

Utilidad de la luz polarizada en el estudio citológico del cáncer de cérvix

Utility of polarized light in the cytological study of cervix cancer

Griselda Soto Velázquez¹ (g.soto@infomed.sld.cu)

Resumen

El trabajo trata un estudio observacional y descriptivo de las citologías vaginales tomadas en la consulta de patología de cuello del Hospital Materno Norte “Tamara Bunke” de Santiago de Cuba, en el período comprendido desde enero hasta julio del 2017. Con un total de 62 muestras, se procedió a cuantificar los núcleos birrefringentes de citologías negativas y diagnosticadas con los diferentes grados de displasia, haciendo énfasis en el estudio de las NIC II. Además de la valoración de la birrefringencia observada, se realizó procesamiento digital de las imágenes teniendo en cuenta variables morfométricas y densitométricas; obteniendo resultados con la utilización de medidas de tendencia central y de dispersión que permitieron llegar a la conclusión que existía correlación significativa en relación al área, diámetros y densidad óptica. Se determinó que existe correspondencia entre el diagnóstico con la luz polarizada y el método tradicional de Papanicolaou.

Palabras clave: birrefringencia, luz polarizada, cáncer de cérvix, displasia, tratamiento de imágenes

Abstract

An observational and descriptive study of vaginal citologies taken in the Cervical Pathology Medical Office which belongs to the Maternal Hospital “Tamara Bunke” of Santiago de Cuba was made during the period of time from January to July, 2017. From a total of 62 samples we count birrefringent nuclei from negative citologies and diagnosed of different grades of dysplasia making emphasis in the study of CIN II. Also, from the assessment of the watched birrefringency was made a digital processing of images having into account morphometric and densitometric variables, obtaining as results with the use of central trend measures and dispersion the conclusion that exist a significant correlation between the diameter area and optical density. Was determined that exist correlation between the diagnosis made using polarized light and the traditional Papanicolaou Test.

Key words: Birefringence, polarized light, cancer of cervix, dysplasia, image processing

Introducción

El cáncer de cérvix es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero, en la zona de transición del epitelio escamoso y el columnar, que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras llamadas displasias cervicales o Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC) (Gómez, 2009). Estas lesiones precursoras se caracterizan por alteraciones de la maduración y anomalías nucleares, que según la

¹ Doctor en Ciencias. Profesor Titular. Universidad de Oriente. Cuba.

clasificación de Richart vigente en nuestro país, se han subdividido en tres grados teniendo en cuenta su morfometría histológica y gravedad: NIC I, NIC II y NICIII – CIS (Carcinoma *in situ*) (Saulo, 2016).

La manera más eficiente de reducir las muertes por cáncer cervical es a través de un programa que facilite a la mujer la realización de una prueba citológica con calidad y regularidad, y si resulta anormal, ofrecer las facilidades para acceder a una atención especializada y un tratamiento efectivo (Niño y Torres, 2006). En muchos países desarrollados que aplican esos programas, han logrado disminuir la mortalidad por cáncer cervical, el cual constituye la segunda causa de muerte por enfermedades malignas en la mujer a escala mundial (Webster y Kumar, 2014).

La metodología para el tamizaje más utilizada a nivel mundial es la prueba de Papanicolaou (PAP). Una variante de este método citológico convencional es la “citología en base líquida” utilizado en países desarrollados (Andrade, 2012). Otro método es la detección del HPV, que se plantea que es la causa principal de este cáncer, el cual se realiza mediante técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) o Captura Híbrida II (HCII) y en zonas de escasos recursos con población de difícil acceso también se ha planteado como alternativa la inspección visual con ácido acético con tratamiento inmediato (Webster y Kumar, 2014).

La citología es extremadamente específica para detectar cáncer cervical y NIC de alto grado, pero es mucho menos específica para diagnosticar NIC de bajo grado, por lo que no es muy sensitivo, y los resultados falsos negativos ocurren entre el 8 y 50% (Andrade, 2012). La aparición de falsos negativos motiva la necesidad de asegurar la calidad en la toma y procesamiento de las muestras, así como disponer de métodos efectivos de revisión de las pruebas. Los métodos que utilizan el procesamiento digital de imágenes y la visión computacional, han comenzado a desempeñar en los últimos años una importante función (Martínez et al, 2005; Niño y Torres, 2006), no obstante, estos últimos avances son costosos y empleados en los países del primer mundo.

