

## DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS, ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO, EM CÉLULAS CERVICAIS UTERINAS DE PACIENTES PORTADORAS DE HPV

LAURA BORBA VILANOVA<sup>\*</sup>  
RITA ALOMA PACKEISER VIANNA<sup>\*\*</sup>  
GUILHERME LUCAS DE OLIVEIRA BICCA<sup>\*\*\*</sup>  
MARILENE LUCAS DE OLIVEIRA BICCA<sup>\*\*\*\*</sup>  
BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA<sup>\*\*\*\*\*</sup>

### RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo investigar a frequência de alterações citogenéticas em células esfoliadas da mucosa cervical de mulheres portadoras do papilomavírus humano (HPV), através do teste de micronúcleo. Analisou-se a frequência de alterações nucleares (células micronucleadas – CMN; células com núcleos ligados – CNL; células binucleadas – CBI e mutações totais – MT) relacionando tais frequências com fatores não-ocupacionais, tais como idade, tabagismo, uso de contraceptivos orais, consumo de álcool, idade de início das relações sexuais e número de parceiros. O grupo *caso* apresentou uma frequência de CMN significativamente aumentada em relação ao *controle negativo* (2,33±2,00). A frequência de CNL relacionando fumantes e não-fumantes no grupo *controle negativo* também foi significativa (0,33±0,58). Para a utilização de contraceptivos orais também se obtiveram valores significativos para a presença de CMN (1,33±1,37), comparando usuárias nos grupos *caso* e *controle negativo*. Idade, consumo de álcool, idade de início das relações e número de parceiros não tiveram influência nos resultados. Portadoras de HPV apresentaram uma frequência aumentada de alterações nucleares, demonstrando que o método para detecção de micronúcleo é um procedimento acessível, não-invasivo, que permite a avaliação de mudanças significativas na mucosa cervical.

**PALAVRAS-CHAVE:** Papilomavírus humano 6. Neoplasias do colo uterino. Análise citogenética. Teste para micronúcleo.

### ABSTRACT

#### DETERMINATION OF THE FREQUENCY OF CYTOGENETIC ALTERATIONS BY MICRONUCLEUS TEST IN UTERINE CERVICAL CELLS OF PATIENTS WITH HPV

This study aims to investigate the frequency of cytogenetic alterations in exfoliated cells of the cervical mucosa of women with the human papillomavirus (HPV) through the micronucleus test. Method: the frequency of nuclear abnormalities (micronucleated cells, nucleus-bounded cells, binucleated cells, and total changes) was analyzed by relating these to non-occupational factors such as age, smoking, use of oral contraceptives, alcohol consumption, age at first intercourse and number of partners. The *case* group showed a frequency of CMN significantly increased compared to *negative control* (2.33 ± 2.00). The frequency of CNL relating smokers and nonsmokers in the *negative control* group was also significant (0.33 ± 0.58). For the use of oral contraceptives also obtained significant values for the presence of CMN (1.33 ± 1.37), comparing users in the *case* group and *negative control*. Age, alcohol consumption, age at onset of the relationship and number of partners did not influence the results. Carriers of HPV showed an increased frequency of nuclear abnormalities, demonstrating that the method for detecting a micronucleus procedure is accessible, noninvasive, which allows the assessment of significant changes in cervical mucosa.

**KEYWORDS:** Human papillomavirus 6. Uterine cervical neoplasms. Cytogenetic analysis. Micronucleus test.

<sup>\*</sup> Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande – FURG. E-mail: lbvilanova@gmail.com

<sup>\*\*</sup> Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas – UFPel; e-mail: packeiservianna@yahoo.com.br

<sup>\*\*\*</sup> Mestre em Saúde e Comportamento pela Universidade Católica de Pelotas – UCPel. E-mail: gbicca@yahoo.com.br

<sup>\*\*\*\*</sup> Mestre em Saúde e Comportamento pela UCPel; e-mail: secig@terra.com.br

<sup>\*\*\*\*\*</sup> Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes pela UFPel; e-mail: biahgr@ufpel.edu.br

