

Avaliação de danos genotóxicos e citotóxicos em células da mucosa bucal de soldadores nas cidades de Cubatão e Santos, São Paulo

Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in buccal mucosa cells of welders in the cities of Cubatão and Santos, state of São Paulo, Brazil

Laiane Damara Oliveira do Vale¹, Victor Hugo Pereira da Silva²,
Flavio Rossi de Almeida¹, Daniel Araki Ribeiro², Daniela Martins da Silva¹

RESUMO | **Contexto:** Estima-se que no mundo existam, aproximadamente, 5 milhões de trabalhadores expostos ocupacionalmente à fumaça de soldagem. Níquel e Cromo são metais que podem ocasionar danos ao material genético, e soldadores, por força do ofício, são rotineiramente expostos a eles. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi investigar a frequência de danos citotóxicos e genotóxicos em células da mucosa bucal de um grupo de soldadores. **Métodos:** Um total de 44 indivíduos, distribuídos em 2 grupos — soldadores e não soldadores —, foi comparado utilizando a técnica do ensaio do micronúcleo e morte celular (picnose, cariorrhexe e cariólise) em células da mucosa oral de trabalhadores de soldagem. As células examinadas foram coradas com Feulgen/Fast-green. **Resultado:** Os soldadores apresentaram maior frequência ($p < 0,05$) de alterações indicativas de citotoxicidade quando comparados ao grupo de indivíduos não expostos a fumos metálicos. **Conclusão:** Os resultados deste estudo preliminar sugerem que soldadores apresentam maior frequência de danos citotóxicos e morte celular em células da mucosa bucal que trabalhadores não expostos.

Palavras-chave | micronúcleos com defeito cromossômico; dano no DNA; estresse oxidativo; genotoxicidade; morte celular.

ABSTRACT | **Context:** It is estimated that approximately 5 million workers are occupationally exposed to welding fumes worldwide. Nickel and Chromium are genotoxic metals found in welding fumes and thus welders are exposed to these metals at the working place. **Objective:** The objective of this study was to investigate the frequency of cytotoxic and genetic damage in cells harvested from the oral mucosa of welders and also from a group of workers not exposed to metallic fumes. **Methods:** A total of 44 individuals, divided into 2 groups — welders and not-welders — were compared using the micronucleus assay technique and cell death (pycnosis, karyorrhexis and karyolysis) in buccal mucosa cells of welding workers. The cells examined were staining with Feulgen/Fast-green. **Results:** Welders presented higher frequency ($p < 0.05$) of cytotoxicity than the group of volunteers who were not exposed to metallic fumes. **Conclusion:** The results from this preliminary study suggest that welders may have a higher frequency of cytotoxic damage in buccal mucosa cells than non-welding workers.

Keywords | chromosome-defective micronuclei; DNA damage; oxidative stress; genotoxicity; cell death.

Trabalho realizado na Universidade Paulista (UNIP), em parceria com a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Santos (SP), Brasil.

¹UNIP - Santos (SP), Brasil.

²Laboratório de Toxicogenômica, UNIFESP - Santos (SP), Brasil.

DOI: 10.5327/Z1679443520170012

INTRODUÇÃO

Estima-se que no mundo existam, aproximadamente, 5 milhões de trabalhadores expostos à fumaça de soldagem¹ em seus locais de trabalho.

Esses trabalhadores podem ser expostos ao Cromo (Cr) e ao Níquel (Ni) presentes nas fumaças provenientes de processos de solda metálica². Apesar dos metais e suas concentrações variarem dependendo do tipo de soldagem e do material a ser soldado, a presença desses elementos na composição é fundamental, já que garantem ao metal alta resistência à corrosão³.

