

Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos

Apoptosis in exfoliated cells from the oral mucosa of individuals occupationally exposed to mutagenic and carcinogenic agents

José Roberto Cardoso Meireles¹, Maíza Alves Lopes², Nora Ney Alves³, Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira⁴

Resumo

As alterações indicativas de apoptose são potenciais marcadores genéticos na prevenção do câncer, uma vez que apontam efeitos genotóxicos. Neste estudo, foram avaliadas as freqüências de alterações indicativas de apoptose (picnose, cromatina condensada e cariorréxis) em células esfoliadas da mucosa oral de trinta indivíduos que lidam com substâncias químicas em laboratórios acadêmicos de pesquisa das áreas de Ciências Biológicas, Químicas e Farmacêuticas (grupo exposto-GE), comparando-as às obtidas em igual número de indivíduos sem história de exposição ocupacional a mutágenos (grupo controle-GC). As alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose foram significativamente mais freqüentes no GE ($p < 0,0001$). Esse resultado evidencia o efeito genotóxico de compostos químicos utilizados na pesquisa acadêmica e aponta para riscos à saúde dos indivíduos que estão sob este tipo de exposição ocupacional. Embora a maioria dos entrevistados tenha declarado uso de equipamento para proteção individual e/ou coletiva, a elevada freqüência de apoptose observada no grupo exposto revela a necessidade de implantação de programas de prevenção à exposição ocupacional nas universidades e supervisão do ambiente de trabalho dos seus laboratórios de pesquisa nas áreas amostradas nesse estudo.

Palavras-chave: Apoptose, Exposição ocupacional, Genotoxicidade, Neoplasias.

¹Biólogo da Universidade Estadual de Feira de Santana -Professor Auxiliar da Universidade do Estado da Bahia.

²Bióloga da Universidade Estadual de Feira de Santana.

³Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana - Professora Adjunta da Universidade Federal da Bahia.

⁴Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Trabalho realizado no Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Feira de Santana.

Endereço para correspondência: José Roberto Cardoso Meireles - Universidade Estadual de Feira de Santana - Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Genética Toxicológica - Av. Universitária, s/nº - 44031-460 - Feira de Santana/BA. E-mail: meireles@uefs.br

Abstract

Alterations indicative of apoptosis are potential genetic markers in the prevention of cancer, since they point to genotoxic effects. In this study, the frequencies of apoptotic alterations (pyknosis, condensed chromatin, and karyorrhexis) in exfoliated cells of the oral mucosa were evaluated in two groups of 30 individuals each. The exposed group consisted of individuals who handled chemical substances in university biology, chemistry, and pharmacology research laboratories, and the control group included people with no history of occupational exposure to these substances. Nuclear alterations indicative of apoptosis were significantly more frequent in the exposed group ($p < 0.0001$). The result shows the genotoxic effect of chemical substances used in these areas of laboratory research and highlights the health risks for individuals with such occupational exposure. Although the majority of individuals in the exposed group reported using personal or collective protective equipment, the high frequency of apoptosis in the exposed group shows the need for programs to prevent occupational exposure in university laboratories, as well as for workplace supervision in such research facilities.

Key words: Apoptosis, Occupational exposure, Genotoxicity, Cancer.

INTRODUÇÃO

A exposição humana aos denominados agentes mutagênicos, efetivos em causar danos ao material genético, constitui uma das grandes preocupações no mundo atual. Tais agentes estão relacionados com o desenvolvimento de câncer, hoje considerado doença genética, uma vez que resulta de alterações em genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores de tumor), ou de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA^{1,2,3}.

O biomonitoramento de populações assim expostas pode ser feito através do uso de diferentes testes citogenéticos que avaliam os efeitos genotóxicos de mutágenos através da detecção de danos cromossômicos^{4,5,6} ou de fenômenos nucleares degenerativos que indicam a ocorrência de apoptose^{7,8,9,10}.

A apoptose é um processo geneticamente controlado de morte celular, ocorrendo em condições normais para eliminar células que não são mais necessárias ao organismo, ou em resposta à injúria genotóxica^{11,12}. Este processo tem, assim, papel essencial como mecanismo de proteção contra a carcinogênese por eliminar células geneticamente danificadas¹³. O reconhecimento de que o desenvolvimento de um tumor maligno envolve uma quebra no balanço entre a proliferação celular e a morte por apoptose é um dogma relativamente recente na biologia celular⁶.

