

Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal

Micronucleus Assay – A Biomarker Of Genotoxic Damage In Exfoliated Oral Mucosa Cells

CARRARD, Vinicius Coelho*
 COSTA, Cynthia Hernandez**
 FERREIRA, Luciana Adolfo***
 LAUXEN, Isabel da Silva****
 RADOS, Pantelis Varvaki*****

RESUMO

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão de literatura a respeito do ensaio dos micronúcleos, explicando o seu significado e sua aplicação em células esfoliadas da mucosa bucal. Micronúcleo (MN) é um núcleo acessório, originado a partir de fragmentos de cromossomo ou de cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose. MNs surgem por alterações genéticas espontâneas ou são induzidos por agentes genotóxicos. A análise dos micronúcleos tem sido utilizada como uma ferramenta importante de biomonitoramento de populações. Estudos demonstram que consumidores de fumo e álcool, assim como grupos expostos a determinados agentes em função de sua ocupação ou estilo de vida apresentam um elevado número de MNs nas células bucais esfoliadas.

PALAVRAS-CHAVE:

Testes para micronúcleos. Dano do DNA. Quebra cromossômica. Citologia. Mucosa bucal

Micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmento de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose (RIEGER, 1968; SCHMID, 1975; RAMIREZ; SALDANHA, 2002). Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais (RIEGER, 1968) ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase. Os MNs podem ser únicos ou múltiplos e segundo Tolbert; Shy e Allen (1992) devem preencher os seguintes critérios:

1. Estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal;
2. Borda evidente, sugerindo membrana nuclear;
3. Ter formato arredondado;
4. Localização intracitoplasmática;
5. Diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal;

Os critérios 1, 2 e 3 tem a intenção de excluir das contagens estruturas não relacionadas a dano genotóxico, como os grânulos de ceratohialina, que aparecem em células esfoliadas em função do processo de maturação epitelial, especialmente em tecidos ceratinizados

ou parcialmente ceratinizados como a mucosa bucal (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992).

Embora os mecanismos de reparo celular sejam extremamente eficientes, a sensibilidade da estrutura cromossômica permite a atuação de agentes clastogênicos e aneugênicos durante a mitose e a meiose. Agentes clastogênicos são aqueles capazes de provocar quebra cromossômica, enquanto aneugênicos são aqueles que podem interferir no fuso mitótico (SARTO et al., 1987; BLOCHING et al., 2000; MAJER et al., 2001; SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; RAMIREZ; SALDANHA, 2002). A atuação desses agentes, dentre outras formas, é responsável pela origem das aberrações cromossômicas estruturais e numéricas. Quando essas aberrações ocorrem em células somáticas, podem levar à formação de uma neoplasia (RAMIREZ; SALDANHA, 2002).

A presença de MNs em células esfoliadas da mucosa bucal reflete os eventos genotóxicos que ocorreram em células que estavam na camada basal do epitélio 1-3 semanas antes da obtenção dos esfregaços (STICH; ROSIN, 1983). A detecção de MNs em citologia esfoliativa deve ser interpretada como resultante da exposição recente a carcinógenos (BLOCHING et al., 2000) ou o reparo frente

a erros espontâneos durante a duplicação do DNA. Existe uma grande variação inter-individual (de até 17 vezes) na ocorrência de MNs. Isso pode ser reflexo de fatores genéticos ou da ação de agentes genotóxicos não identificados (STICH; ROSIN, 1983).

As causas dessa variabilidade não estão claras e são necessários mais estudos a fim de entendê-las. Ainda assim, o aumento da fMN em estudos controlados deve ser encarado como reflexo da atuação de agentes clastogênicos/genotóxicos.