Contaminantes ambientais — sejam físicos, biológicos ou químicos — possuem a capacidade de alterar e/ou lesionar o material genético humano, causando mutações⁴. Há diversas vias de exposição à contaminação ocupacional — como a dérmica e a por ingestão; na ocupação de soldador, a inalação é a principal rota de exposição⁵. Os efeitos da ação desses metais, como o Ni e o Cr (VI), podem ser diretos ou indiretos. Os primeiros compreendem a inibição enzimática, a quelação de elementos vitais e a ligação a grupos sulfidrilas em proteínas; e nos efeitos indiretos são comuns os processos de ativação de vias de sinalização NF- κ B, AP-1 e P53 e danos em biomoléculas por meio de danos oxidativos⁶. O Cr (VI) é uma forma encontrada nos processos de soldagem⁷ e que produz, nas células, formas intermediárias que implicam a reação de Fenton, que geram radicais livres por meio da interação dos metabólitos da água com os metais, podendo favorecer o surgimento de danos estruturais no DNA, como quebras de fita, aberrações cromossômicas e ligações cruzadas, bem como sinalizar as células para a morte⁸⁻¹⁰.

Diante do colocado, uma das profilaxias para diminuir a ocorrência de intoxicações ocupacionais é o monitoramento biológico¹¹. Há uma crescente busca por metodologias no intuito de se detectar e, por conseguinte, mensurar o risco corrido pelas populações humanas que estão expostas a diversos agentes cancerígenos, ou mesmo àqueles considerados suspeitos. Esses ensaios têm sido aplicados com sucesso para identificar fatores dietéticos, ocupacionais, ambientais e genéticos que causam impacto significativo sobre a estabilidade genômica¹².

O ensaio do micronúcleo na mucosa bucal é um biomarcador utilizado em testes de avaliação de eventos mutagênicos e citotóxicos por ser minimamente invasivo, podendo, assim, expressar o dano genético durante a divisão celular e outras alterações nucleares que refletem índices de morte celular, e

também por ser o epitélio oral uma das primeiras barreiras de contato com as substâncias por via oral ou inalatória^{13,14}.

O objetivo do presente estudo foi verificar a frequência de alterações de mutagenicidade e citotoxicidade em células da mucosa bucal de soldadores em razão da exposição a partículas metálicas geradas nos processos de soldagem.

MÉTODO

PARTICIPANTES DA PESQUISA

O estudo compreendeu uma amostra de 44 voluntários do sexo masculino, soldadores que trabalhavam em diversas metalúrgicas nas cidades de Cubatão e Santos, São Paulo, no período entre julho e setembro de 2016. A amostra foi dividida em dois grupos — expostos e não expostos a metais —, com 22 participantes cada. O grupo não exposto a metais foi selecionado considerando-se a situação ocupacional, dando preferência a profissionais de ensino, comércio, saúde e pesquisa, para evitar o contato com possíveis agentes de ação genotóxica estabelecida, na tentativa de reduzir fatores de conflito. Características individuais dos voluntários foram coletadas e estão detalhadas na Tabela 1. Foram incluídos neste estudo indivíduos que aparentavam boas condições de saúde, que não foram expostos a raios X nos 15 dias anteriores à coleta das amostras, que não utilizavam diariamente fármacos com finalidade terapêutica, que não possuíam lesões infecciosas e neoplásicas na mucosa bucal e sem histórico de neoplasia, tendo sido pareados de acordo com sexo, idade e hábitos tabagistas, sempre obedecendo aos mesmos critérios de inclusão, para garantir reprodutibilidade ao estudo. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em

Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos ocupacionalmente expostos e não expostos a metais, Cubatão-SP, 2016 (N=44).

Características	Soldadores (n=22)	Não soldadores (n=22)
Idade média (anos)	41,34	34,05
Horas trabalhadas/dia	8	7
Tempo de profissão em média (anos)	14,10	-
Uso do equipamento de proteção	20 (90,90%)	-

Pesquisa (CEP) da Universidade Paulista (UNIP) sob o Parecer nº 1.555.64 CAEE: 55441816.2.0000.5512.