Por outro lado, a frequência aumentada de alterações celulares relacionadas à apoptose é indicativa de

genotoxicidade, apontando para a necessidade de biomonitoramento de populações que estão expostas a mutágenos e carcinógenos^{7,8}. A análise dessas alterações, na avaliação dos efeitos genotóxicos da exposição a mutágenos físicos e químicos, tem se mostrado mais efetiva do que a análise de micronúcleos^{9,10,14,26}. Segundo Tolbert et al.⁸, a apoptose induzida por genotoxicidade pode ser um importante marcador da resposta a eventos da iniciação, relacionada ao processo de transformação maligna.

Fragmentação do núcleo (cariorréxis), condensação da cromatina e picnose são as alterações nucleares indicativas de apoptose^{7,8,15}. Tais alterações são bem visualizadas em células esfoliadas da mucosa oral, consideradas ferramentas efetivas para o biomonitoramento de populações expostas¹⁶.

Populações que são ocupacionalmente expostas a mutágenos têm merecido especial atenção dada a constância com que ocorre tal exposição, situação que é agravada nos indivíduos que adicionalmente são fumantes e/ou usuários de bebidas alcoólicas^{17,18,19}.

O hábito de fumar é o fator de risco para desenvolvimento do câncer bucal mais consistentemente apontado, particularmente quando associado à ingestão de bebidas alcoólicas¹⁸. A sinergia entre o hábito de fumar e a ingestão de bebidas alcoólicas na indução de tumores das vias aéreas superiores e do trato digestivo está bem documentada na literatura epidemiológica²⁰.

Neste estudo, foi avaliada a frequência de alterações nucleares indicativas de apoptose em indivíduos ocupacionalmente expostos a substâncias químicas em laboratórios de pesquisas biológicas, químicas e farmacêuticas.

MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra incluiu 60 indivíduos distribuídos em dois grupos: grupo exposto (GE) constituído por 30 indivíduos que lidam com substâncias químicas usuais nos laboratórios de pesquisa instalados nos Institutos de Farmácia, Biologia e Química da Universidade Federal da Bahia, e no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana e grupo controle (GC), constituído por 30 indivíduos sem história de exposição a genótoxicos que trabalham nos Institutos de Matemática e Letras, Escola de Dança, Faculdade de Educação da Universidade Federal da Bahia e em órgãos administrativos da Universidade Estadual de Feira de Santana.

A caracterização da amostra foi realizada pela aplicação de questionário contendo indagações a respeito de idade, sexo, hábitos de fumar e ingerir bebidas alcoólicas e exposição a produtos químicos e radiação.

Em relação ao hábito de fumar, foram considerados fumantes os indivíduos que fumavam regularmente pelo período de um ano ou mais e não-fumantes os abstinentes do hábito por no mínimo cinco anos e, evidentemente, aqueles que nunca fizeram uso do cigarro. Os indivíduos que não se enquadraram nestes critérios foram excluídos do estudo. Foram classificados como indivíduos que faziam ingestão de bebidas alcoólicas aqueles que bebiam pelo menos uma vez por semana.

PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS

As células da mucosa bucal, coletadas dos indivíduos expostos e controles, foram obtidas mediante raspagem gentil da mucosa utilizando lâminas para análise microscópica que foram previamente esterilizadas. O material assim coletado foi submerso em 8 ml de solução de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) e processado de acordo com protocolos sugeridos por Stich et al.²¹ e Gattás et al.²². Após 24 horas, as preparações foram coradas de acordo com o método de Feülgen e Rossenbeck e contra-coradas com *fast green* a 1% em álcool absoluto por 1 minuto. Toda a análise foi realizada por um único observador, em teste cego, com relação aos dados do questionário. Um mínimo de 1000 células foi considerado adequado para análise, sendo computadas por campo todas as células distintamente individualizadas, com citoplasma íntegro, apresentando ou não alterações indicativas de apoptose¹⁰. Os critérios adotados para identificação das alterações indicativas de apoptose foram os descritos por Tolbert et al.⁸, sendo a apoptose inferida pelo somatório de cariorréxis, cromatina condensada e picnose. A cariorréxis foi