La física óptica ha estudiado y generado equipos a partir del desarrollo científico y lo ha aplicado a las ciencias biológicas. Las propiedades de polarización de la luz han sido un tema básico en el desarrollo de la óptica y sus aplicaciones, la misma permite incrementar el contraste en aplicaciones basadas en esta técnica, así como también pueden ser detectadas las propiedades de birrefringencia o dicroísmo de los tejidos biológicos siendo de gran utilidad para la caracterización de los tejidos (Lu, Zhang, Zhi, Yao, 2015; Pierangelo, Nazac, Benali, Validire, Cohen, Novikova, Ibrahim, Manhas, Fallet, Antonelli, y Martino, 2013). El interés de este estudio no se centra en el análisis de la luz polarizada, sino en utilizar la luz polarizada como una “sonda” para obtener propiedades físico-químicas de los materiales bajo estudio.

Las formaciones submicroscópicas asimétricas orientadas en un medio de diferente índice de refracción, o las uniones entre las moléculas e iones con una disposición asimétrica pueden ser detectadas con Microscopio Óptico de Luz Polarizada (MOLP), el cual permite descubrir proteínas u otras disposiciones moleculares, aunque dichas moléculas no sean visibles (Chen, Lin, Ludford, Clayton, Gu, Russell, 2015).

Además de la descripción cualitativa y el análisis de los posibles patrones histológicos que permitan definir la clasificación de las displasias para su diagnóstico, en los últimos

años, numerosos estudios han tratado de definir la utilidad de la citometría estática y la de flujo para la cuantificación de ADN nuclear (Chow, Yan, Bennett, y Wong, 2012; Chen, Lin, Ludford, Clayton, Gu, Russell, 2015). Por lo que se considera fundamental conocer no solo los parámetros morfológicos cualitativos, sino también los morfométricos, obtenidos mediante la utilización de programas informáticos de análisis de imagen, y que por su relevancia clínica van a dar una información valiosa para el diagnóstico y pronóstico del paciente.

En esta investigación se estudia la utilidad de la MOLP como un método que posibilitaría un estudio más rápido y, posiblemente precoz del cérvix uterino para impedir el largo manejo y traslado de las muestras extraídas, basado en las propiedades de los componentes químicos y organización de los elementos celulares frente a la luz polarizada, sin desconocer el método tradicional basado en la morfología citológica del epitelio del cuello uterino y que puede realizarse con más detenimiento de ser necesario.

Utilidad de la luz polarizada en el estudio citológico del cáncer de cérvix

Se realizó un estudio observacional y descriptivo de las citologías vaginales tomadas en la consulta de patología de cuello del Hospital Materno Norte “Tamara Bunke” en el período comprendido de enero a julio del 2017; para ser analizadas con un nuevo método diagnóstico basado en la Microscopía de Luz Polarizada, para el diagnóstico precoz de las displasias cervicales. Se escogieron las muestras aleatorias estratificadas de las citologías vaginales con un total de 62 muestras, de las cuales resultaron positivas de NIC I 12 muestras, de NIC II 20 muestras y de NIC III-CIS 10 muestras, así como 20 muestras de pacientes negativas.

Para esta investigación se tuvo en cuenta el diagnóstico histológico según el método tradicional de Papanicolaou, que considera las características histológicas, organización y observación de las células epiteliales, así como la forma y tamaño de los núcleos. Con el uso de la microscopía de luz polarizada se tuvo en cuenta la presencia de núcleos birrefringentes, efectuándose el conteo en diferentes grados de NIC, análisis de la forma y brillantez, así como las mediciones de variables morfométricas y densitométricas en el caso de los NICII.

Observación y registro de las muestras:

El análisis a través de la MOLP se realizó en el laboratorio de Microscopía Óptica Avanzada del CENEA para el análisis directo ex vivo, las muestras fueron fijadas con citospray y observadas al MOLP, en campo brillante, ángulo de 70 y 90 grados con la debida documentación fotográfica. Posteriormente las muestras fueron enviadas al laboratorio de Citología Vaginal del hospital donde se reconfirmó el diagnóstico citológico usando el método tradicional de Papanicolaou, realizado siempre por un citotecnólogo de experiencia que colaboró con la presente investigación.