**RESUMEN**  
**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS CAMBIOS CITOGENÉTICOS MEDIANTE**  
**ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LAS CÉLULAS CERVICALES UTERINAS DE PACIENTES**  
**CON HPV**

El objetivo del estudio fue investigar la frecuencia de los cambios citogenéticos en las células exfoliadas de la mucosa cervical de mujeres portadoras del papillomavirus humano (HPV), a través del ensayo de micronúcleos. Se analizó la frecuencia de anomalías nucleares (células micronucleadas - CMN, células con núcleos conectados - CNC; binucleados - CBI y las mutaciones en total - MT) en la relación de estas frecuencias con factores no profesionales, tales como la edad, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, el consumo de alcohol, la edad de la primera relación sexual y el número de parejas. El grupo *casos* tenía un aumento significativo en la frecuencia de CMN en relación con el *control negativo* ( $2,33 \pm 2,00$ ). La frecuencia de CNC relacionando las fumadoras y las no fumadoras en el grupo de *control negativo* también fue significativa ( $0,33 \pm 0,58$ ). Para el uso de anticonceptivos orales también se obtuvieron valores significativos para la presencia de CMN ( $1,33 \pm 1,37$ ), en la comparación de las usuarias en el grupo de *casos* y *control negativo*. La edad, el consumo de alcohol, la edad de iniciación sexual y el número de parejas no influyó en los resultados. Las portadoras de HPV mostraron una mayor frecuencia de anomalías nucleares, lo que demuestra que el método para detección de micronúcleos es un procedimiento accesible, no invasivo, que permite la evaluación de los cambios significativos en la mucosa cervical.

**PALABRAS CLAVE:** Papillomavirus humano 6. Neoplasias del cuello uterino. Análisis citogenéticas. Pruebas de micronúcleo.

## INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é um dos cânceres femininos mais frequentes, sendo sua incidência mundial estimada em cerca de 500.000 novos casos por ano e a taxa de sobrevivência global em cinco anos de 44 para 66% para todos os estágios clínicos<sup>1</sup>. O câncer invasor do colo uterino vem sendo o segundo câncer de maior ocorrência entre mulheres no mundo e o mais comum em países em desenvolvimento. No Brasil é a neoplasia maligna que mais acomete o trato genital feminino, constituindo-se em grande problema de saúde pública<sup>2</sup>.

Nas últimas décadas, o papel do papilomavírus humano – HPV – tem sido intensamente estudado, devido à sua íntima associação com a gênese de uma série de carcinomas, principalmente com relação aos do trato genital feminino<sup>3</sup>.

O câncer do colo do útero é considerado uma neoplasia que pode ser prevenida, uma vez que esses tumores têm progressão relativamente lenta e existe uma forma simples e, de certo modo, eficiente de detecção das lesões precursoras. Juntamente aos fatores genéticos, há também diversos fatores ambientais que também implicam nos processos neoplásicos<sup>1</sup>. Assim, pode-se dizer que em torno ao HPV orbitam vários fatores, tais como a idade, o hábito de

fumar, o uso de contraceptivos orais, o consumo de bebida alcoólica, número de parceiros e a idade de início das relações sexuais, que influenciam direta e indiretamente a instalação dessa neoplasia no epitélio escamoso cervical<sup>4</sup>.

A frequência de micronúcleo, bem como outras alterações genotóxicas, em células esfoliadas humanas pode ser utilizada como um “dosímetro endógeno”, presente em tecidos que são alvos específicos de agentes genotóxicos e carcinogênicos, nos quais os carcinomas irão se desenvolver. Esse teste apresenta uma série de vantagens, como: não necessitar de cultivo celular e preparações metafísicas, ser prático e de baixo custo<sup>5,6</sup>.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência de alterações citogenéticas em células esfoliadas da mucosa cervical de mulheres portadoras de HPV, através do teste de micronúcleo.

