

CAMILA FIGUEIRA MENDES¹

GILDO GARDINALLI FILHO²

RENATO MARINHO FURONI²

LUÍS VICENTE VÉLEZ MIRANDA²

JÚLIO BOSCHINI FILHO³

LUÍZ FERRAZ DE SAMPAIO NETO⁴

Micronúcleos em células do colo uterino em mulheres HIV+ segundo sua condição de imunidade

Micronuclei in uterine cervical cells of women HIV+ according to immunocompetence markers

Artigo original

Palavras-chave

Testes para micronúcleos
HIV
Síndrome de imunodeficiência
adquirida/complicações
Neoplasias do colo uterino
Colo do útero/lesões

Keywords

Micronucleus tests
HIV
Acquired immunodeficiency syndrome/
complications
Uterine cervical neoplasms
Cervix uteri/injuries

Resumo

OBJETIVO: investigar a micronucleação (MN) em células esfoliadas do colo uterino de mulheres HIV+ observando as condições de imunidade aferidas pelos níveis de linfócitos CD4+ e da carga viral para o HIV (CV). **MÉTODOS:** foram obtidas coletas citológicas da junção escamocolumnar de 23 pacientes HIV+ de Ambulatório de DST/AIDS. O grupo controle foi composto por mulheres assintomáticas do Ambulatório de Prevenção de Câncer Ginecológico do mesmo serviço. O material foi submetido a processamento citológico para leitura em microscopia de luz, com objetiva de imersão em 2.000 células por paciente. Para avaliação da condição imunitária das pacientes HIV+ investigamos os níveis de linfócitos CD4+ e CV. A análise estatística dos resultados se fez com os testes do χ^2 e Kolmogorov-Smirnov. **RESULTADOS:** vinte e três pacientes compuseram o grupo de mulheres HIV+ e 19 formaram o grupo controle. Em todas as pacientes HIV+ e em 84,2% do grupo controle detectamos MN. Dezesete pacientes HIV+ (73,9%) tiveram mais de 7 MN. No grupo controle tivemos apenas 1 caso (5,2%) com mais de 7 MN. Houve tendência na associação de maiores quantidades de MN em mulheres com baixos níveis de linfócitos CD4+ e maiores níveis de CV, sem caracterizar correlação estatística. **CONCLUSÕES:** pacientes HIV+ em fase de AIDS têm maior ocorrência de MN que o grupo controle e, também, a frequência com que são detectados MN parece estar associada a piores condições clínicas da imunossupressão.

Abstract

PURPOSE: to investigate the micronucleation (MN) of exfoliated cells from the uterine cervix of HIV+ women according to immunocompetence status. We investigated the clinical conditions of immunocompetence by analyzing the levels of CD4+ lymphocytes and viral count for HIV (VC). **METHODS:** biological material was collected from 23 HIV+ patients whose cervical oncologic cytology results were negative. They were patients from the STD/AIDS-FCMS-PUCSP who underwent a cytobrush collection in the squamous columnar junction. Similar material was obtained from 19 healthy control women. The material, about 2000 cells per patient, was processed for cytology using light microscopy and an immersion objective. To analyze the immunological status of HIV+ patients we used CD4+ count and VC. Statistical analysis was performed using the χ^2 and Kolmogorov-Smirnov tests. **RESULTS:** twenty-three patients composed the group of HIV+ women and 19 composed the control group. We found micronuclei (MN) in all HIV+ patients and in 84.2% of the control group. In 17 73.9% of the HIV+ patients and in 5.2% of the control group we found more than 7 MN cells. MN tended to occur more among women with poorer immunological status in the HIV+ group. **CONCLUSIONS:** HIV+ patients in the AIDS phase have a higher prevalence of micronucleated cells, as opposed to a control group. Also, the frequency of MN was associated with worse conditions of immunosuppression.