Procesamiento digital:

Las imágenes fueron tomadas con una cámara Canon modelo G14 PC 2116 capaz de captar los colores verde, azul y rojo que constituyen el sistema RGB (red, green and blue), que asegura un mismo nivel de fotografía en todas las imágenes. La cámara esta acoplada a un microscopio marca Novel 7401F dotado de una lámpara halógena de

6v/20 W y una lámpara de mercurio HVO 100 W de epifluorescencia. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa informático de análisis de imagen Image J 1.44 JAVA (2011), este software permite interpretar y analizar matemáticamente las imágenes captadas.

Fueron medidos 209 núcleos positivos a la birrefringencia y 79 núcleos negativos a la misma, en las muestras positivas de NIC II y en 70 grados de polarización. El contenido de las tablas con los resultados de las mediciones dadas por el programa informático presenta la siguiente información:

1. Área nuclear: Es la suma del número de pixeles del interior del objeto incluyendo los límites o frontera. Este resultado es el tamaño del objeto.
2. Diámetro máximo y mínimo (largo y ancho), en este caso para los ovalados y alargados, en el caso de los redondos un solo diámetro.
3. Densidad Óptica (DO): El software utilizado permite medir la Densidad Óptica Integrada (DOI) que es el producto de la DO por el área nuclear. Como era de interés obtener la densidad óptica se procedió a dividir la DOI por el área obteniendo la DO, expresada por el logaritmo de su relación: $DO = \log_{10}(i/t)$, siendo i = luz incidente t = luz transmitida o reflejada.

Los datos se procesaron en una computadora Corei 5, creándose una base de datos con el paquete estadístico SPSS Versión 11.5; los resultados se reflejaron en tablas estadísticas de doble entrada.

Los resultados obtenidos de la cuantificación realizada de los núcleos birrefringentes y no birrefringentes, fueron comparadas a través del método de comparación de medias en muestras independientes (Kruskall-Wallis) para observar si existía diferencia significativa. Para el análisis de las variables cuantitativas se realizó el estudio de correlación lineal mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La Prueba de Hipótesis de los estadígrafos de diferencias de media y desviación estándar se utilizaron para la comparación de las características cuali-cuantitativas de los núcleos negativos y los birrefringentes valorados, así como la proporción e Intervalo de confianza como medida de resumen.

Resultados

En el gráfico 1, muestra el análisis de las diferencias de medias el cual mostró alta significación en todos los grupos para $p=0,000$ ($p<0,01$) en la prueba de Kruskal-Wallis, se evidencia un número ascendente de núcleos birrefringentes que coinciden con el diagnóstico de las displasias en estos pacientes por el sistema Richard que también ascienden en su tendencia a mayor malignidad.

Gráfico 1. Cuantificación de los núcleos birrefringentes por cada uno de los diagnósticos establecidos.