## MATERIAL E MÉTODO

As amostras coletadas e fornecidas por médico ginecologista constaram de dois grupos: um, denominado *caso*, composto por nove amostras de esfregaço da mucosa cervical de pacientes portadoras de HPV, e outro grupo, denominado *controle negativo*, composto por sete amostras de esfregaço de mucosa cervical de pacientes não portadoras de

HPV, mas que no passado tiveram histórico dessa doença (capturas híbridas positivas e negativas com grupos não especificados). O enquadramento das pacientes dentro de cada grupo foi feito de acordo com o histórico clínico de cada uma e através do exame de captura híbrida.

Todos os indivíduos analisados, portadores e não-portadores, foram do sexo feminino, com idade variando entre dezoito e quarenta e um anos. As pacientes responderam a um questionário, conforme protocolo publicado pela Comissão Internacional para Proteção Ambiental a Mutágenos e Carcinógenos – ICPEMEC – (1988), para obtenção de informações sobre exposição ocupacional e não-ocupacional, hábitos e dieta.

Os indivíduos foram identificados quanto à idade, hábito de fumar, uso de contraceptivo oral, hábito alcoólico, idade de início das relações sexuais e número de parceiros.

As amostras coletadas de células esfoliadas da mucosa cervical foram acondicionadas em frasco da Digene® contendo fixador (DNA Citoliq®), e mantidas sob refrigeração para citologia de base líquida. Após, no Laboratório de Genética, foram realizados os procedimentos de fixação, hidrólise e coloração de núcleo e citoplasma com reagentes de Feulgen e Fast-green, respectivamente.

A análise das lâminas, procedida de teste cego, foi feita em microscópio óptico comum, binocular, com objetiva de 100x e ocular de 10x, em imersão. Foram observadas 1000 células por indivíduo e os resultados foram expressos em número de células normais (CN), número de células micronucleadas (CMN), número de células com núcleos ligados (CNL), número de

células binucleadas (CBi) e número de mutações totais (MT).

Foram registradas somente células não-fragmentadas, não-sobrepostas e contendo o núcleo íntegro, utilizando os critérios para aceitar uma formação como micronúcleo<sup>5,6</sup>, em que este deve ter um contorno regular, redondo ou oval, e estar dentro do citoplasma de uma célula, deve ser Feulgen-positivo, de intensidade igual ou menor e ter a mesma textura e refração do núcleo principal, deve estar no mesmo plano de foco do núcleo principal e apresentar-se claramente separado do núcleo principal.

A análise estatística foi realizada utilizando-se teste não-paramétrico Mann-Whitney, com uma probabilidade em nível de 0,05 ou menor, para a diferença ser considerada significativa. Foram obtidas as médias, variância e desvio-padrão através dos dados registrados no programa SPSS 8.0 for Windows.

A investigação do presente trabalho realizou-se no Laboratório de Genética (LabGen) do Departamento de Zoologia e Genética (DZG) do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), tendo sido submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina dessa Instituição e aprovado, sob código de identificação 5.01.03.264.

## RESULTADOS

Das pacientes foram considerados idade, hábito de fumar, utilização de contraceptivo oral, hábito alcoólico, idade de início das relações sexuais e número de parceiros. Na Tabela 1 estão apresentadas tais características dos indivíduos caso e *controle negativo* para HPV, que fizeram parte deste estudo.

TABELA 1 – Caracterização das amostras de indivíduos do sexo feminino, *caso* e *controle negativo* para HPV.

Características	Caso n = 9	Controle negativo n = 7
Faixa etária	28,4 anos	25,1 anos
Variação	18 – 41	21 - 32
Fumantes	2 (22,22%)	4 (57,14%)
Não-fumantes	7 (77,78%)	3 (42,86%)
Usuárias de contraceptivo oral	6 (66,67%)	4 (57,14%)
Não-usuárias	3 (33,33%)	3 (42,86%)
Com hábito alcoólico	5 (55,56%)	4 (57,14%)
Sem hábito alcoólico	4 (44,44%)	3 (42,86%)
Início das relações sexuais	20,3 anos	16,6 anos
Variação	14 - 37	15 – 19
Número de parceiros	3,2	4,1
Variação	1 - 6	1 - 10

As médias dos dados de acordo com a frequência de células com anomalias nucleares, em 1000 células analisadas por indivíduo, *caso* e *controle negativo*, estão apresentadas na Tabela 2.