COLETA DO MATERIAL, PREPARO DA LÂMINA E ANÁLISE

O teste do micronúcleo em células da mucosa bucal foi executado conforme a metodologia usada por Meireles et al.¹⁵ Foi solicitado a cada participante o enxágue prévio da mucosa com bochecho de água de torneira. Em seguida, utilizando uma espátula de madeira, o material foi coletado com leve fricção na mucosa jugal e o conteúdo celular foi depositado em tubo tipo Falcon — contendo soro fisiológico refrigerado —, sendo fixado em solução de ácido acético/metanol 3:1. No processo de coloração, as lâminas foram imersas em solução de HCl a 5 N durante 15 minutos, lavadas e deixadas em água destilada por 15 minutos e, posteriormente, coradas com o reagente de Schiff (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 90 minutos e contra-coradas com Fast-Green (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 1% durante aproximadamente 30 segundos. Após o processo de coloração, as lâminas foram desidratadas em três banhos de álcool absoluto e posteriormente clarificadas em dois banhos de xilol e montadas com lâminulas utilizando seladora Entellan

(Sigma). As lâminas foram examinadas em magnificação total de 400x para análise em microscópio, sendo avaliado um total de 1.000 células por indivíduo.

Os parâmetros adotados para contagem das células foram:

- células normais com núcleo oval ou redondo, com dimensão maior e com menor relação nuclear/citoplasmático — nessas células, nenhum outro conteúdo de DNA é observado além do núcleo;
- micronúcleos, que se distinguem pela presença de um núcleo principal e um ou mais núcleos menores, geralmente redondos, com diâmetro variando entre 1/3 e 1/6 do núcleo principal;
- picnose, caracterizada por um núcleo com menor tamanho, mas intensamente corado, com diâmetro que varia de 1/3 a 2/3 do núcleo das células normais;
- cariorrexe, aparecimento mais extenso de agregação cromatina nuclear, levando à fragmentação e à desintegração do núcleo; e
- cariólise, identificada pela perda completa do material genético e sua ausência, não sendo possível ver a coloração da reação de Feulgen, indicativa de processo tardio de morte celular¹⁶ (Figura 1).