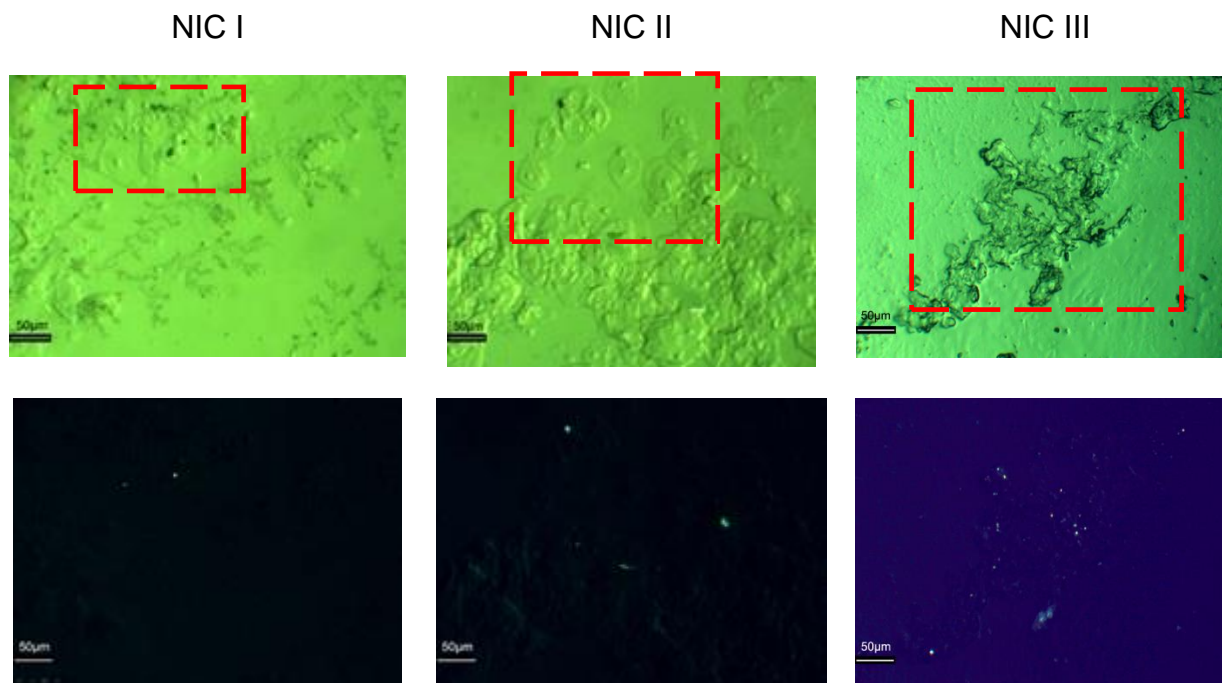


Fig.1. Microfotografías de citologías del cérvix positivas de NIC vista con MOLP. Arriba- Campo brillante-epifluorescencia (rectángulo rojo señala la zona positiva). Abajo- Polarización 90°. Lente objetivo 10x.

En la figura 1, se observa la presencia de núcleos en el campo brillante que al ser vistas en polarización no presentan birrefringencia con oscuridad total de los mismos siendo negativos, mientras que otros muestran cambios en su composición química que al ser vistos con luz polarizada se mostraron birrefringentes. Se evidencia una mayor cantidad de núcleos que son positivos a la birrefringencia en los grados de NIC lo que indica que la cuantificación de los mismos asciende a medida que aumenta el grado de displasia.

Tabla 1. Intervalos de medidas de los núcleos negativos y positivos a la birrefringencia en el NIC II.

Medidas nucleares	Negativos				Birrefringentes			
	Redondos		Ovalados		Redondos		Alargados	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Área (μm^2)	14,81	82,52	18,16	93,72	18,81	114,68	23,67	148,43
Diámetro máximo (μm)	-	-	5,15	16,41	-	-	7,98	28,12
Diámetro mínimo (μm)	-	-	3,52	10,57	-	-	5,98	16,87
Diámetros (redondos) (μm)	4,74	15,14	-	-	5,26	27,52	-	-
Densidad óptica	12,26	14,52	12,42	14,89	13,34	14,86	14,62	18,76

$p=0,000$ ($p<0,01$)

En la tabla 1 se observa un aumento de las medidas de los núcleos negativos con respecto a los núcleos birrefringentes en muestras positivas de NIC II, así como variaciones en la forma de estos.

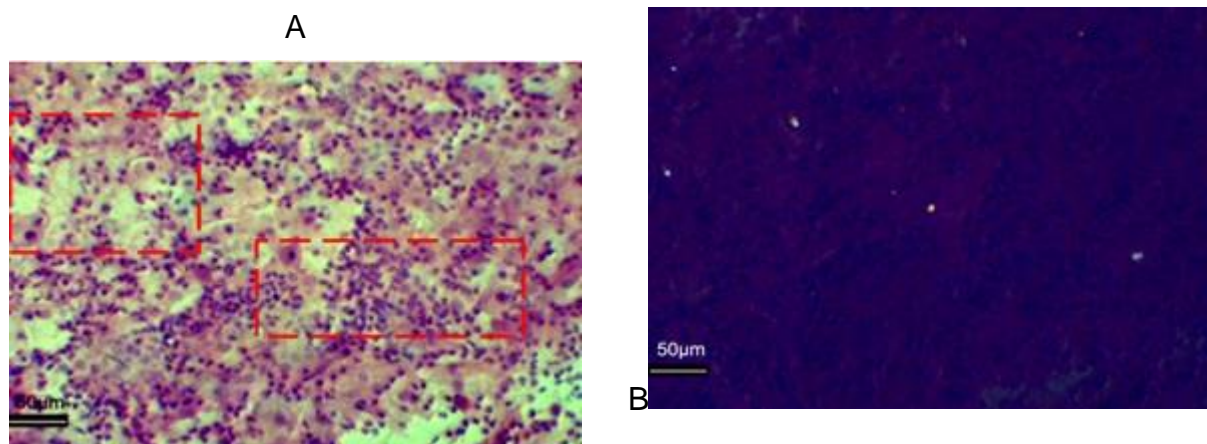


Fig. 2. Microfotografías de citología del cérvix positivas de NIC II vista con MOLP. A) Tinción de Papanicolaou (rectángulo rojo señala las zonas positivas). B) Polarización 90°. Lente objetivo