A partir desses dados, foi observado que para CMN, a diferença entre *caso* e *controle negativo* foi significativa ( $X=0,044$ ;  $p < 0,05$ ).

TABELA 2 – Média de anomalias nucleares – células com micronúcleo (CMN), células com núcleos ligados (CNL), células binucleadas (CBi) e mutações totais (MT) – analisadas em 1000 células por indivíduo dos grupos *Caso* e *Controle negativo* para papilomavírus humano (HPV)

Características	Caso n = 9			Controle negativo n = 7		
	X	V	DP	X	V	DP
CMN	2,33*	0 – 6	2,00	0,57	0 - 3	1,13
CNL	2,33	0 – 6	2,00	1,57	0 - 4	1,51
CBi	4,89	1 – 8	2,47	3,71	0 - 9	3,09
MT	9,56	2 - 16	4,42	5,86	1 - 16	5,18

\* Dado significativo na comparação Caso/Controle,  $p < 0,05$ /Mann-Whitney.  
X – média, V – variação, DP – Desvio-padrão

Em relação à idade, não foram evidenciadas diferenças significativas para anomalias genéticas entre indivíduos dos grupos *caso* e *controle negativo* com idade igual ou inferior a 25 anos, nem em idade superior a esta.

Em relação ao hábito de fumar (Tabela 3), não se verificou no grupo *caso* diferença significativa nas anomalias genéticas para pacientes fumantes e não-

fumantes. Quanto ao grupo *controle negativo*, foi encontrado valor significativo para CNL ( $X= 0,048$ ;  $p < 0,05$ ). Para a relação quanto ao uso de contraceptivo oral, no grupo *caso*, para usuárias do método, encontrou-se valor significativo para CMN ( $X=0,034$ ;  $p < 0,05$ ). No grupo *controle negativo* não houve diferença significativa para nenhuma das alterações, entre usuárias e não-usuárias de contraceptivo oral.

TABELA 3 – Médias do número de células com micronúcleo (CMN), células com núcleos ligados (CNL), células binucleadas (CBI) e mutações totais (MT), analisadas em 1000 células por indivíduo dos grupos *caso* e *controle negativo* para HPV, em relação ao hábito de fumo e uso de contraceptivo oral.

Amostra	CMN			CNL			CBI			MT		
	X	V	DP	X	V	DP	X	V	DP	X	V	DP
<b>Caso</b>												
Fumante n = 2	4,50	3-6	2,12	2,00	1-3	1,41	4,00	3-5	1,41	10,50	7-14	4,95
Não-fumante n = 7	1,71	0-4	1,60	2,43	0-6	2,23	5,14	1-8	2,73	9,29	2-16	4,64
Uso contraceptivo n = 6	<b>1,33*</b>	0-3	1,37	1,83	0-4	1,72	5,00	1-8	2,97	8,17	2-12	3,92
Não-uso contraceptivo n = 3	4,33	3-6	1,53	3,33	1-6	2,52	4,67	3-6	1,53	12,33	7-16	4,73
<b>Controle negativo</b>												
Fumante n = 3	0,33	0-1	0,58	<b>0,33*</b>	0-1	0,58	2,33	1-4	1,53	3,00	1-5	2,00
Não-fumante n = 4	0,75	0-3	1,50	2,50	1-4	1,29	4,75	0-9	3,77	8,00	2-16	6,06
Uso contraceptivo n = 4	1,00	0-3	1,41	2,25	0-4	1,71	4,75	0-9	3,77	8,00	2-16	6,06
Não-uso contraceptivo n = 3	0,00	0-0	0,00	0,67	0-1	0,58	2,33	1-4	1,53	3,00	1-5	2,00

\* Dado significativo para controle negativo,  $p < 0,05$ /Mann-Whitney.  
X – média, V – variação, DP – Desvio-padrão

Para o hábito de consumo alcoólico semanal, faixa etária de início das relações sexuais e número de parceiros, não foi verificada nenhuma diferença significativa para nenhuma das anomalias nucleares, em nenhum dos grupos.