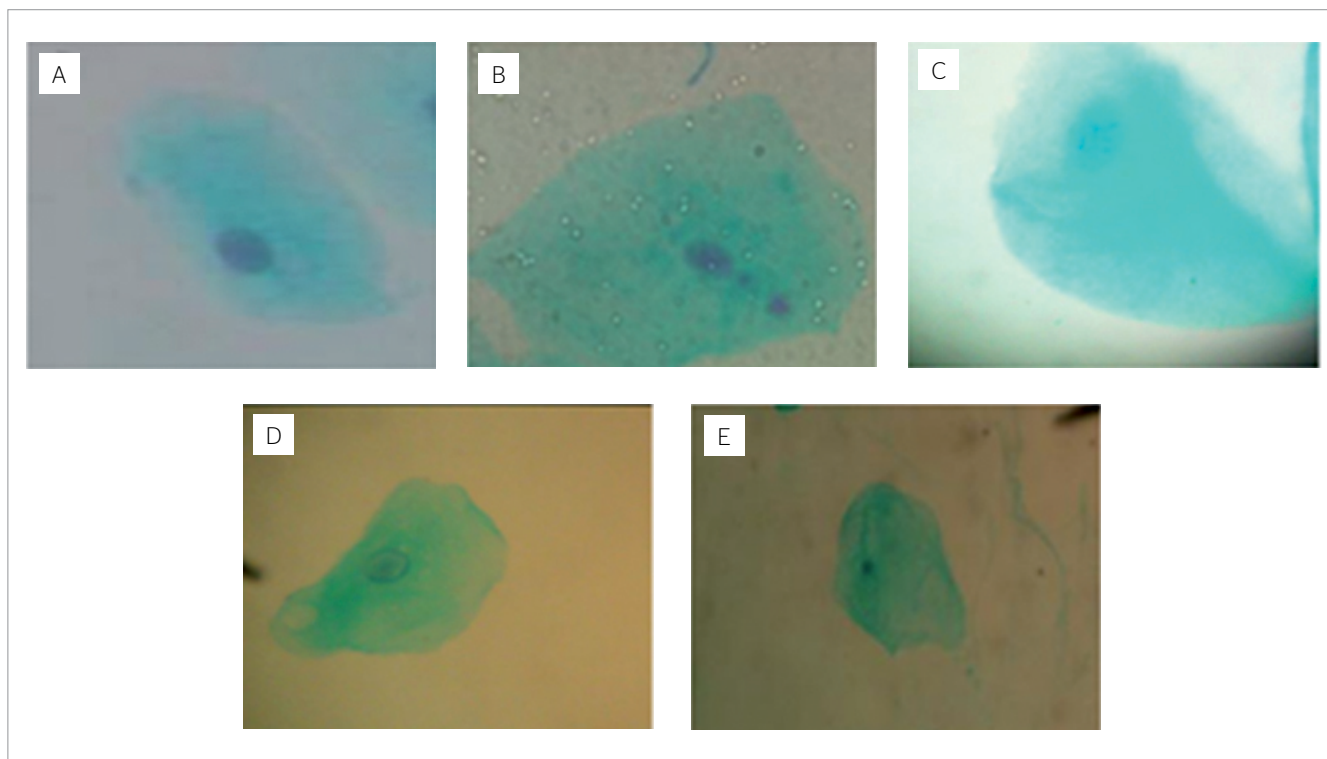


Figura 1. Alterações nucleares das células esfoliativas da mucosa bucal: (A) célula normal diferenciada, (B) célula com micronúcleo, (C) célula em cariorrexe, (D) célula em cariólise e (E) célula em picnose.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média (DP). A comparação entre grupos foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o *software* Graph Pad Prism versão 7.0.

RESULTADOS

Foram avaliadas as características dos sujeitos do estudo com relação à idade média, ao tempo de profissão e às horas trabalhadas por dia. Todos os indivíduos da pesquisa eram do sexo masculino; o grupo de soldados apresentou idade média um pouco maior que o grupo não exposto, e todos os soldados trabalhavam a mesma quantidade de horas por dia (Tabela 1).

Todos os parâmetros citotóxicos mostraram-se aumentados significativamente entre os voluntários do grupo exposto à soldagem. Com relação a células normais, soldados apresentaram menor média (963,40) quando comparados ao grupo não exposto (984,31). As alterações celulares (picnose, cariorrexe e cariólise) obtiveram padrões significativamente diferentes entre os grupos (Tabela 2).

Com relação ao dano genotóxico (frequência de células com micronúcleo), não houve diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 2. Frequência das alterações metanucleares (picnose, cariorrexe e cariólise) em células da mucosa bucal dos participantes, Cubatão-SP, 2016 (N=44).

Grupo de indivíduos	Picnose	Cariorexe	Cariólise
Soldadores (n=22)	26,0±9,0**	4,4±5,6*	7,2*±6,0*
Não soldados (n=22)	13,9±7,0	1,5±3,5	2,4±2,5

Média±DP: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 3. Frequência de micronúcleos em células da mucosa bucal dos participantes, Cubatão-SP, 2016 (N=44).

Grupo	Número de indivíduos	Micronúcleos
Soldadores	22	0,07±0,30
Não soldados	22	0,12±0,30

Média±DP (em 1.000 células): $p > 0,05$.

DISCUSSÃO

O constante contato do epitélio bucal com agentes presentes no ambiente, por exposição inalatória e oral, faz a aplicação desse método ser vantajoso em testes de biomonitoramento ocupacional¹⁶. O baixo custo, a facilidade de obtenção do material dada pela coleta minimamente invasiva, a possibilidade de verificação dos danos no DNA e a morte celular no epitélio se tornam interessante, já que 90% dos cânceres têm origem epitelial¹⁷. Em âmbito mundial, estudos ocupacionais semelhantes foram realizados: na Polônia, com trabalhadores expostos a cobre e arsênio¹⁸; na Índia, com trabalhadores industriais de fabricação de baterias expostos ao chumbo¹⁹; na Colômbia, com trabalhadores de mineração²⁰. Vale ressaltar a dificuldade de se selecionar um grupo não exposto totalmente isento desse tipo de exposição, visto que, mesmo em baixas concentrações, os voluntários não expostos à soldagem vivem expostos a diversas substâncias cotidianas da vida moderna em zona urbana, onde a exposição a contaminantes, mesmo em nível mínimo, está presente.