Outras alterações nucleares chamadas metanucleares podem ser identificadas quando se estuda MNs. Tolbert; Shy e Allen (1992) propuseram, que as mesmas também fossem levadas em conta na medida em que representam diferentes fenômenos celulares degenerativos e/ou adaptativos próprios do tecido epitelial. Esses fenômenos sofrem influência de processos inflamatórios, do processo de reparo e até mesmo da intensidade da raspagem. Essas alterações, às vezes, se assemelham morfológicamente aos MNs, e não considerá-las poderia levar a interpretações incorretas (SARTO et al., 1987; TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992; CASARTELLI et al., 2000).

As alterações descritas por Tolbert; Shy e Allen (1992) são as seguintes (Figura 1):

* Doutorando e Mestre em Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia / UFRGS

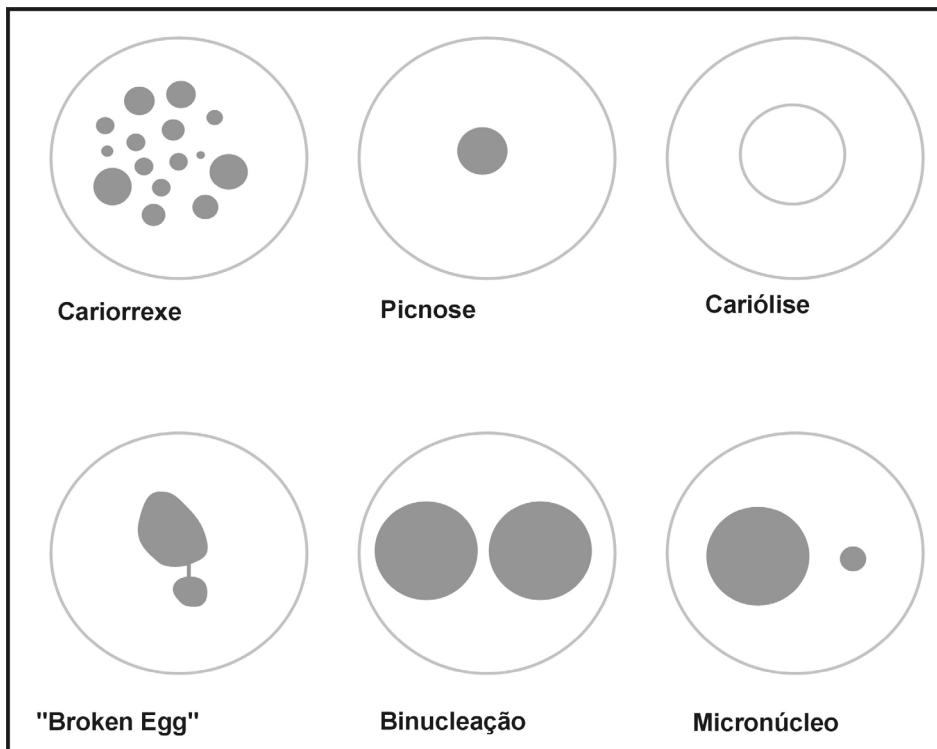
** Estudante de Graduação em Biomedicina – Centro Universitário Feevale

*** Estudante de Graduação em Ciências Biológicas – Centro Universitário Metodista IPA. Técnica em Patologia Clínica – E. E. Técnica em Saúde do HCPA.

**** Bióloga - Laboratório de Patologia Bucal/Faculdade de Odontologia-UFRGS

***** Doutor em Patologia – Professor de Patologia Geral e Buco-Dental das Faculdades de Odontologia da UFRGS e da PUCRS

Figura 1 - Desenho esquemático destacando o aspecto morfológico das alterações metanucleares (Adaptado por Bohrer, 2003 a partir de Tolbert, Shy, Allen, 1992).



tenko-Holland et al. (1996) recomendam que se faça um bochecho prévio às coletas no sentido de se remover bactérias ou debris celulares que podem comprometer as leituras. A solução utilizada para estoque das células deve ser a mais inerte possível como, por exemplo, a solução salina 0,9% ou uma solução tampão em pH neutro (7,0). Este é um método de coleta já validado, que permite a obtenção de um alto número de células viáveis de forma não invasiva e bem tolerada pelo paciente (SARTO et al., 1987; CASARTELLI et al., 2000; CHEN et al., 2006).