## DISCUSSÃO

A aplicabilidade da técnica de micronúcleo tem se tornado um biomarcador prevalente para a exposição humana a agentes mutagênicos e clastogênicos e tem se apresentado sensível a baixos níveis de exposição, incluindo efeitos de exposição a químicos industriais e poluição atmosférica<sup>7</sup>.

A utilização da técnica de micronúcleo em células de colo uterino em esfregaços citológicos, com células em condições normais, em processos inflamatórios e

displásicos, foi realizada por Gattás e colaboradores<sup>8</sup>, que observaram um aumento na frequência de micronúcleo em células displásicas moderadas e severas em relação às displásicas leves e processos inflamatórios, ou seja, em todas as situações descritas, a contagem de micronúcleo foi superior à observada no material citológico normal. Resultado semelhante foi encontrado neste trabalho, no qual também foi observada maior frequência de MN em pacientes portadoras do HPV.

Vários fatores podem afetar a resposta das células, como idade, sexo, composição genética e fatores exógenos relacionado ao estilo de vida, como hábito de fumar, ingerir bebidas alcoólicas, uso de contraceptivos orais, dentre outros<sup>1,5,6,7,9</sup>.

De acordo com a distribuição dos indivíduos na frequência CMN, CNL, CBI e MT, observou-se que os indivíduos controle

negativo apresentaram as frequências mais baixas<sup>5,7,6</sup>. A comparação das médias do número de CMN dos grupos caso e controle negativo demonstrou uma diferença significativa no grupo caso, conforme evidenciado em outros estudos<sup>5,6,7,9,10</sup>. Nas demais anomalias nucleares, não houve diferenças significativas.

Relacionando a faixa etária das pacientes com a presença de anomalias nucleares, apesar de ter ocorrido um aumento destas nas pacientes do grupo caso em relação ao grupo controle negativo, não se verificou nenhuma diferença significativa entre os grupos, tanto para pacientes com idade inferior ou igual a 25 anos, quanto para idade superior a esta, o que está de acordo com outros estudos<sup>6,7,10</sup>. no entanto, há estudos<sup>5</sup> sugerindo que com o aumento da idade, há um aumento significativo de aneuploidias.

Entre as amostras de células de indivíduos fumantes, a frequência de CNL no grupo *controle negativo* apresentou-se com valor significativo quando comparado ao de amostras de indivíduos não-fumantes do mesmo grupo, o que vai de encontro a outro relato<sup>6</sup>. As demais alterações nucleares de indivíduos fumantes e não-fumantes nos grupos *caso* e *controle negativo* não foram significativas, resultados estes corroborados por outras pesquisas<sup>5</sup>, as quais relatam que os níveis de CMN e CBI não estavam relacionados ao hábito de fumo. Cerqueira e colaboradores<sup>10</sup> relataram que a ocorrência de MN apresentou-se mais alta em fumantes que em não-fumantes, em grupo de mulheres com exame citopatológico possivelmente positivo para infecção por HPV ou outras lesões cervicais, porém não foi evidenciada uma diferença estatisticamente significativa. Já Campos e colaboradores<sup>1</sup> verificaram um grande aumento na produção de MN em fumantes portadoras de HPV.

A utilização de contraceptivos orais, comparada aos grupos *caso* e *controle negativo*, apresentou frequência significativa para CMN, sendo este resultado esperado, de acordo com outras pesquisas<sup>1</sup>, sugerindo assim que a utilização de hormônios esteroides pode aumentar o poder oncogênico da infecção por HPV<sup>6</sup>. As demais alterações

não apresentaram resultado significativo.

Quanto ao consumo semanal de bebidas alcoólicas, não se encontrou nenhum resultado significativo, ao comparar os grupos com as anomalias nucleares, contrariando os resultados relatados em outros trabalhos<sup>6,7,10</sup>, mas corrobora pesquisa realizada por Dietz<sup>9</sup>. Porém, os estudos da associação do álcool e fumo como fatores de risco para vários tipos de câncer são controversos. Alguns autores mostram efeito de sinergismo, enquanto outros não encontram efeito genotóxico<sup>11,12,13,14</sup>.