No presente estudo, quando comparados o grupo de soldados e o grupo de não soldados, pode-se observar a maior ocorrência de citotoxicidade em soldados. Os resultados sugerem os prováveis efeitos citotóxicos em soldados devido à alta probabilidade de exposição a metais, como o Cr e o Ni, em decorrência das atividades de soldagem. No entanto, essa hipótese não pode ser confirmada por meio da metodologia utilizada por tratar-se de um estudo de natureza exploratória. Os dados referem-se a resultados preliminares que carecem de maiores investigações. Com relação à mutagenicidade, não foram encontrados resultados sugestivos.

Em um estudo austríaco realizado por Wultsch et al.²¹ com 22 soldados, foi observado aumento no efeito citotóxico, mas não mutagênico, concordando com os dados da presente pesquisa. Já em outro estudo realizado no México com soldados não foi encontrada a correlação entre a exposição e os parâmetros de mutagenicidade e citotoxicidade²². Outros dois estudos^{23,24} realizados na Índia, também com soldados, observaram aumento na frequência dos marcadores de mutagenicidade em relação aos indivíduos não expostos. Contudo, questionam-se esses resultados positivos realizados na Índia, visto que a coloração usada no experimento, de Giemsa, poderia aumentar a ocorrência de falsos positivos^{21,22}.

Nesta pesquisa encontramos aumento na frequência de anormalidades nucleares — como picnose, cariorrexe e cariólise, caracterizando a morte celular —, que ocorrem tanto nos processos de necrose quanto nos de apoptose²⁵. As alterações conotam mecanismos reparadores de danos genéticos, podendo indicar instabilidade no genoma, já que quando ocorrem grandes instabilidades genômicas, são encaminhadas a processos apoptóticos²⁶. Esse fato pode ser explicado, ainda, pela presente eficiência dos pontos de checagem no ciclo celular²⁷, que também podem implicar na ocorrência de micronúcleos, já que células micronucleadas podem ser induzidas à morte e, assim, não são visualizadas²⁸.

Nem todos os mecanismos relacionados aos metais pesados são totalmente elucidados, porém, sabe-se de sua propriedade em gerar espécies reativas de oxigênio^{19,29}. É o que ocorre com os radicais OH• que podem interferir nos mecanismos de reparo celular no DNA, no RNA, nas proteínas e nos lipídios e em membranas celulares do núcleo e mitocondrial³⁰; são eventos que podem implicar na carcinogênese, na teratogênese e no envelhecimento precoce^{18,28,29}. Na carcinogênese, por exemplo, a citotoxicidade pode acarretar lesão crônica seguida por aumento da multiplicação celular compensatória, hiperplasia e, então, desenvolvimento do tumor²⁷. Sendo assim, há correlação entre a citotoxicidade e os danos genéticos, e o acúmulo desses danos no genoma podem favorecer a progressão de uma célula normal em maligna.

Os estudos sobre danos genotóxico e citotóxico em soldadores são raros e controversos. As medidas de proteção empregadas, os níveis de exposição e as concentrações dos metais variam de um ambiente ocupacional para outro, e são fatos que devem ser considerados, pois podem explicar os achados em determinados ambientes²³.

No Brasil, a averiguação científica de riscos à saúde em decorrência da exposição ocupacional teve impulso com a criação das legislações de segurança do trabalho, já no final do século passado³¹. As disposições legais brasileiras sobre segurança do trabalho são feitas por meio das Normas Regulamentadoras^{32,33}, que são bastante exigentes e determinam o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo contra os riscos que podem ser encontrados no ambiente ocupacional. Porém, é rotineiro trabalhadores informais não fazerem uso dessas medidas, decorrente de processos culturais e educacionais. No presente estudo, embora 90% dos soldadores tenham afirmado que utilizam

equipamentos de proteção obrigatórios, constatou-se, de forma observacional e empírica, que isso não era uma completa verdade. Durante as visitas a algumas instalações, observou-se que frequentemente os trabalhadores, sobretudo os trabalhadores informais, ora não utilizavam ora utilizavam, de forma irregular ou incompleta, os equipamentos de segurança. Nesse cenário, as empresas apresentam um controle mais rigoroso sobre o uso dos equipamentos de segurança.