identificada pela presença de inúmeros corpúsculos Feülgen positivos, revelando a ocorrência de fragmentação nuclear. As células apresentando cromatina anormalmente distribuída (ao redor da superfície interna do núcleo, concentrada no centro deste ou disposta em granulações grosseiras) foram computadas como cromatina condensada. A condensação extrema da cromatina, associada à redução substancial do tamanho nuclear, foi indicativa de picnose.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da diferença entre os grupos relativa à idade foi realizada com uso do teste t de *Student*. Diferenças entre os grupos, quanto ao sexo e aos hábitos de fumar e/ou ingerir bebidas alcoólicas, foram avaliadas com o uso do teste de qui-quadrado. A análise relativa à ocorrência de alterações indicativas de apoptose foi realizada utilizando o teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros²³. Em todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%.

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto da pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, parecer 1120/2002).

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

As médias de idade obtidas, nos grupos exposto ($c = 31,13$) e controle ($c = 38,30$), não foram significativamente diferentes: $t = 0,564$; G.L. = 58; $p > 0,05$. Não foi também observada diferença quando avaliada a distribuição de homens e mulheres entre os grupos exposto (17 mulheres e 13 homens) e controle (18 mulheres e 12 homens): $c^2 = 0,326$; G.L. = 1; $p > 0,20$.

No grupo exposto, 5 indivíduos foram classificados como fumantes e 25 como não-fumantes. O grupo controle foi constituído por 10 pessoas fumantes e 20 não-fumantes. Dez indivíduos do grupo exposto e 9 do grupo controle informaram ingerir bebida alcoólica. O teste de qui-quadrado revelou não haver diferença no número de indivíduos fumantes e que ingeriam bebidas alcoólicas entre os grupos ($p > 0,10$ e $p > 0,70$; respectivamente). Entretanto, em cada grupo, a quantidade de cigarros consumidos por dia foi maior entre os homens, além destes referirem, mais frequentemente, hábito de ingerir bebidas de maior teor alcoólico, como uísque e vodka do que as mulheres, entre as quais a bebida mais frequente foi a cerveja.

As informações obtidas no questionário revelaram que a grande maioria dos indivíduos do grupo exposto estava sujeita, no ambiente de trabalho, a mais de um tipo de

composto químico (Tabela 1). Apenas 1 indivíduo referiu exposição exclusiva à naftalina. Não foram informadas outras formas de exposição a genotóxicos. A maioria dos indivíduos expostos (90%) informou utilizar equipamento para proteção individual (luva, guarda-pó, óculos e máscara) e coletiva (capela) no manuseio dos compostos químicos. Apenas 3 pessoas manuseavam as substâncias sem proteção.

Tabela 1. Substâncias encontradas nos laboratórios de pesquisa visitados

Substância	Nº de expostos	Substância	Nº de expostos
Ácido acético	8	Clorofórmio	4
Ácido clorídrico	2	Diclorometano	1
Ácido nítrico	4	Éter	4
Ácido sulfúrico	3	Fenol	6
Acetato de etila	1	Formaldeído	1
Acetona	1	Formol	11
Acetonitrila	2	Fucsina	6
Álcool etílico	3	Hexano	3
Álcool metílico	11	Mercúrio	2
Amônia	2	Naftalina	7
Anidridos	2	Peróxido de hidrogênio	1
Benzeno	3	Sílica	1
Brometo de etídio	1	Xilol	4

ANÁLISE CITOLÓGICA

Os resultados referentes à análise das células sem alterações e daquelas apresentando alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose (cariorréxis, picnose e cromatina condensada - figuras 1, 2 e 3, respectivamente) são apresentados na Tabela 2.

A avaliação da ocorrência de apoptose (inferida pelo somatório de cariorréxis, picnose e cromatina

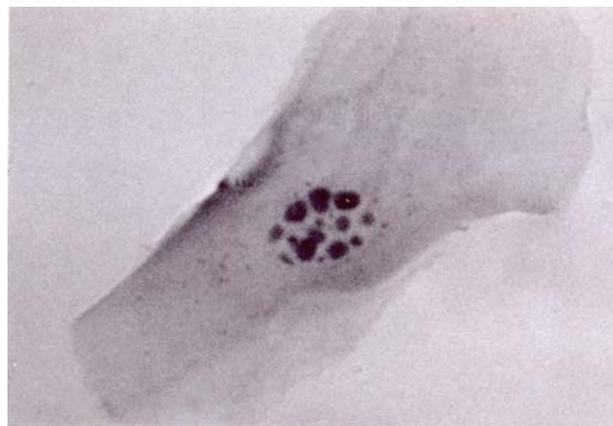


Figura 1. Fotomicrografia de uma preparação de células esfoliadas da mucosa oral corada pelo método Feülgen/Fast-green. Célula apresentando cariorréxis. Aumento 1000X. Microscópio Zeiss

