual mostrou que NIC III é estatisticamente diferente representado na (**Figura 7 e 8**) dos outros dois NIC I e NIC II que por sua vez não são diferentes (**Figura 9**).

Lembrando que o teste de Takey é utilizado para comparação de duas médias em análise ^(18, 19), neste caso compararam-se as média de NIC I e NIC III; NIC II e NIC III; e NIC II e NIC I.

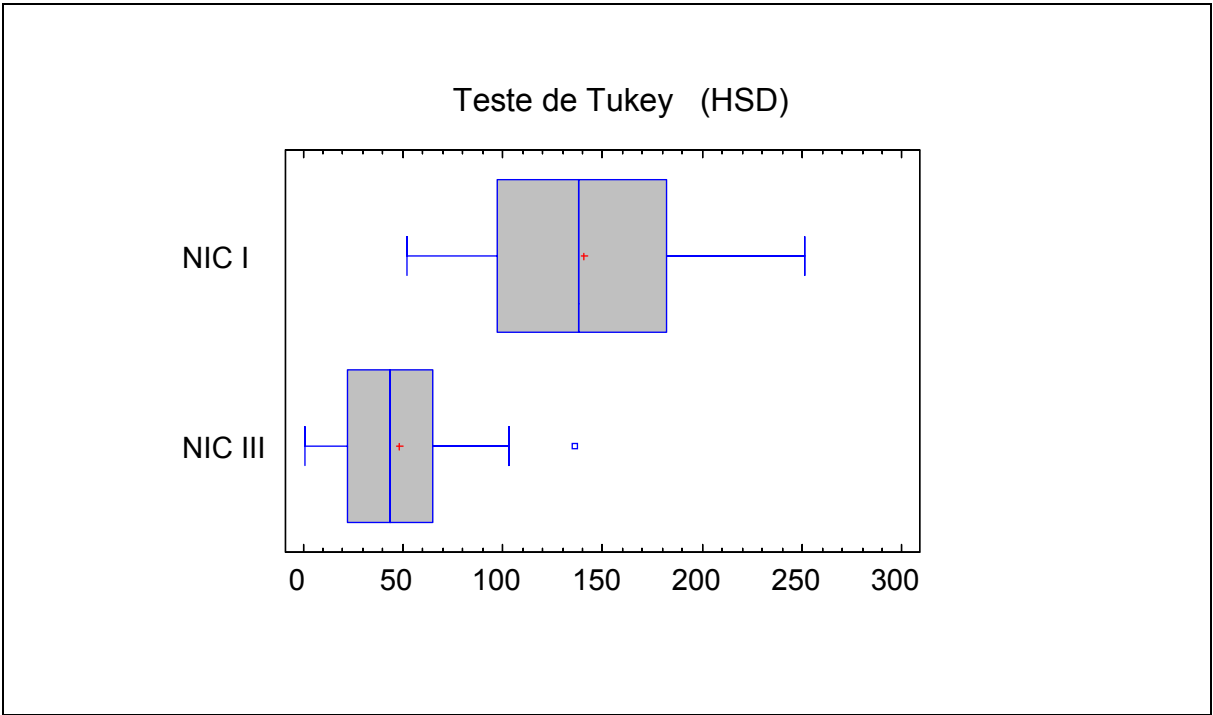


Figura 7 - Resultado do teste de Tukey (HSD): comparação da média de NIC I com NIC III em relação ao número de coilocitos.