Diferentes colorações permitem a identificação de micronúcleos. A técnica de Feulgen é a mais comumente empregada, sendo específica para o DNA que é corado em rosa. Pode ser associada à contra-coloração com Fast Green (SARTO et al., 1987; KARAHALIL et al., 1999; GATTAS et al., 2001), o que aumenta o contraste. A técnica de Feulgen é a mais indicada quando se tem como objetivo a quantificação de DNA, pois permite análise de ploidia e fração proliferativa (CHIECO; DERENZINE, 1999).

A coloração de May-Grünwald/Giemsa (MGG) vem sendo bastante utilizada para a identificação de MNs, pois tem custo mais baixo que a técnica de Feulgen. Esta coloração possibilita uma boa visualização do núcleo (Figura 2), sendo amplamente utilizada em exames de células sanguíneas, porém não é específica para a marcação de DNA (NERSESYAN et al., 2006).

Segundo Nersesyan et al. (2006) a utilização da técnica de MGG implica um risco elevado de falso-positivo, pois as alterações metanucleares ou mesmo os grânulos de cerato-hialina podem ser interpretados erroneamente como MNs. Essa consideração é especialmente importante quando se trabalha com células esfoliadas de boca, onde a ceratinização pode ser tanto processo fisiológico quanto uma característica adaptativa frente a agressões. Esses autores enfatizam que a avaliação de lâminas coradas com MGG deve ser bastante criteriosa, sendo recomendada preferencialmente a profissionais com experiência pregressa em avaliação de MNs com técnicas específicas para DNA. Outra alternativa é a coloração de Papanicolaou, pois permite a visualização dos MNs, ainda que seja uma coloração menos específica que as citadas anteriormente (ROBERTS, 1997). Contudo Ayyad et al. (2006), ao comparar esta técnica com a de MGG encontraram resultados satisfatórios afirmando inclusive que a técnica de Papanicolaou tornou a leitura das lâminas mais fácil, recomendando sua utilização para estudos de campo.

A identificação de MNs também pode ser feita por meio de técnicas que utilizam marcadores fluorescentes (MOORE et al., 1993),

- Cromatina condensada/núcleo picnótico - Correspondem ao aumento de intensidade da coloração do núcleo e redução de volume respectivamente. São fenômenos próprios da diferenciação e maturação epitelial, processo que culmina com a morte celular e descamação. Sua ocorrência aumenta frente à injúria celular, como a resultante do trauma crônico ou consumo de fumo.
- Células binucleadas - Células apresentando dois núcleos. Provavelmente não relacionadas a alterações do DNA, mas parecem estar envolvidas com atraso da divisão celular.
- Cariorrexe - Fragmentação do núcleo em pequenos corpos arredondados ou ovalados dentro do citoplasma intacto. É uma das etapas da morte celular, seja por apoptose, seja por necrose.
- Cariólise - Dissolução do núcleo caracterizada pela sua ausência. Etapa do processo de morte celular por necrose.
- "Broken Egg" (BE) ou brotos nucleares - Corpos arredondados de coloração semelhante a do núcleo, lembrando um MN, porém mantendo-se ligado ao núcleo por um filamento de cromatina. O significado de sua presença permanece incerto, mas segundo alguns autores os BE poderiam ser

precursores dos MN (MITCHELL; NORMAN, 1987). Essa hipótese se sustenta na constatação de que uma baixa fMN e BE são observadas em células de indivíduos normais e de que as mesmas aumentam em taxas similares com tratamento ou exposição à com agentes genotóxicos. (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001).