La figura 2 muestra microfotografías de citología del cérvix de NIC II con Papanicolaou, una vez realizado el diagnóstico por el MOLP se tiñeron las preparaciones histológicas para la reconfirmación del diagnóstico, pudiendo observarse la birrefringencia de los núcleos positivos en polarización, que en la mayoría de los casos estos coincidían con aquellos núcleos que poseen un mayor hipercromatismo, en ocasiones estos se encontraban aumentados de tamaño rompiéndose la relación núcleo-citoplasma, y también la presencia de núcleos con tendencia a la deformación, características de este tipo de displasias.

Tabla 2. Comparación de medias entre los núcleos negativos y positivos a la birrefringencia de pacientes diagnosticados con NIC II.

Variables	Diagnóstico	Cantidad	Media	Desviación estándar	Error típico de la media
Área	Negativo	79	95,3137*	±39,76163	4,47353
	Positivo	209	119,3789*	±57,05388	4,86364
Densidad	Negativo	79	69,2009**	±10,01090	1,12631
	Positivo	209	139,1577**	±32,44059	2,24396

* p=0,042 (p<0,05) **p=0,000 (p<0,01)

Al realizar el análisis de varianza entre los núcleos positivos y negativos para el área y densidad, mostró que en el caso del área fue significativa para p=0,042 (p<0,05) y la densidad fue de alta significación p=0,000 (p<0,01), para varianzas no iguales con un intervalo de confianza del 95%, mostrado en la tabla 2.

Discusión

Se han tenido en cuenta a nivel de la ultraestructura, los cambios de las células normales en neoplásicas al fallar determinados mecanismos de regulación, y sus propiedades físicas responsables de los hallazgos en la observación con el MOLP.

Es importante tener en cuenta los daños en el ADN y las mutaciones, como los dos tipos principales de errores en el ADN. Estos daños son anomalías químicas en la

estructura del ADN, como roturas de cadena sencilla y cadena doble, residuos de 8-hidroxideoxiguanosina, y aductos de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Chow, Yan, Bennett, y Wong, 2012). Determinadas proteínas pueden reconocer estas alteraciones en el ADN, de manera que los pueden reparar si hay disponible información redundante para ser copiada, a partir de la secuencia intacta de la cadena de ADN complementaria que no ha sufrido esta alteración (Gómez, 2009). Aquellos tipos celulares que se dividen más frecuentemente como ocurre en los epitelios, y en este caso del cérvix uterino, tienden a acumular más fácilmente las mutaciones siendo una causa importante de displasias y cáncer cervical (Andrade, 2012).

La luz polarizada es una técnica útil para estudiar la ultraestructura de manera selectiva incluyendo determinadas macromoléculas, la anisotropía puede dar evidencias acerca del patrón de orientación espacial al nivel molecular, este fenómeno ha sido observado en tejidos normales y cancerosos (Lu, Zhang, Zhi, Yao, 2015; Pierangelo, Nazac,, Benali, Validire, Cohen, Novikova, Ibrahim, Manhas, Fallet, Antonelli, y Martino, 2013). Lo observado en el gráfico 1, demuestra que utilizando la luz polarizada se pueden considerar rangos que delimiten una correspondencia con el método tradicional teniendo en cuenta que el rango entre 0 a 3 puede corresponder a casos negativos, ya que pueden existir células precancerosas que pueden llegar a desaparecer sin tratamiento alguno al producirse varios mecanismos por el cual los daños en el ADN sean reparados o se produzca la apoptosis evitando así la aparición del cáncer (Gómez, 2009; Andrade, 2012). Estos rangos numéricos que se refieren al número de los núcleos de las células que presentan una composición no organizada de sus ADN y proteínas asociadas, dan en breves momentos una identificación de en qué medida se está frente a una posible displasia leve, moderada o severa.