Correspondência:

Luiz Ferraz de Sampaio Neto
Rua Inglaterra, 574
CEP: 18045-070
Sorocaba (SP), Brasil

Recebido

13/09/2011

Aceito com modificações

24/10/2011

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – PUCSP – Sorocaba (SP), Brasil

¹ Bióloga do Departamento de Morfologia e Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – PUCSP – Sorocaba (SP), Brasil

² Acadêmicos do Curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – PUCSP – Sorocaba (SP), Brasil

³ Professor Titular do Departamento de Morfologia e Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – PUCSP – Sorocaba (SP), Brasil

⁴ Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – PUCSP – Sorocaba (SP), Brasil

Introdução

O colo uterino é o segundo local mais frequente de comprometimento neoplásico entre mulheres em todo o mundo, e é a principal causa de morte por câncer entre mulheres nos locais mais pobres¹. Alguns tipos de papilomavírus humanos (HPV) são denominados de “alto risco” neoplásico, pois são detectados em lesões cervicais de alto grau e no câncer de colo uterino². Aparentemente, as modificações pré-neoplásicas e neoplásicas acontecem por sua ação direta nas células basais do epitélio pluriestratificado, interferindo na atividade celular, promovendo alterações numéricas e estruturais dos cromossomos³.

A instabilidade cromossômica, na aneuploidia seria um dos principais eventos associados ao processo carcinogênico⁴. A possível ação genotóxica do HPV e a incapacidade em depurar de maneira satisfatória o vírus podem ser caracterizadas clinicamente pela maior prevalência de alguns tipos específicos de tumores na população com comprometimento imunitário⁵⁻⁷. Estudos propõem que a lesão do genoma de indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) poderia estar associada ao gene *Vpr*, um gene acessório do HIV-1 e HIV-2, com capacidade de induzir anormalidades no ciclo celular durante o período G2, promovendo, assim, instabilidade genômica⁸⁻¹⁰. Nicol et al.⁴ demonstraram de maneira elegante que existem alterações significantes na expressão de fatores associados ao desenvolvimento neoplásico em mulheres HIV+, tais como o fator de crescimento endotelial vascular e proteínas inibidoras da CPK, ambos associados na regulação e no ciclo celular. No estudo desses autores, houve associação significativa desses marcadores no epitélio do colo uterino entre mulheres simultaneamente coinfectadas pelo HIV e pelo HPV em relação àquelas HIV-/HPV+⁴. Vários achados clínicos relativos à infecção pelo HPV entre pacientes HIV+ demonstram que a imunossupressão determina maior prevalência do HPV, maior possibilidade de contágio, maior agressividade das lesões induzidas pelo vírus, genotoxicidade, dificuldade do controle clínico e prolongada persistência do vírus HPV nos tecidos¹¹.

A relação entre o HIV e a ocorrência de neoplasia de colo uterino é conhecida há alguns anos¹². Assim, a partir de 1988, para as mulheres HIV+ sem evidências clínicas da doença, o fato de serem portadoras de lesões intraepiteliais cervicais uterinas de alto grau já as categorizavam para ser incluídas na categoria B (infecção por HIV sintomática precoce), passando o câncer de colo uterino a ser incluído entre uma das condições definidoras de AIDS¹¹. A efetiva associação entre o câncer de colo uterino com a contaminação e persistência de alguns tipos do HPV justifica mudanças na abordagem clínica para indivíduos HIV+ e pacientes com AIDS. Habitualmente, essas pacientes são orientadas a submeter-se a condutas mais intervencionistas e, também,

revestem-se de maiores cuidados no seguimento de prevenção e mesmo no tratamento das lesões de baixo e alto grau do colo uterino^{11,13}. Os cuidados que cercam outras DST também deverão ser adotados nessa população, com possíveis repercussões, inclusive na indicação de vacina contra tipos do HPV de alto risco neoplásico.

A contagem de células CD4+ é usada clinicamente como marcador geral de competência do sistema imune, e sua depleção indica deficiência grave na imunidade celular⁸. Baixa carga viral para HIV, por sua vez, é considerada bom marcador preditivo do prognóstico da doença viral e/ou de sobrevida¹³. Por isso mesmo o acompanhamento de indivíduos soropositivos para o HIV se faz com o controle periódico desses marcadores laboratoriais.

Além do tipo de vírus, do tempo de depuração ou persistência de partículas virais e das condições imunitárias das pacientes, buscam-se outros marcadores preditivos da evolução da relação HPV e hospedeiro para subsidiar a conduta clínica, tendo em vista a oncogênese do câncer de colo uterino.