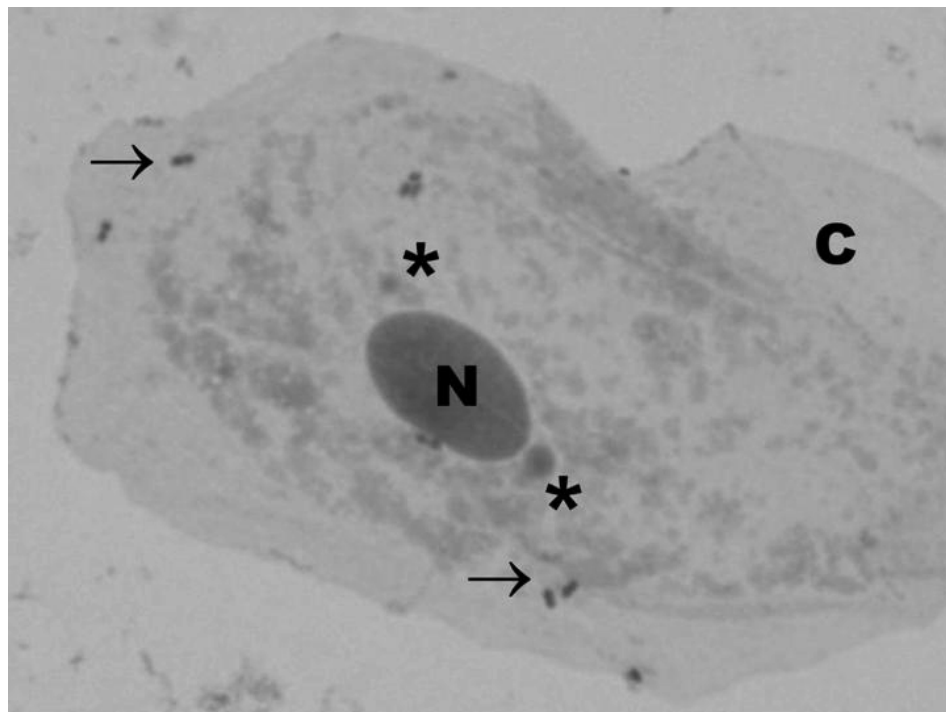
CONSIDERAÇÕES PRÁTICAS/METODOLÓGICAS

Uma série de técnicas podem ser utilizadas para estudar MNs, destacando-se a cultura de células e a citologia esfoliativa.

A utilização da citologia esfoliativa a partir de raspado de mucosas é uma técnica barata e simples quando comparada a cultura de células, o que permite o estudo em âmbito populacional (MAJER et al., 2001; AYYAD et al., 2006). O emprego do teste de MNs em células esfoliadas pode ser utilizado como dosímetro interno de dano em tecidos específicos (KARAHALIL et al., 1999). O epitélio bucal está em constante contato com agentes ambientais (genotóxicos), portanto é um sítio alvo importante para substâncias tóxicas inaladas ou ingeridas.

As células descamadas da mucosa bucal podem ser obtidas através de raspagem com o auxílio de espátulas de madeira, de plástico ou de cytobrushes (STICH; CURTIS; PARIDA, 1982; SARTO et al., 1987). Ti-

Figura 2 - Fotomicrografia de célula esfoliada da mucosa da borda da língua de paciente não exposto aos fatores de risco ao desenvolvimento de câncer de boca, indicando o citoplasma (C), o núcleo (N), micronúcleos (*) e grânulos de ceratohialina (setas). Lâmina corada com MGG. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal-Faculdade de Odontologia/UFRGS.



aos quais se atribui uma melhor capacidade de diferenciação das aberrações geradas por quebra cromossômica (agentes clastogênicos) daquelas que ocorrem por alteração do fuso mitótico (agentes aneugênicos).