La birrefringencia es una propiedad óptica que se produce cuando la luz pasa a través de una estructura anisotrópica. Las estructuras anisotrópicas tienen dos índices de refracción diferentes dividido en dos ejes, uno rápido y otro lento, mientras que las isotrópicas tienen un índice de refracción homogéneo en todas las direcciones cuando pasan por la estructura (Chen, Lin, Ludford, Clayton, Gu, Russell, 2015; Chow, Yan, Bennett, y Wong, 2012), esto es lo que sucede en el caso de los núcleos negativos a la birrefringencia, que no han sufrido cambios moleculares.

Al ser valoradas las muestras teñidas con la técnica de Papanicolaou para la reconfirmación, se evidencio lo planteado por Gómez (2009) y Martínez et al (2005) en el caso de los NIC I las células que podemos encontrar con alteraciones corresponden a células poligonales de tipo intermedio o superficial, discreto aumento de la relación núcleo-citoplasma, donde el núcleo ocupa menos de 1/3 del área celular. También se ha observado que algunos pierden su contorno redondo u ovalado, y por supuesto a la tinción es hiper cromático (Niño y Torres, 2006).

La presencia de las células intermedias y superficiales en el NIC I, así como las variaciones en cuanto a la forma del núcleo también fueron observadas en el campo brillante del microscopio utilizado, antes de la tinción, con un tenue color verdoso y relieve característico (tridimensionalidad), no observable en un microscopio de campo brillante común, como se muestra en la figura 1.

En el extendido de un NIC II con Papanicolaou las células corresponden en general a células intermedias profundas, con mayor variación en la forma celular (Gómez, 2009; Niño y Torres, 2006). Las irregularidades en el contorno del núcleo y la alteración de la relación núcleo-citoplasma es mayor que en la displasia leve, siendo mayor el hiper cromatismo (Gómez, 2009; Martínez et al, 2005). Algunas células son poligonales u ovaladas a veces fusada (Niño y Torres, 2006), que pueden observarse en el campo brillante de la figura 1, con núcleos algunos alargados y que al ser observadas en polarización son birrefringentes.

No existen límites bien definidos entre el NIC III y el CIS, siendo consideradas ambas por la clasificación de Richard como displasia grave o severa (Saulo, 2016). En este caso los cambios se observan en las células basales y parabasales que a menudo aparecen en los frotis ordenadas “en fila india” o agrupadas, con núcleos aberrantes, grandes e hiper cromáticos y escaso citoplasma, lo cual hace que la relación núcleo-citoplasma sea franca a favor del núcleo (Gómez, 2009; Niño y Torres, 2006); puede presentarse queratinización y morfología de “renacuajos” (Martínez et al, 2005). No obstante, las muestras obtenidas en este estudio corresponden a un NIC III-CIS, cuya diferenciación del NIC III a un CIS se encuentra en un margen muy estrecho, pudiéndose esclarecer mejor la diferencia con la toma de biopsia del cérvix, para determinar así la extensión, que en este caso abarca todo el epitelio, pero no rebasa la membrana basal.

Existen criterios bien definidos para clasificar una displasia o NIC sin que sea necesaria la recurrencia de los cambios citológicos denominados coilocíticos, siendo los coilocitos las células patognomónicas de la infección del VPH, considerada el factor de riesgo más importante del cáncer de cérvix y sus lesiones precursoras (Andrade, 2012); ya que es posible encontrar casos de displasias con la presencia de estas células, pero sin embargo se ha observado que no siempre están presentes en todos los casos, en este estudio no existió un predominio de estas células.

Se puede resumir planteando que, al observarse los frotis tratados con la técnica de Papanicolaou, cuando se presenta células superficiales e intermedias con discariosis (heterocromatina irregular y desordenada) se plantea una displasia leve o NIC I, si es en una célula intermedia profunda entonces es displasia moderada o NIC II y finalmente si está además en células parabasales y basales es una displasia severa o NIC III-CIS (Saulo, 2016).

Lo observado en las imágenes de NIC II, corrobora lo planteado por los diferentes autores en sus estudios realizados con tinciones de Papanicolaou (Gómez, 2009; Niño y Torres, 2006; Andrade, 2012), acerca de la presencia de las alteraciones en cuanto a la forma del núcleo, y es posible encontrar en una muestra, núcleos que aún no presentan cambios en su forma, pero la birrefringencia observada indica que están sufriendo cambios moleculares antes de evidenciarse los cambios morfológicos.