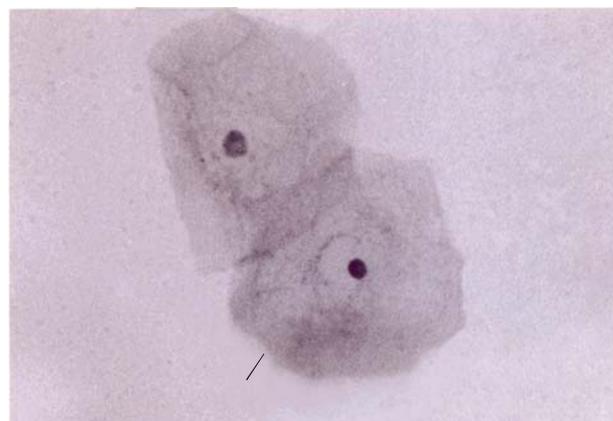


Figura 2. Fotomicrografia de uma preparação de células esfoliadas da mucosa oral corada pelo método Feülgen/Fast-green. Célula apresentando picnose. Aumento 1000X. Microscópio Zeiss

condensada) revelou que este fenômeno foi significativamente mais frequente no grupo exposto ($p < 0,0001$). A apoptose foi também significativamente maior entre os indivíduos expostos que informaram não ingerir bebidas alcoólicas e/ou fumar quando comparados com controles abstêmios ($p < 0,0001$, Tabela 3).

Nos indivíduos que faziam uso do cigarro e/ou de bebida alcoólica, em ambos os grupos amostrais, a ocorrência de apoptose foi maior entre os que fumavam e/ou bebiam ($p < 0,0001$, Tabela 4) e foi, também, significativamente maior entre os homens ($p < 0,001$).

Tabela 2. Freqüência de apoptose e dos endpoints analisados nos grupos

	Total de células	C. condensada	Cariorréxis	Picnose	Apoptose ^{a,b}
GE	81.168	1.728	2.587	712	5.027
GC	49.185	719	627	100	1.446
Total	130.353	2.447	3.214	812	6.473

a Σ Cromatina condensada, cariorréxis, picnose

b $p < 0,0001$

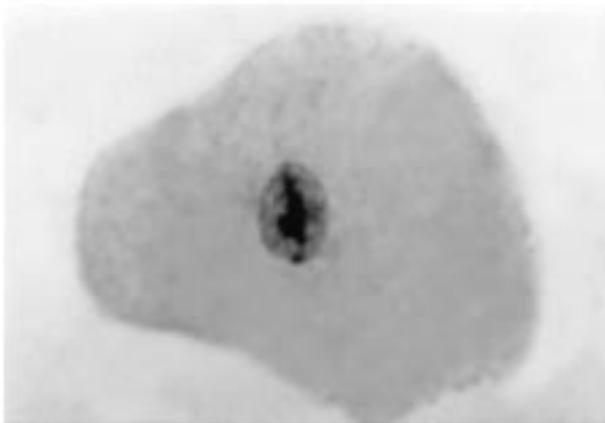


Figura 3. Fotomicrografia de uma preparação de células esfoliadas da mucosa oral corada pelo método Feülgen/*Fast-green*. Célula apresentando cromatina condensada. Aumento 1000X. Microscópio Zeiss

Tabela 3. Apoptose nos indivíduos sem história de exposição ao cigarro e/ou álcool dos grupos controle (GC) e exposto (GE)

Grupo	N	Apoptose ^{a,b}	Total de células
Exposto	17	2.377	40.876
Controle	17	349	27.438
Total	34	2.726	68.314

a Σ Cromatina condensada, cariorréxis, picnose

b $p < 0,0001$

DISCUSSÃO

As alterações nucleares indicativas de apoptose induzidas por agentes genotóxicos são consideradas por Tolbert et al.⁸ como potenciais marcadores do processo de iniciação da transformação maligna. A identificação de tais alterações, segundo Fenech²⁴, é relevante para uma acurada descrição do mecanismo de ação desses agentes e da sensibilidade celular a seus efeitos.