Os estudos mostram uma diversidade considerável quanto ao número de células avaliadas, que vão de 500 (STICH; ROSIN, 1983), 1000 (STICH; CURTIS; PARIDA, 1982; DESAI et al., 1996; BLOCHING et al., 2000) até mais de 1000 células por lâmina (SARTO et al., 1987; TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992; BELIEN et al., 1995; KARAHALIL et al., 1999; GATTAS et al., 2001). Isso pode ser uma das fontes dos resultados controversos, pois, em indivíduos saudáveis não expostos a agentes genotóxicos, os MNs aparecem na proporção de aproximadamente 1-3 por 1000 células nucleadas. Diante desta constatação, seria importante que houvesse uma padronização do número de células a ser avaliado, permitindo que a comparação entre os estudos fosse realizada (BELIEN et al., 1995).

A quantificação dos MNs pode se dar pelo número total de MNs/número de células avaliadas por indivíduo, pela frequência de células micronucleadas (fMN) ou pela média de MNs por célula. Segundo Gattas et al. (2001) o número total de MNs é a forma mais recomendada para se avaliar as variações decorrentes da ação de agentes genotóxicos.

APLICAÇÕES EM CÉLULAS ESFOLIADAS DE BOCA

O estilo de vida é responsável pela exposição a agentes que produzem 80% das neoplasias (MAJER et al., 2001). Picker e Fox (1986) demonstraram haver uma relação direta entre aumento da ocorrência de MNs e consumo de alimentos condimentados com *curry*.

Stich; Curtis e Parida (1982) fizeram a análise dos micronúcleos em raspados da mucosa bucal de indivíduos fumantes. Este estudo e outros que o seguiram demonstraram que o consumo de fumo em suas diferentes formas provoca um aumento do número de MN (STICH; CURTIS; PARIDA, 1982; SARTO et al., 1987; TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992; SUHAS et al., 2004), o que se justifica pela elevada variedade de carcinógenos presentes. Entretanto, alguns autores não encontraram essa relação (KARAHALIL et al., 1999), o que pode ser reflexo de questões metodológicas como quantidade de cigarros consumida pelos indivíduos fumantes, critérios de avaliação ou, até mesmo, diferenças na capacidade de resposta das diferentes populações. Diante do que mostra a literatura, pode-se sugerir que o maior consumo de fumo (20 cigarros/dia) provoca dano irreversível em um maior número de células, tornando presentes alterações como cariorrexe, cariólise, cromatina condensada e picnose, em detrimento da diminuição da fMNs (SARTO et al., 1987).

Há estudos mostrando que o uso de tabaco provoca um aumento da fMN, especialmente quando associado ao consumo de etanol, havendo um efeito sinérgico que potencializa o aparecimento dos MNs (STICH; ROSIN, 1983). Reis et al. (2002) estudaram células esfoliadas da mucosa clinicamente normal de indivíduos alcoolistas observando que isoladamente o álcool também provoca um aumento da fMNs.

A avaliação dos MNs é um instrumento útil também no monitoramento de indivíduos expostos a agentes genotóxicos de natureza ocupacional ou ambiental (SARTO et al., 1987). Indivíduos expostos ao formaldeído (TITENKO-HOLLAND et al., 1996), a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (KARAHALIL et al., 1999) operadores de bombas de postos de combustíveis em contato com metanol (GATTAS et al., 2001) mostraram aumento do número de micronúcleos nas células bucais esfoliadas. Chen et al. (2006) demonstraram haver uma relação direta no aumento da fMNs e dos níveis de ozônio em residentes de cidades com variação sazonal na proporção atmosférica deste gás.

Stich e Rosin (1983) recomendam o teste dos MNs como método de avaliação do efeito de agentes quimioprotetores em pacientes expostos aos fatores de risco ao desenvolvimento de carcinoma de boca.

Alguns autores buscaram relacionar a ocorrência de MNs com o risco para desenvolvimento ou recorrência de carcinomas espinocelulares de boca. Ramirez e Saldanha (2002) observaram aumento da fMNs nas células bucais esfoliadas da mucosa adjacente à carcinomas de pacientes alcoolistas quando comparados aos da mucosa clinicamente normal do sítio contralateral ou aos da mucosa gengivo-labial. Bloching et al. (2000) e Casartelli et al. (2000) tiveram achados similares em raspados de carcinomas quando comparados a lesões pré-malignas e nessas quando comparadas à mucosa normal.