Os biomarcadores utilizados neste estudo têm sido empregados para investigar se há risco de desenvolvimento de câncer do trato aerodigestivo superior. Contudo, outras doenças, como diabetes e câncer de mama, também têm sido associadas a maiores frequências de alterações desses marcadores³⁴⁻³⁶. A compreensão dessas questões, assim como os métodos de automação na análise — já que a análise por essa metodologia é subjetiva e depende da perícia do analista — facilitarão o entendimento do eixo dos estudos e possibilitarão uma investigação mais rápida e precisa.

Quanto aos achados observados, estudos adicionais com técnicas mais avançadas para avaliação de dano ou reparo no genoma, assim como estudos longitudinais, poderão esclarecer melhor o potencial de mutagenicidade e citotoxicidade presente em ambientes profissionais de soldadores.

CONCLUSÃO

No presente estudo, não foi observada frequência de dano genotóxico no grupo de trabalhadores expostos à fumaça de soldagem quando comparado ao grupo de não soldadores. No entanto, os resultados deste estudo preliminar sugerem que soldadores expostos apresentam maior tendência a apresentar dano citotóxico em células da mucosa bucal que trabalhadores não expostos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos especialmente ao Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro pelas contribuições dadas nas etapas de desenvolvimento da metodologia e dos instrumentos de avaliação. Agradecemos também a todas as empresas e aos voluntários que gentilmente se dispuseram a participar do nosso estudo.

REFERÊNCIAS

- Leonard SS, Chen BT, Stone SG, Schwegler-Berry D, Kenyon AJ, Frazer D, et al. Comparison of stainless and mild steel welding fumes in generation of reactive oxygen species. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7:32.
- Modenesi P, Bracarense A. Soldagem: fundamentos e tecnologia. Belo Horizonte: Editora UFGM; 2005. 362p.
- Espallargas N, Berget J, Guilemany JM, Benedetti AV, Suegama PH. Cr3C2-NiCr and WC-Ni thermal spray coatings as alternatives to hard chromium for erosion-corrosion resistance. *Surf Coatings Technol*. 2008;202(8):1405-17.
- Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA Repair throughout the Cell Cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(4):297-30.
- Badding MA, Fix NR, Antonini JM, Leonard SS. A Comparison of cytotoxicity and oxidative stress from welding fumes generated with a new nickel-, copper-based consumable versus mild and stainless steel-based welding in RAW 264.7 mouse macrophages. Ho Y-S, ed. *PLoS One*. 2014;9(6).
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283:65-87.
- Sellappa S, Prathyumnar S, Keyan KS, Joseph S, Vasudevan BS, Sasikala K. Evaluation of DNA damage induction and repair inhibition in welders exposed to hexavalent chromium. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(1):95-100.
- Halasova E, Matakova T, Musak L, Polakova V, Letkova L, Dobrota D, et al. Evaluating chromosomal damage in workers exposed to hexavalent chromium and the modulating role of polymorphisms of DNA repair genes. *Int Arch Occup Environ Health*. 2012;85(5):473-81.
- International Agency for Research On Cancer. Chromium (VI) Compounds [Internet]. Lyon, France: IARC, 2012 [cited on Aug 24 2016]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-9.pdf>
- Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-xL Prevents the Initial Decrease in Mitochondrial Membrane Potential and Subsequent Reactive Oxygen Species Production during Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000;20(15):5680-9.
- Moreira MFR, Ferreira AP, Araújo UC. Determinação dos níveis de exposição de metais em trabalhadores da construção naval: impactos e desafios. *Rev Bras Med Trab*. 2016;14(1):19-28.
- Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res*. 2011;728(3):88-97.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res*. 2008;638:37-47.
- Shashikala R, Indira AP, Manjunath GS, Rao KA, Akshatha BK. Role of micronucleus in oral exfoliative cytology. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(Suppl 2):S409-13.
- Meireles J, Lopes M, Alves N, Cerqueira E. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. *Rev Bras Cancerol*. 2006;52(4):337-43.
- Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol*. 2011;682:235-48.
- Yadav AS, Jaggi S. Buccal Micronucleus Cytome Assay: a Biomarker of Genotoxicity. *J Mol Biomark Diagn*. 2015;6:236.
- Lewińska D, Palus J, Stepnik H, Dziubałtowska E, Beck J, Rydzyski K, et al. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int Arch Occup Environ Health*. 2007;80(5):371-80.
- Singh Z, Chadha P, Sharma S. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in battery manufacturing workers occupationally exposed to lead. *Toxicol Int*. 2013;20(1):95-100.
- León-Mejía G, Quintana M, Debastiani R, Dias J, Espitia-Pérez L, Hartmann A, et al. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014;107:133-9.
- Wultsch G, Nersesyan A, Kundi M, Jakse R, Beham A, Wagner K, et al. The sensitivity of biomarkers for genotoxicity and acute cytotoxicity in nasal and buccal cells of welders. *Int J Hygiene Environ Health*. 2013;217(4-5):492-8.
- Jara-Ettinger A, López-Tavera J, Zavala-Cerna M, Torres-Bugarín O. Genotoxic Evaluation of Mexican Welders Occupationally Exposed to Welding-Fumes Using the Micronucleus Test on Exfoliated Oral Mucosa Cells: A Cross-Sectional, Case-Control Study. Shi Q, ed. *PLoS One*. 2015;10(8):e0131548. doi:10.1371/journal.pone.0131548
- Danadevi K, Rozati R, Banu BS, Grover P. Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis*. 2004;19(1):35-41.
- Sudha S, Kripa S, Shibily P, Shyn J. Elevated Frequencies of Micronuclei and other Nuclear Abnormalities of Chrome Plating Workers Occupationally Exposed to Hexavalent Chromium. *Iran J Cancer Prev*. 2011;4(3):119-24.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*. 2006;600(1-2):58-66.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008;659(1-2):93-108.
- Aquino T, Zenkner F, Ellwanger J, Prá D, Rieger A. DNA damage and cytotoxicity in pathology laboratory technicians exposed to organic solvents. *An Acad Bras Ciênc*. 2016;88(1):227-36.
- Swenberg J. Alpha2u-globulin nephropathy: review of the cellular and molecular mechanisms involved and their implications for human risk assessment. *Environ Health Perspect*. 1993;101(Suppl 6):39-44.
- Zocche J, Leffa D, Damiani A, Carvalho F, Avila Mendonça R, Dos Santos C, et al. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. *Environ Res*. 2010;110(7):684-91.
- Barreiros A, David J, David J. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006;29(1):113-23.
- Spinola AG, Prata PR. Uso de biomarcadores como indicadores do histórico de exposição ocupacional ao chumbo. *Rev Bras Med Trab*. 2009;4-6(Special):39-45.