Micronúcleos são corpúsculos contendo DNA, geralmente formados por fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, não incluídos no núcleo celular e sem nenhuma conexão estrutural com este. Podem ser considerados marcadores morfológicos de lesão celular com potencial genotóxico de desenvolvimento neoplásico¹³⁻¹⁵. Estes danos cromossômicos costumam ser causados pela exposição das células a diferentes agentes genotóxicos, como radiações ionizantes¹⁵, materiais químicos¹⁶ ou substâncias biológicas¹⁷.

O teste do micronúcleo (MN) é aceito atualmente como um indicativo citogenético de possíveis alterações cromossômicas e pode registrar tanto numérica quanto estruturalmente esses achados, sendo que o MN pode ser facilmente avaliado em lesões epiteliais^{18,19}. A atividade carcinogênica epitelial no colo uterino poderia ser caracterizada mediante o aumento da presença de células micronucleadas em esfregaços da mucosa do colo uterino¹⁸. É possível que a análise da frequência do MN em células esfoliadas do colo uterino seja um critério adicional para o estabelecimento do risco de genotoxicidade, contribuindo para incrementar a sensibilidade e especificidade da citologia oncológica cervical; repercutindo no diagnóstico precoce e prevenção secundária do câncer de colo de útero.

O objetivo deste estudo foi buscar conhecer a frequência de micronucleação em células esfoliadas da mucosa do colo uterino entre mulheres HIV+ segundo suas condições de imunidade, aferida através dos níveis de CD4+ e carga viral do HIV.

Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Sorocaba da

Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, e as pacientes envolvidas convidadas a participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Neste estudo de caso-controle foram avaliadas 23 pacientes HIV+, atendidas no ambulatório de DST da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo no período de julho a dezembro de 2009. Elas estavam sem lesões colposcopicamente evidenciadas no colo uterino e a colpocitologia era negativa para neoplasia. Foram critérios de exclusão a não aceitação em participar do estudo, estar grávida, ter apresentado anteriormente lesão intraepitelial de alto grau ou câncer do colo uterino. Para compor o grupo controle, convidamos pacientes que buscaram o setor de prevenção de câncer ginecológico do mesmo serviço, não gestantes, que eram assintomáticas e cujos resultados de colpocitologia oncótica foram negativos.

As amostras da mucosa cervical uterina foram obtidas diretamente através da escovação da junção escamo-colunar (JEC), durante o exame ginecológico. Na preparação citológica seguimos o preconizado por Gattás et al.²⁰. Após fixação em ácido acético/ metanol 3:1, foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos, por 3 vezes, seguida da remoção do sobrenadante. O sedimento foi hidrolisado em HCl 5N por 30 minutos em temperatura ambiente. Por último, foram coradas pela reação de Feulgen durante 1 hora e 30 minutos, lavadas e secas. A leitura foi feita em microscopia de luz com objetiva de imersão em 2.000 células por paciente. As imagens foram capturadas (microscópio Nikon® E800), com auxílio do programa Image PRO-LITE®. Considerados critérios para diagnóstico de MN o tamanho da estrutura com menos do que 1/3 do tamanho do núcleo, ocupando o mesmo local onde se pode focar o núcleo, com padrão de estrutura e coloração da cromatina idênticos ao núcleo e, simultaneamente, nenhuma ligação com o núcleo, a leitura do material foi feita por um observador treinado na interpretação do MN.

A avaliação das condições de imunidade das pacientes HIV+ foi efetuada através da quantificação de carga viral de HIV-1 com a técnica b-DNA, com kit HIV 3.0 RNA e da contagem de linfócitos T CD4+/CD8+ mediante citometria de fluxo/ FACSCalibur – Tritest, efetuados pelo Laboratório Adolfo Lutz de Sorocaba em amostras de sangue venoso periférico colhidas com intervalo de até 3 meses antes ou depois da inclusão no estudo. O resultado do CD4+ é expresso pelo número de linfócitos CD4+ por μL de sangue venoso e da carga viral com o número de cópias por mL de plasma.