Por outro lado, ao contrário do que se poderia esperar, de Carvalho et al. (2002) não encontraram relação entre MN e evolução clínica de pacientes tratados de carcinoma de boca ou de faringe.

Ainda que tenham encontrado resultados que podem atribuir aos MNs um valor preditivo no que diz respeito à cancerização, Casartelli et al. (2000) sugerem que a sua avaliação não deve ser utilizada isoladamente como marcador de alterações pré-malignas que podem progredir para carcinomas, pois as distribuições e fMNs variam muito individualmente. Até mesmo a intensidade de força empregada durante as raspagens poderia ser uma das fontes de variabilidade, pois é um aspecto de difícil padronização. Em fun-

ção disso, sugerem que outros marcadores sejam explorados na intenção de utilizá-los em combinação com a técnica dos MNs a fim de se obter um maior valor preditivo.

Fenech et al. (1999) apontam que a utilização da técnica dos MNs em células esfoliadas de diferentes tecidos é um campo promissor, mas chamam a atenção para necessidade da padronização dos protocolos, da comparação dos resultados de diferentes laboratórios e do estudo desse fenômeno nos diferentes tecidos, a fim de que sejam encontradas as fontes da variabilidade dos resultados.

Como o período de renovação do epitélio bucal é de aproximadamente 25 dias (SQUIER; FINKELSTEIN, 1998), a formação de MNs deve ser considerada um dano citogenético agudo e local (SUHAS et al., 2004). Estudos longitudinais de análise da genotoxicidade de diferentes agentes ambientais ou iatrogênicos deveriam ser conduzidos, a fim de determinar se os danos gerados são pontuais e transitórios ou incorporados e mantidos ao longo das divisões celulares, o que se somaria à teoria da carcinogênese, que pressupõe danos cumulativos (SUHAS et al., 2004).

Fatores como idade e sexo influenciam a ocorrência de MNs e devem ser considerados como variáveis nas pesquisas quando se compara grupos experimentais (FENECH, 2002). Fenech; Rinaldi (1994) chamam a atenção para o fato de a deficiência de folato e vitamina B12 provocarem um aumento da fMN. Dessa forma o estado nutricional deveria ser considerado nos estudos como um dos possíveis fatores de interferência nos resultados.

O teste de MNs é uma técnica rápida, eficiente e econômica usada como indicador de genotoxicidade, permitindo análises quantitativas da ação de agentes genotóxicos. Além disso, sua análise em células esfoliadas contribui para avaliação citomorfológica das alterações genotóxicas diretamente na região afetada pelo agente estudado (AYYAD et al., 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formação de MNs é uma das formas que o organismo dispõe para se adaptar ao dano gerado por agentes exógenos ou endógenos mantendo a célula viável. Embora o aumento da fMNs seja usualmente decorrente da ação de agentes genotóxicos, sua ocorrência não deve ser interpretada como um evento necessariamente negativo. Os estudos que mostram uma relação inversa entre MNs e alterações metanucleares, como cariólise e cariorrexe (RAMIREZ; SALDANHA, 2002), sustentam essa hipótese, na medida em que essas alterações estão relacionadas à morte celular.

O aumento da fMNs não necessariamente se traduz na possibilidade de prever a possibilidade de transformação maligna, na medida em que a técnica não permite avaliar a importância dos fragmentos quebrados para a linhagem celular avaliada, tão pouco se o DNA presente no MN pode ou não ser transcrito. Por outro lado, se houver exposição sucessiva a agentes genotóxicos a capacidade de reparo do organismo fatalmente será suplantada, o que pode levar a fenômenos degenerativos capazes de gerar morte celular ou danos cumulativos no sentido da transformação maligna.