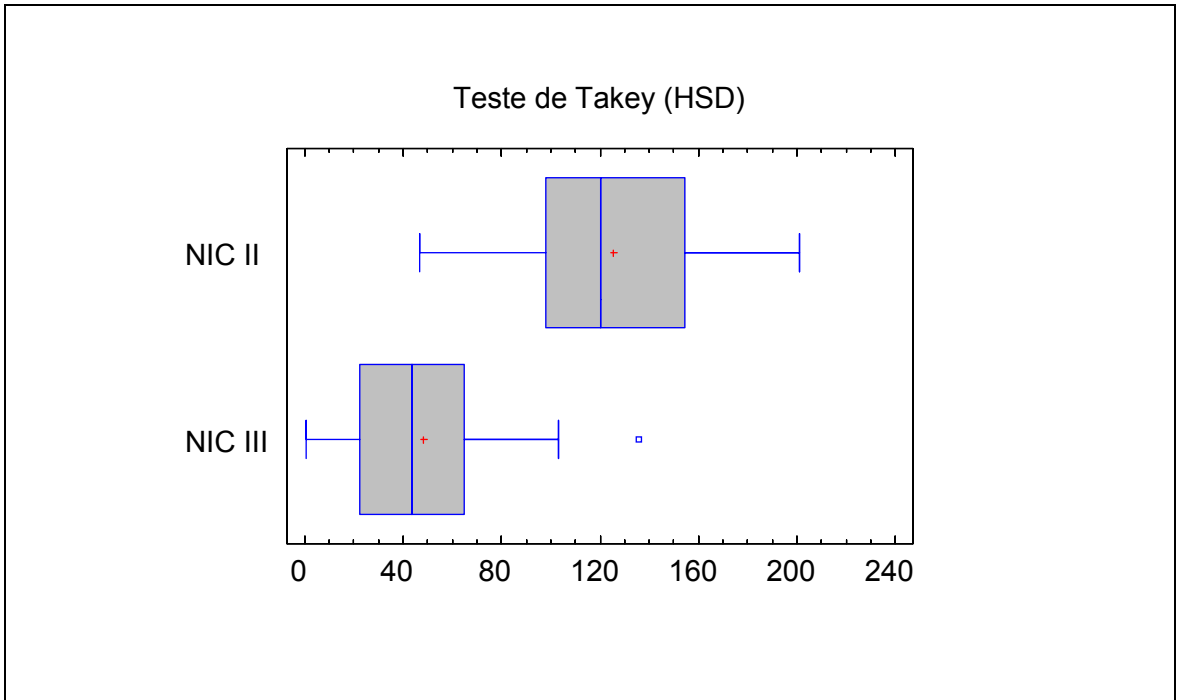


Figura 8 - Resultado do teste de Tukey (HSD): comparação da média de NIC II com NIC III em relação ao número de coilocitos.