32. Brasil. Portaria nº 3.214 de 8 de junho de 1978 [Internet]. Aprova as Normas Regulamentadoras do Ministério de Estado do Trabalho, no uso de suas atribuições legais, considerando o disposto no art. 200, da Consolidação das Leis do Trabalho, com redação dada pela Lei nº 6.514, de 22 de dezembro de 1977. Brasília; 1978 [cited on 2017 Jan 24]. Available from: http://www.jacoby.pro.br/diversos/nr_16_perigosas.pdf
33. Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. NR 6: equipamento de proteção individual -EPI [Internet]. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego; 2001. [cited on 2017 Jan 24]. Available from: <http://trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR6.pdf>
34. Kashyap B, Reddy PS. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Can Res Ther*. 2012;8:184-91.
35. Müllner E, Brath H, Nersesyan A, Nitz M, Petschnig A, Wallner M, et al. Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in healthy and diabetic individuals and the impact of a dietary intervention. *Mutagenesis*. 2014;29(1):1-6.
36. Flores-Garcia A, Torres-Bugarin O, Salvador Velarde-Félix J, Rangel-Villalobos H, Zepeda-Carrillo EA, Rodriguez-Trejo A, et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated buccal mucosa cells of Mexican women with breast cancer. *J Buon*. 2014;19(4):895-9.

Endereço para correspondência: Laiane Damara Oliveira do Vale - Avenida Francisco Manoel, s/n - CEP: 11045-300 - Vila Mathias - Santos (SP), Brasil - E-mail: laiane_damara@hotmail.com