Analisando a faixa etária de início das relações sexuais, não se encontrou nenhum resultado estatisticamente significativo, comparando os dois grupos com as anomalias nucleares, sendo este resultado também evidenciado por Campos e colaboradores<sup>1</sup>, porém encontrou-se maior número de todas as mutações em pacientes do grupo *caso* com idade menor ou igual a 17 anos que no grupo *controle negativo*.

Sobre o histórico do número de parceiros que as pacientes tiveram até a data da coleta das amostras, não se verificou nenhum resultado estatisticamente significativo, comparando os grupos com as anomalias nucleares, sendo o mesmo evidenciado em outras pesquisas<sup>1</sup>, porém todas estas se apresentaram maiores nos grupos *caso*, comparadas as do grupo *controle negativo*.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram que os indivíduos portadores de HPV apresentam frequência aumentada de células com micronúcleo, células com núcleos ligados, células binucleadas e, conseqüentemente, de mutações totais.

A frequência de células com micronúcleo é significativa para portadoras de HPV. Tal frequência em células micronucleadas no grupo *caso* está relacionada ao uso de contraceptivos orais, uma vez que foi verificado um valor significativo para essa relação.

Quanto à frequência aumentada de células com núcleos ligados no grupo

*controle negativo*, os resultados sugerem estar relacionada ao hábito de fumar.

Através do teste de micronúcleo, é possível identificar anomalias nucleares em tecidos que são alvos específicos de agentes genotóxicos e carcinogênicos, nos quais os carcinomas se desenvolvem. Assim, nossos resultados indicam que é possível utilizá-lo como um método prático, rápido e de baixo custo para a detecção de grupos de risco e prevenção do câncer uterino, porém os mesmos serão mais bem evidenciados com a realização de estudos em grupos amostrais maiores.

## REFERÊNCIAS

1. Campos LMF et al. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. *Medical Journal*. São Paulo. 2008. 126(6): 323-8.
2. Guarisi R et al. Rastreamento, diagnóstico e tratamento das lesões precursoras e do câncer invasor de colo uterino no município de Franco da Rocha, SP. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2004. 50(1): 7-15.
3. Roteli-Martins CM et al. Rastreamento de câncer de colo uterino em São Paulo: resultados parciais em 3.000 mulheres. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 2003. 15(4):12-16.
4. Pinto AP et al. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Revista da Associação Médica Brasileira*. São Paulo. 2002. 48(1):73-78.
5. Benites CI. Genotoxicidade ocupacional em trabalhadoras expostas a combustíveis derivados de petróleo. Monografia de conclusão de curso, Pelotas. 1999. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
6. Vianna RAP. Avaliação da genotoxicidade ocupacional em frentistas de postos de gasolina da cidade de Pelotas – RS. Monografia de conclusão de curso, Pelotas. 2000. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
7. Amado LL. Efeitos genotóxicos de derivados de petróleo pela exposição continuada em frentistas. Monografia de conclusão de curso, Pelotas. 2000. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
8. Gattás GJF et al. Identificação de micronúcleos (MN) em células esfoliadas de colo uterino de pacientes assintomáticas: correlação dos métodos de Papanicolaou e Feulgen-fast-green. *Revista A Folha Médica*. 1992. 104(3): 57-59.
9. Dietz J et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Revista da Associação Médica Brasileira*. São Paulo. 2000. 46(3): 207-11.
10. Cerqueira EMM et al. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix. *Acta Cytologica*. 1998. 42(3): 639-649.
11. Burgaz S et al. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. *Mutation Research*. 1995. 335: 163-169.
12. Majer BJ 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. *Mutation Research*. 2001. 489: 147-172.
13. Sarto F et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*. 1987. 2: 11-17.
14. Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *International Journal of Cancer*. 1983. 31: 305-308.