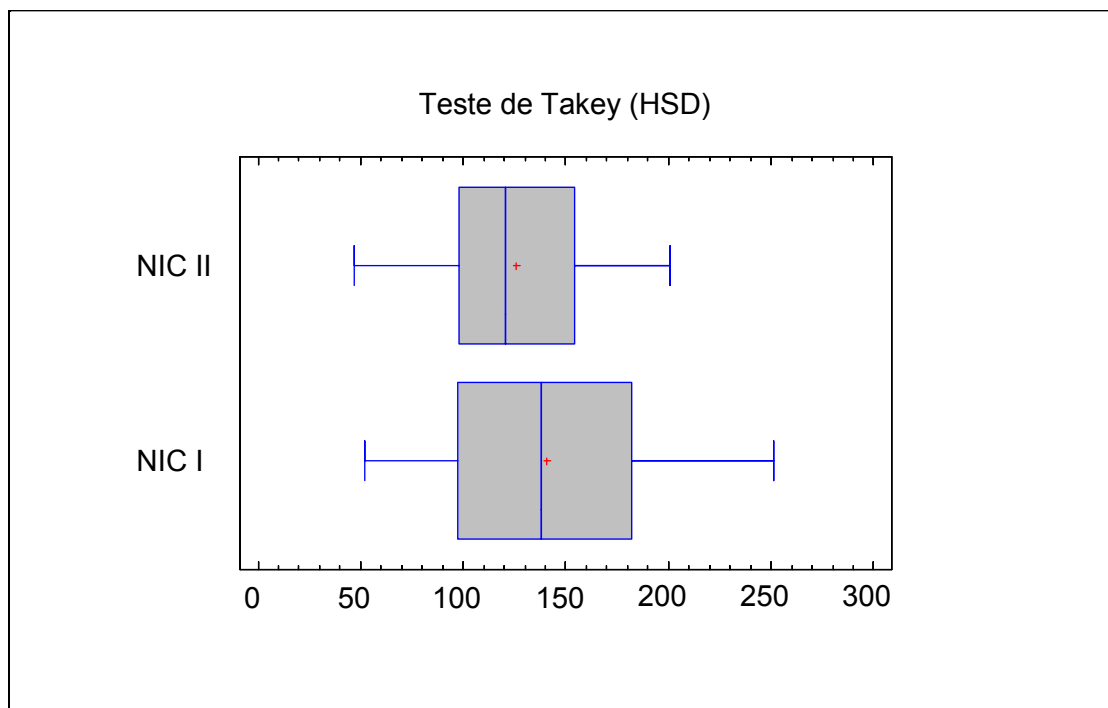


Figura 9 - Resultado do teste de Tukey (HSD): comparação da média de NIC II com NIC I em relação ao número de coilócitos.

DISCUSSÃO

A expressão de coilócitos em diferentes graus de NIC foi determinada pela quantificação dos 20 casos de diferentes graus de NIC, para isso, fizemos o somatório do número de coilócitos dos 10 campos padronizados das receptivas amostras, as quais apresentaram diferença entre as suas magnitudes, cuja barra de NIC I em vermelho constitui o número maior de coilócitos em relação à NIC II e NIC III na **Figura 5**.

Já a análise da variância (ANOVA) ⁽¹⁹⁾ com valor de $F(2,57) = 5,6$ e $p = 0,0000$ que é menor 0,05%, mostrou que há diferença significativa entre as médias das amostras analisadas na **Figura 6**. Para isso, aplicamos o teste de comparação múltipla de Tukey HSD ^(18, 19) para o presente estudo, o resultado desta

comparação das médias de NIC I para NIC III mostrou que há a diminuição da quantidade de coilócitos simbolizados pelos sinais positivos em direção ao eixo da abscissa na **Figura 7**. Portanto, quanto maior é a desorganização da estrutura do epitélio há menor intensidade da expressão coilocítica ^(6, 3).

Isto é também visível na diminuição da quantidade de coilócito de NIC II para NIC III onde a um grau de significância vista pela magnitude do Box de ambos na **Figura 8**, pois esta distância pressupõe a hipótese de que NIC III não deveria estar classificado como displasia acentuada separado de NIC II, por ser uma lesão intra-epitelial de alto grau que apresenta grande desorganização da estrutura do epitélio no terço superior acompanhada de células atípicas com perda de diferenciação celular ^(6, 3).

Portanto, o resultado da comparação da média NIC II com NIC I, que apresentou através do teste de Takey que não há diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos, devido à equivalência das médias no eixo da ordenada representada por NIC I e NIC II em relação ao número de coilócitos no eixo da abscissa vistas na **Figura 9**. Embora se saiba que estas lesões precursoras de câncer do colo útero estão classificadas como displasia leve e moderadas (5, 13, 7, 3, 15, 17), elas não apresentam diferença na quantidade de coilócitos. Porém, poder constar na mesma classe de classificação de lesões de baixo grau é uma hipótese relevante.

Contudo, a NIC II é classificada como displasia moderada junto com a displasia acentuada NIC III e estatisticamente diferente dos outros dois NIC I e NIC II que por sua vez não são diferentes.

CONCLUSÃO

Os resultados de nosso estudo revelaram que não há uma diferença estatisticamente significativa entre em NIC I para NIC II, haja vista que ambas não estão na mesma classificação do que diz respeito à displasia leve e moderada, mas quando se trata de NIC I ou NIC II para NIC III existe estatisticamente uma diminuição na expressão dos coilócitos com o aumento do grau da lesão.

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar ao meu Deus pela sabedoria do Espírito que me concedesse e aos meus Pastores pelas orações, aos meus pais pela formação do meu caráter, pelos mestres ao meu Orientador Dr. Luiz Martins Collaço, Co-orientadora Maria Tereza Barros Shustz, e aos sábios Dr. Ana Cristina Sobral, Dr. Joel Takashi Totsugui, Sonia Isoldi Marty Gama Müller Departamento de Estatística do Setor Ciências Exatas Universidade Federal do Paraná, Anselmo Chaves Neto do Departamento de Estatística – UFPR.