A apoptose é um fenômeno biológico importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças¹⁶ e, portanto, fundamental para o desenvolvimento normal e homeostase dos tecidos, eliminando células não mais

necessárias ou aquelas geneticamente danificadas²⁵.

A análise da ocorrência de alterações nucleares relacionadas à apoptose tem sido realizada isoladamente ou em concomitância com a avaliação da frequência de danos cromossômicos. Cerqueira et al.¹⁰ relataram maior ocorrência de apoptose, mas não de micronúcleos, em células esfoliadas da mucosa oral de indivíduos submetidos a radiografias panorâmicas. Empregando a mesma metodologia, Torres-Bugarin⁹ e Freitas¹⁴ obtiveram resultados semelhantes, apontando para a maior susceptibilidade da resposta apoptótica em evidenciar a ação de agentes genotóxicos.

As alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose observadas neste estudo foram significativamente mais frequentes no grupo exposto. Este resultado evidencia o efeito genotóxico de compostos químicos utilizados na pesquisa acadêmica e aponta para riscos à saúde dos indivíduos que estão sob este tipo de exposição ocupacional.

Os efeitos genotóxicos dessa exposição ficam bem evidenciados quando feita a comparação da ocorrência de apoptose entre os indivíduos expostos e controles que informaram não serem fumantes ou usuários de bebidas alcoólicas. A maior frequência de apoptose observada nos expostos abstêmios fortemente sugere sua associação com a exposição aos genotóxicos no ambiente de trabalho.

Efeitos adicionais dos hábitos de fumar e/ou de ingerir bebidas alcoólicas foram também evidenciados, uma vez que a frequência de apoptose foi maior entre os expostos que informaram esses hábitos do que entre expostos abstêmios de ambos os hábitos. Santos²⁶, avaliando os efeitos do hábito de fumar em agricultores expostos a agrotóxicos, relatou uma maior frequência de apoptose entre expostos fumantes, quer quando feita comparação com não-fumantes expostos ou comparando-os com fumantes do grupo controle.

A indução de apoptose em função exclusivamente dos hábitos de fumar e/ou de ingerir bebidas alcoólicas foi também detectada. Controles abstêmios apresentaram uma frequência significativamente menor de apoptose do que a

Tabela 4. Apoptose nos grupos (GE e GC) em função dos hábitos de fumar e/ou beber

GE	N	Apoptose ^{a,b}	Total de células	GC	N	Apoptose ^{a,b}	Total de células
Fuma e/ou bebe	13	2.650	40.292	Fuma e/ou bebe	13	417	21.747
Não fuma, não bebe	17	2.377	40.876	Não fuma, não bebe	17	349	27.438
Total	30	5.027	81.168	Total	30	766	49.185

a Σ Cromatina condensada, cariorréxis, picnose

b $p < 0,0001$

observada nos controles dos que fumavam e/ou bebiam.

O potencial carcinogênico dos produtos da combustão do tabaco, provavelmente, se deve à indução de mutações que, acontecendo em genes que codificam proteínas envolvidas com o controle da proliferação e diferenciação celular, ou com os mecanismos de reparo do DNA, levam à transformação maligna. Os efeitos genotóxicos do etanol, presente nas bebidas alcoólicas, e de seu principal metabólito, o acetaldeído, têm sido analisados em sistemas *in vivo* e *in vitro*. Em células humanas e de outros mamíferos, *in vitro*, o etanol induz mutação gênica e trocas entre cromátides irmãs em linfócitos humanos na presença da enzima álcool desidrogenase¹⁹. Os resultados obtidos, no presente estudo, sugerem que componentes do cigarro, associados a metabólitos do álcool, atuam na indução da via apoptótica. Esses resultados também revelam que as alterações nucleares indicativas de apoptose são excelentes indicadores de injúria celular induzida pelo álcool e por agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos presentes na fumaça do cigarro.

A ocorrência de apoptose entre homens e mulheres, em cada grupo amostral, foi estatisticamente mais elevada nos indivíduos do sexo masculino. Possivelmente, este resultado se deve ao maior número de cigarros consumidos por dia e ao maior teor alcoólico das bebidas consumidas, ambos pelos homens. Estudos objetivando especificamente avaliar os efeitos genotóxicos desses hábitos poderão resultar em dados mais conclusivos a este respeito.