O teste dos MNs nas células descamadas do epitélio bucal é de grande aplicabilidade para o acompanhamento de pacientes de risco para câncer bucal e de análise do impacto de determinados agentes genotóxicos, como o fumo e o álcool na mucosa bucal. Além disso, o teste dos MNs parece ser uma ferramenta apropriada para identificar novos agentes ambientais tóxicos, informando a respeito da possibilidade de os mesmos serem genotóxicos.

ABSTRACT

The aim of this study is to summarise the literature on micronucleus assay, explaining its meaning and its application in exfoliated oral mucosal cells. Micronuclei (MN) is an extra nuclei, originated from chromosome fragments or whole chromosomes that are not included in the main nuclei during mitosis. MNs arise from spontaneous genetic damage or are induced by genotoxic agents. MN analysis has been used as an important tool to biomonitor populations exposed to life-style agents. Studies demonstrate that tobacco and alcohol users, as well as occupationally exposed groups present increased number of MNs in exfoliated oral mucosa cells. Despite the fact that the role of MN frequency has not yet been fully understood, the MNs assay is considered to be an effective biomarker of oral squamous cell carcinoma risk factors effects.

KEYWORDS

Micronucleus tests. DNA damage. Chromosome breakage. Cytology. Oral mucosa

REFERÊNCIAS

- AYYAD, S. B. et al. Evaluation of Papanicolaou Stain for Studying Micronuclei in Buccal Cells under Field Conditions. *Acta Cytol.*, Chicago, v. 50, no. 4, p. 398-402, July/Aug. 2006.
- BELIEN, J.A. et al. Standardization of Counting Micronuclei: Definition of a Protocol to Measure Genotoxic Damage in Human Exfoliated Cells. *Carcinogenesis*, New York, v. 16, no.10, p. 2395-2400, Oct. 1995.

BLOCHING, M. et al. Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa to Predict the Relative Risk of Cancer in the Upper Aerodigestive Tract Using the MN-assay. *Oral Oncol.*, Oxford, v. 36, no. 6, p. 550-555, Nov. 2000.

BOHRER, P.L. **Avaliação das Alterações Citopatológicas da Mucosa Bucal Clinicamente Normal Exposta a Carcinógenos**. 2003. 94f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CARVALHO, M.B. Relationship between the outcome and the frequency of Micronuclei in Cells of Patients with Oral and Oropharyngeal Carcinoma. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 48, no. 4, p. 317-322, Oct./Dec. 2002.

CASARTELLI, G. et al. Micronucleus Frequencies in Exfoliated Buccal Cells in Normal Mucosa, Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, St. Louis, v. 22, no. 6, p. 486-492, Dec. 2000.

CHEN, C. et al. Cytogenetic Damage in Buccal Epithelia and Peripheral Lymphocytes of Young Healthy Individuals Exposed to Ozone. *Mutagenesis*, Oxford, v. 21, no. 2, p. 131-137, Mar. 2006.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen Reaction 75 Years on. *Histochem. Cell Biol.*, Berlin, v. 111, no. 5, p. 345-358, May 1999.

DESAI, S.S. et al. Cytogenetic Damage in Exfoliated Oral Mucosal Cells and Circulating Lymphocytes of Patients Suffering from Precancerous Oral Lesions. *Cancer Lett.*, Amsterdam, v. 109, no. 1-2, p. 9-14, Dec. 1996.

FENECH, M. Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer. *Drug Discov. Today*, Kidlington, v. 7, no. 22, p. 1128-1137, Nov. 2002.

FENECH, M. et al. The HUMAN MicroNucleus Project—An International Collaborative Study on the use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 428, no. 1-2, p. 271-283, July 1999.

FENECH, M.; RINALDI, J. The Relationship Between Micronuclei in Human Lymphocytes and Plasma Levels of Vitamin C, Vitamin E, Vitamin B12 and Folic Acid. *Carcinogenesis*, New York, v. 15, no. 7, p. 1405-1411, July 1994.