Faço um agradecimento especial a Cláudia Piazzetta Pinto do Laboratório de Citopatológica e Anatomia Patológica – Annalab pela colaboração em disponibilizar que a pesquisa fosse realizada no laboratório.

REFERÊNCIAS

1. TOTSUGUI, J. T. Avaliação do programa do câncer ginecológica do Estado Paraná. Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica – Setor de Ciências da Saúde, UFPR; 1999. p.11-13.

2. ZEFERINO, L. C.; BEDONE, A. J.; FAÚDES, A.; OYAKAWA, N. Duração da Neoplasia Intra-Epitelial e do Carcinoma Invasor do Colo Uterino: Estudo Epidemiológico. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v. 27 n. 10, p. 607-612, out. 2005.
3. KOSS, L. G.; GOMPEL, C. Introdução a Citopatologia Ginecológica com correlações Histológicas e Clínicas. São Paulo: Roca; 2006. p. 84-99.
4. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N.; Robbins – Patologia Básica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 782-784.
5. MICHELIN, M. A.; OLIVEIRA, H. S.; MURTA, E. F. C.; Resposta imune nas lesões intra-epiteliais do colo uterino. *Femina*, v. 36, n. 1, p. 8-12.
6. SOLOMON, D.; NAYAR, R.; Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. p. 90-99.
7. SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes. Washington, D.C.: OPS; 2004. p.1-12.
8. JORDÃO, A. V.; RUGGERI, L. S.; CHIUCHETA, G. I. R.; SÉRGIO, P.; CONSOLARO, M. E. L.; Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 39 n. 1, p. 81-89, 2005.
9. SARIAN, L. O. Z.; SANTOS, A. L. F.; DERCHAIN, S. F. M.; FIGUEREIDO, O. S.; MORAIS, S. S.; Carga viral do Papilomavírus na predição da gravidade de lesões cervicais em mulheres com atipias celulares na colpocitologia oncológica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v. 25 n. 5, p. 365-370, jun. 2003.

10. MURTA, C. F. E.; LOMBARDI, W.; SOUZA, L. S. B. M. A. H.; ADAD, S. J. Freqüência da Infecção pelo Papilomavírus Humano em mulheres com Ectopia Cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 21, n. 8, p. 441-445.
11. RODRIGUES, A. D.; CANTARELLI, V. V.; FRANTZ, M. A.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F. S. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, p. 457-462, dez. 2009.
12. ANSCHAU, F.; SCHMITT, V. M.; GONÇALVES, M. A. G.; GARICOCHEA, B. Associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 a as lesões pré-malignas e malignas cervicais. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v.27, n. 10, p. 607-612, out. 2005.
13. NOMELINI, R. S.; BARCELOS, A. C. M.; ADAD, S. J.; MURTA, E. F. C. Prevenção do câncer de colo uterino: testes biomoleculares para HPV. *FEMINA*, v. 35, n. 5, p. 295-298.
14. SILVA, T. T.; GUIMARÃES, M. L.; BARBOSA, M. I. C.; PINHEIRO, M. F. G.; MAIA, A. F. Identificação de tipos de papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 5, p. 285-291, maio. 2006.
15. CRUM, C. P.; CIBAS, E.; LEE, K. R. Pathology of early cervical neoplasia – Comtemporay issues en surgical pathology. United States of America: Churchill Livingstone 1997; p. 22-12.
16. POTH, C. M. *Fisiopatologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 975-976.
17. SAMUEL, R. A. *Citologia Cérvico-Vaginal, Passo a Passo: Atlas fotográfico com mais de 690 imagens*. 1 ed. Curitiba, PR: Associação Paranaense de Patologia APP, 2010, p. 119-139.

18. KAZMIER, L. J. Estatística Aplicada á Economia e Administração: 683 Problemas Resolvidos. São Paulo: Schaum McGraw-Hill, 1982; p. 218-234.
19. STEVENSON, WILLIAM J. Estatística aplicada á administração. São Paulo: Harbra, 2001; p.253-270.
20. Manuel Técnico do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatológica – Annalab: versão 08; 2010; p. 12-25.