Para a análise estatística da significância dos resultados foi utilizado o teste do χ^2 para comparação da ocorrência de MN entre mulheres HIV+ e grupo controle. Para análise da correlação entre marcadores de imunidade (linfócitos CD4+ e carga viral) e ocorrência de MN usamos o teste do χ^2 e Kolmogorov-Smirnov, sendo considerados significantes resultados de $p < 0,05$ (5%).

Resultados

Em todas as pacientes HIV+ e na maior parte (84,2%) das componentes do grupo controle foi possível caracterizar a presença de células micronucleadas (MN). Em 17 pacientes HIV+ (73,9%) encontramos mais de 7 MN em 2.000 células analisadas, no grupo controle tivemos apenas 1 (5,2%) paciente com mais de 7 MN em 2.000 células analisadas (Tabela 1). Houve significância estatística da maior ocorrência de MN entre mulheres HIV+.

A avaliação da imunossupressão em pacientes com AIDS foi caracterizada através dos níveis séricos de carga viral para o HIV e a contagem dos linfócitos CD4+. Encontramos 14 pacientes com carga viral abaixo dos limites de detecção (50 cópias/ μL) e 14 pacientes com mais de 500 células CD4+. Apenas 4 pacientes tiveram simultaneamente carga viral positiva e menos de 500 linfócitos CD4+. A correlação entre a condição imunológica dos pacientes com AIDS e a ocorrência de MN está apresentada na Tabela 2. Em ambos os critérios de condição imunológica (carga viral e CD4+) os resultados revelaram uma tendência em associar maior ocorrência de MN entre mulheres com baixos níveis de linfócitos CD4+ e maiores níveis de carga viral, contudo não houve correlação estatística em nenhum dos métodos estatísticos utilizados.

Tabela 1. Frequência de células micronucleadas em esfregaço cervical uterino de mulheres HIV+ e do grupo controle

Frequência de células micronucleadas em 2.000 células observadas	Grupo HIV+		Grupo controle	
	n	%	n	%
0 a 2	2	8,7	5	26,3
3 a 6	4	17,4	13	68,4
7 a 10	13	56,5	1	5,3
11 ou mais	4	17,4	0	0
TOTAL	23	100	19	100

$\chi^2=20,1$ ($p=0,0002$).

Tabela 2. Relação entre o número de células micronucleadas em 2.000 células analisadas (MN) e a condição clínica da infecção pelo HIV, avaliada pela contagem do CD4+ por μL de plasma e pela Carga Viral para o HIV/mL de plasma

Contagem de MN	Contagem de CD4+				Carga Viral			
	<500/ μL		$\geq 500/\mu\text{L}$		Indetectável*		Positiva	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0 a 2	0	0	2	14,3	2	13,3	1	12,5
3 a 6	2	22,2	3	21,4	3	20,0	0	0
7 a 10	6	66,7	7	50,0	8	53,3	5	62,5
11 ou mais	1	11,1	2	14,3	3	20,0	1	12,5
TOTAL	9	100	14	100	15	100	8	100

$\chi^2=0,4$ ($p=0,8$) Teste de Kolmogorov-Smirnov.

$\chi^2=1,7$ ($p=0,6$) Teste de χ^2 .

*Considerando-se o limite de detecção de 50 cópias/mL.

Discussão

O câncer cervical é precedido por uma série de modificações no epitélio original que constituem as lesões pré-neoplásicas^{1,3}. A longa história natural desse processo aliada às técnicas de citologia esfoliativa, colposcopia, anatomopatologia e, mais recentemente, da detecção do tipo de papilomavírus envolvido, permitiram a redução expressiva da doença em suas fases avançadas na maior parte do mundo¹¹. Sabemos hoje que o tempo de persistência do HPV no epitélio associa-se diretamente ao risco do desenvolvimento dos efeitos citopáticos virais^{4,5}.

O conhecimento íntimo do processo metabólico celular poderia auxiliar na análise das situações em que houve a incorporação do genoma viral ao genoma da hospedeira e, assim, contribuir para a definição de quais pacientes seriam efetivamente aquelas que deveriam receber tratamento mais agressivo e quais poderiam simplesmente ser observadas, aguardando-se o desaparecimento do vírus ou a involução do processo.