As pessoas que manipulam compostos químicos no seu ambiente de trabalho, em geral, estão expostas a diversos deles, ainda que não tenham contato direto, o que dificulta a avaliação isolada dos efeitos mutagênicos de um dado composto. Assim, a maioria dos estudos nesta linha de pesquisa tem investigado a ação mutagênica de uma "mistura" de compostos^{27,28}.

É importante destacar que, embora a maioria dos entrevistados tenha declarado uso de equipamento para proteção individual e/ou coletiva, a elevada frequência de apoptose observada no grupo exposto aponta para a necessidade de implantação de programas de prevenção à exposição ocupacional nas universidades e supervisão do ambiente de trabalho dos seus laboratórios de pesquisa nas áreas amostradas por esse estudo.

REFERÊNCIAS

1. Fearon ER, Haber DA. The promise of cancer genetics. *Lancet*. 1998 May;351 Suppl 2:S11-8.
2. Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet*. 2003; 33:238-44.
3. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*. 1991;31:3075-79.
4. Agostini JMS, Otto PA, Wajntal A. Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes from at-risk groups. *Rev Bras Genet*. 1996;19:641-6.
5. Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Mikoczy Z, Lando C, Hansteen I, et al. Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: A report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Mutat Res*. 1998;405:171-8.
6. Majer BJ, Laky B, Knasmüller, S, Kassie, F. Use of The micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res*. 2001; 489:147-72.
7. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users. *Am J Epidemiol*. 1991;134:840-50.
8. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992; 271:69-77.
9. Torres-Bugarín O, De Anda-Casillas A, Ramírez-Muñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res*. 1998;413:277-81.
10. Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res*. 2004;562:111-17.
11. Miller ML, Andringa A, Dixon K, Carty MP. Insights into UV-induced apoptosis: ultrastructure, trichrome stain and spectral imaging. *Micron*. 2002;33:157-66.
12. Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp B, Bursch W. Dose-response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis. *Mutat Res*. 2000;464:13-8.
13. Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK, Siddiqi M. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat Res*. 2003;9457:1-9.
14. Freitas VS, Lopes MA, Meireles JRC, Reis L, Cerqueira EMM. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Rev Baiana Saúde Pública*. 2005; 29:189-99.
15. Kawashimaa K, Doib H, Itoa Y, Shibataa M, Yoshinakaa R, Otsukia Y. Evaluation of cell death and proliferation in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci*. 2004;35:17-23.
16. Salama SA, Serrana M, Au WW. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutat Res*. 1999;436:99-112.

17. Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol.* 2000;36:387-9.
18. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnahulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in Young people: a comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001;37:401-18.
19. Maffei F, Forti GC, Castelli E, Stefanini GF, Mattioli S, Hrelia P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res.* 2002;514:49-58.
20. De Flora S, D'Agostini F, Balansky R, Camoirano A, Bennicelli C, Bagnasco M, et al. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003;9478:1-16.
21. Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer.* 1982;30:553-9.
22. Gattás GJF, Longatto Filho A, Maeda MYS, Santos DR, Andréa Filho A. Identificação de micronúcleos em células do colo uterino de pacientes assintomáticas: Correlação dos métodos de Papanicolau e Feulgen-fast-green. *Folha Med Bras.* 1992; 104:57-9.
23. Bragança-Pereira CA. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues, MALR, Maonteleone Neto R. *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação.* São Paulo: Editora da Sociedade Brasileira de Genética; 1991. p. 113-21.
24. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000;455:81-95.
25. Kajiwara K, Saito A, Ogata S, Tanihara M. Synthetic peptides corresponding to ligand-binding region of death receptors, DR5, Fas, and TNFR, specifically inhibit cell death mediated by the death ligands, respectively. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1699:131-7.
26. Çelik A, Çavas T, Ergene-Gözükara S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis.* 2003;18:417-21.
27. Schoket B, Poirier MC, Mayer G, Török G, Kolozsi-Ringelhann A, Bognár G, et al. Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutat Res.* 1999;445:193-203.
28. Testa A, Ranaldi R, Carpineto L, Pacchierotti F, Tirindelli D, Fabiani L, et al. Cytogenetic biomonitoring of workers from laboratories of clinical analyses occupationally exposed to chemicals. *Mutat Res.* 2002;520:73-82.