- GATTAS, G.J. et al. Frequency of Oral Mucosa Micronuclei in Gas Station Operators after Introducing Methanol. **Occup. Med.**, Philadelphia, v. 51, no. 2, p. 107-113, Mar. 2001.
- KARAHALIL, B. et al. The Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Cells: Application to Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 442, no. 1, p. 29-35, June 1999.
- MAJER, B.J. et al. 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.**, Amsterdam, v. 489, no. 2-3, p. 147-172, Dec. 2001.
- MITCHELL, J.C.; NORMAN, A. The Induction of Micronuclei in Human Lymphocytes by Low Doses of Radiation. **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.**, London, v. 52, no. 4, p. 527-535, Oct. 1987.
- MOORE, L.E. et al. Novel Biomarkers of Genetic Damage in Humans: Use of Fluorescence In Situ Hybridization to Detect Aneuploidy and Micronuclei in Exfoliated Cells. **J. Toxicol. Environ. Health**, London, v. 40, no. 2-3, p. 349-357, Oct./Nov. 1993.
- NERSESYAN, A. et al. Effect of Staining Procedures on the Results of Micronucleus Assays with Exfoliated Oral Mucosa Cells. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 15, no. 10, p. 1835-1840, Oct. 2006.
- PICKER, J.D.; FOX, D.P. Do Curried Foods Produce Micronuclei in Buccal Epithelial Cells? **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 171, no. 2-3, p. 185-188, Aug./Sept. 1986.
- RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. **Genet. Mol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 1, no. 3, p. 246-260, Sept. 2002.
- REIS, S.R. et al. Genotoxic Effect of Ethanol on Oral Mucosa Cells. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, no. 3, p. 221-225, July/Sept. 2002.
- RIEGER, R.M.A.; GREEN, M. M. **A Glossary of Genetics and Cytogenetics**. London: Allen and Unwin, 1968. P. 507 .
- ROBERTS, D.M. Comparative Cytology of the Oral Cavities of Snuff Users. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 41, no. 4, p. 1008-1014, July/Aug. 1997.
- SARTO, F. et al. The Micronucleus Assay in Exfoliated Cells of the Human Buccal Mucosa. **Mutagenesis**, Oxford, v. 2, no. 1, p. 11-17, Jan. 1987.
- SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 31, no. 1, p. 9-15, Feb. 1975.
- SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and Chromatid Buds are the Result of Related Genotoxic Events. **Environ. Mol. Mutagen.**, New York, v. 38, no.1, p. 38-45, July 2001.
- SQUIER, C.A.; FINKELSTEIN, M.W. Oral Mucosa. In: **Oral Histology: Development, Structure and Function**. St. Louis: Mosby, 1998. Cap. 16, p. 345-385.
- STICH, H.F.; ROSIN, M.P. Quantitating the Synergistic Effect of Smoking and Alcohol Consumption with the Micronucleus Test on Human Buccal Mucosa Cells. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 31, no. 3, p. 305-308, Mar. 1983.
- STICH, H.F.; CURTIS, J.R.; PARIDA, B.B. Application of the Micronucleus Test to Exfoliated Cells of High Cancer Risk Groups: Tobacco Chewers. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 30, no. 5, p. 553-559, Nov. 1982.
- SUHAS, S. et al. Application of the Micronucleus Test to Exfoliated Epithelial Cells from the Oral Cavity of Beedi Smokers, a High-Risk Group for Oral Cancer. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 561, no. 1-2, p. 15-21, July. 2004.
- TITENKO-HOLLAND, N. et al. Quantification of Epithelial Cell Micronuclei by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Mortuary Science Students Exposed to Formaldehyde. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 371, no. 3-4, p. 237-48, Dec. 1996.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: Methods Development. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 271, no. 1, p. 69-77, Feb. 1992.

Endereço para correspondência:
Pantelis Varvaki Rados

pantelis@ufrgs.br
Rua: Benjamin Constant, 1440 - Sala 302
90550-002 – Porto Alegre - RS