O aumento das células micronucleadas é usado como um “dosímetro endógeno” em tecidos que são alvos de agentes genotóxicos e ou citotóxicos, pois detecta precocemente ações citogenéticas nos epitélios onde surgirão as neoplasias^{18,21}. É fato clínico conhecido que a severidade do processo pré-neoplásico (frequência maior de lesão intraepitelial de alto grau) e do câncer em pacientes imunossuprimidas é evidente em mulheres submetidas a transplantes de órgãos que recebem drogas para induzir a imunossupressão e entre pacientes com AIDS^{1,11}. Ademais, alguns estudos permitem afirmar que a coexistência de NIC, infecção pelo HPV e apoptose são 5 vezes mais comuns em HIV+ do que na população comum⁹. Podemos justificar esses achados através do gene *Vpr*, que é um gene acessório do vírus HIV induzindo a formação de micronúcleos e aneuploidia nas células por ele contaminadas⁹.

Em nosso estudo analisamos a frequência das células micronucleadas no epitélio do colo uterino de mulheres soropositivas para o HIV, com quadros variáveis de imunossupressão. Comparando-se os resultados de ocorrência de MN com o grupo controle, constatamos que a prevalência de MN no epitélio de colo uterino entre mulheres HIV+ é superior à do grupo controle, situação que reforça o achado de estudo anteriormente desenvolvido na mesma população. Esse resultado poderia refletir uma possível coinfeção pelo vírus HPV, já que a prevalência de HPV entre mulheres HIV+ é superior àquela detectada na população geral¹¹. Não efetuamos a busca do HPV em nosso estudo, contudo os comportamentos de risco que expuseram estas mulheres ao vírus HIV são os mesmos que as expõem ao vírus

HPV. Talvez, a caracterização de quais tipos de vírus estejam associados à maior ocorrência de MN pudesse ser uma sequência adequada para apurar o entendimento de nossos achados.

A tendência entre maiores quantidades de MN e a condição de imunossupressão sugere que quanto piores as condições de imunidade da paciente, mais elevada será a ocorrência de MN, podendo também estar relacionada aos elevados índices de persistência do HPV nessas pacientes. Essa tendência não se confirmou com a aplicação de testes estatísticos, possivelmente porque há reduzido contingente de indivíduos participantes da amostra. Por outro lado, Zimmermann et al.⁷ não encontraram associação entre os níveis de CD4+ e a ocorrência de neoplasia intraepitelial de baixo ou alto grau; os autores sugerem que isso pode ter ocorrido porque a resposta imunológica é muito complexa, e não deve ser avaliada apenas pela contagem de linfócitos CD4+. Ao analisar seus resultados, os autores relataram que o uso do tratamento antirretroviral poderia ter papel de interferência na evolução da expressão do HPV, contribuindo para seus achados. Em nosso estudo, não diferenciamos as pacientes segundo o tipo de terapêutica antirretroviral que recebiam; dessa forma é possível que, também, em nossa série, tivéssemos a interferência desta variável, dificultando a caracterização efetiva dessa associação.

O treinamento para reconhecimento de MN é de fácil obtenção, bem como o material envolvido é disponível em qualquer laboratório de citologia. Portanto, por ser o MN exame de fácil execução, baixo custo, excelente reprodutibilidade e interpretação simples, permitindo a informação do comportamento biológico da lesão, concordamos com os autores que, a partir de estudos semelhantes, afirmaram que o MN poderá ser uma opção a ser considerada na abordagem do paciente com lesão de colo^{20,21}.

Em face de nossos resultados, em que pese ao pequeno número de pacientes analisados, pudemos concluir que as pacientes HIV+ em fase de AIDS têm maior ocorrência de células micronucleadas do que a população controle e, também, a frequência com que são detectadas células micronucleadas parece se associar a piores condições clínicas da imunossupressão. Esses achados apoiam o proposto por Samanta et al.¹⁴, que consideram o MN importante biomarcador para identificar condições pré-neoplásicas muito antes do estabelecimento de seus primeiros sinais clínicos. O acompanhamento em longo prazo das pacientes envolvidas no estudo, bem como a interpretação de outras variáveis, tais como o uso de terapêutica antirretroviral, permitirá analisar se efetivamente aquelas com maior número de MN evoluirão para lesões cervicais mais frequentes e graves.