La densidad óptica es una medida de la relación entre la luz transmitida o reflejada de la muestra, se utiliza a menudo para medir la concentración de las células o partículas que se dispersan, siendo la densidad óptica directamente proporcional a la concentración (Niño y Torres, 2006). Por tanto, la densidad óptica calculada por el software de procesamiento de imágenes Image J, nos indica que hay mayor

concentración del ADN en la zona donde se encuentra la birrefringencia nuclear, que en una muestra coloreada se evidencia por el hiper cromatismo presente.

Los resultados obtenidos coinciden con (Gómez, 2009; Niño y Torres, 2006) en sus estudios densitométricos y morfométricos, en los núcleos de las células normales y displásicas, que a diferencia de este trabajo se realiza con microscopía óptica y tinción, pero que apuntan en la misma dirección, dando más elementos para considerar la utilidad del MOLP, demostrando cómo pueden compararse con evidentes diferencias en área y densidad, núcleos que no fueron birrefringentes y los que sí lo fueron ayudado por la variación de los grados del polaroide y observar la diferencia significativa del área y la densidad respectivamente, que cualifican la normalidad o alteración de estas células.

Conclusiones

Las bases físico-químicas del comportamiento de la luz polarizada ante los núcleos con alteraciones en las neoplasias intraepiteliales cervicales como lesiones precursoras del cáncer de cérvix, se ven expresadas de forma conclusiva tanto en el conteo de los núcleos birrefringentes de las muestras tomadas según la clasificación de Richard como en la diferenciación del área y la densidad en los núcleos negativos y positivos a la birrefringencia.

Referencias

- Andrade, L. D. (2012). *Análise morfológica, imunocitoquímica e molecular das citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado* (tese Doutoral). Fundação Antônio Prudente, São Paulo.
- Chen, Lin, Ludford, Clayton, Gu, Russell, Y., Lin, H., Ludford, M., Clayton, A., Gu, M., Russell, S. (2015). Polarization of excitation light influences molecule counting in single-molecule localization microscopy. *Histochem Cell Biol.* 143, 11–19. doi: 10.1007/s00418-014-1267-1
- Chow, Yan, Bennett, y Wong, M., Yan, k., Bennett, M., y Wong, J. (2012, October). Birefringence and DNA Condensation of Liquid Crystalline Chromosomes. *Eukaryotic Cell.* 9 (10), 1577-1587. doi: 10.1128/EC.00026-10
- Gómez, M. E. (2009). Detección de Cáncer Cérvico-Uterino mediante Red Neuronal Función de Base Radial (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Lu, R., Zhang, Q., Zhi, Y., Yao, X. (2015). A polarization-sensitive light field imager for multi-channel angular spectroscopy of light scattering in biological tissues. *Quant Imaging Med Surg.* 5 (1), 1-8. doi: 10.3978/j.issn.2223-4292.2014.11.01
- Niño, D., y Torres, C. (2006). Contribución al estudio de células escamosas de citología cérvico-uterino que presentan cambios por ASCUS, por medio de tratamiento digital de imágenes (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Pierangelo, A., Nazac, A., Benali, A., Validire, P., Cohen, H., Novikova, T., Ibrahim, B. H., Manhas, S., Fallet, C., Antonelli, M. R, y Martino, A. D. , A., Nazac, A., Benali, A., Validire, P., Cohen, H., Novikova, T., Ibrahim, B. H., Manhas, S., Fallet, C.,

Antonelli, M. R, y Martino, A. D. (2013, Jun 17). Polarimetric imaging of uterine cervix: a case study. *Optics Express*. 21(12), 14120-30. doi: 10.1364/OE.21.014120.

Saulo, J. (2016). Lesiones Escamosas Intraepiteliales Cervicales. *Ginecología y Obstetricia*. 49 (4). Recuperado de https://encolombia.com/medicina/revistas-medicas/ginecologia/vol-494/go_lesiones_e/#sthash.Aq1fms9K.dpuf

Webster, M., Kumar, V. S. (2014, January). Picturing Cervical Cancer. *Clinical Chemistry*. 60 (1), 277-279. doi: 10.1373/clinchem.2013.217521