Referências

1. Valdespino Gómez VM, Valdespino Castillo VE. Perspectivas actuales en el estudio y en la atención de las pacientes con cáncer cervicouterino. *Ginecol Obstet Méx.* 2004;72(1):29-38.
2. Bernard HU. The clinical importance of nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32 (Suppl 1):S1-6.
3. Pinto AP, Túlio S, Cruz OR. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev Assoc Med Bras.* 2002;48(1):73-8.
4. Nicol AF, Pires AR, Souza SR, Nuovo GJ, Grinsztejn B, Tristão A, et al. Cell-cycle and suppressor proteins expression in uterine cervix in HIV/HPV co-infection: comparative study by tissue microarray (TMA). *BMC Cancer.* 2008;8:289.
5. Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Mukai M, Ono A, Iwata T, et al. Dominant human papillomavirus 16 infection in cervical neoplasia in young Japanese women; study of 881 outpatients. *Gynecol Oncol.* 2004;94(2):509-14.
6. Nobeyama H, Sumi T, Misugi F, Okamoto E, Hattori K, Matsumoto Y, et al. Association of HPV infections with prognosis after neoadjuvant chemotherapy in advanced uterine cervical cancer. *Int J Mol Med.* 2004;14(1):101-5.
7. Zimmermann JB, Melo VH, Castro LPF, Alves MJM, Zimmermann SG, Del Castillo DM. Associação entre a contagem de linfócitos T CD4+ e a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical diagnosticada pela histopatologia em mulheres infectadas pelo HIV. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006;28(6):345-51.
8. Spinillo A, Zara F, Zappatore R, Cesari S, Bergante C, Morbini P. Apoptosis-related proteins and cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Gynecol Oncol.* 2004;95(3):500-5.
9. Shimura M, Tanaka Y, Nakamura S, Minemoto Y, Yamashita K, Hatake K, et al. Micronuclei formation and aneuploidy induced by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 1999;13(6):621-37.
10. Coelho RA, Facundo MKF, Nogueira AL, Sakano CRSB, Ribalta JCL, Baracat EC. Relação entre o diagnóstico citopatológico de neoplasia intra-epitelial cervical e índices de células CD4+ e de carga viral em pacientes HIV-soropositivas. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(2):97-102.
11. Faria IM, Melo VH, Castro LPF, Faria FM, Carvalho NO, Araújo ACL, et al. Acuidade da citologia oncológica para o diagnóstico da infecção pelo HPV no colo uterino de mulheres portadoras do HIV. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008;30(9):437-44.
12. Follen M, Crain S, MacAulay C, Basen-Engquist K, Cantor SB, Cox D, et al. Optical technologies for cervical neoplasia: update of an NCI program project grant. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2005;3(1):41-53.
13. Pinto AP, Baggio HC, Guedes GB. Sexually-transmitted diseases in women: clinical and epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(3):241-50.
14. Samanta S, Dey P, Nijhawan R. Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. *Acta Cytol.* 2011;55(1):42-7.
15. Nersesyan AK. Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: a minireview. *Tsitol Genet.* 2007;41(5):317-8.
16. Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individual at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res.* 2001;489(2-3):147-72.
17. Husgafvel-Pursiainen K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat Res.* 2004;567(2-3):427-45.
18. Gandhi G, Kaur A. The micronucleus test in uterine epithelial cells of cervix cancer patients. *J Hum Ecol.* 2003;14(6):445-9.
19. Shimizu N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis.* 2011;26(1):119-23.
20. Gattás GJF, Longatto Filho A, Maeda MYS, Santos DR, De Andrea Filho A. Identificação de micronúcleos (MN) em células de colo uterino de pacientes assintomáticas: correlação dos métodos de Papanicolaou de Feulgen-fast-green. *Folha Méd.* 1992;104(3):57-9.
21. Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. *Diagn Citopathol* 2010 Dec 31. [Epub ahead of print]