

Efeitos da idade sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas

Effects of age on the frequency of micronuclei and degenerative nuclear abnormalities

Gregory Alves Ferraz¹
Antônio de Oliveira Costa Neto¹
Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira¹
José Roberto Cardoso Meireles¹

ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do envelhecimento, do gênero e de fatores relacionados ao estilo de vida na indução de danos cromossômicos (micronúcleo) e de alterações nucleares degenerativas com o uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral. A amostra incluiu oitenta indivíduos saudáveis divididos em quatro grupos de acordo com a faixa etária e o gênero: homens e mulheres de 19-29 anos (H19, M19), homens e mulheres com mais de sessenta anos (H60, M60). Questionário de entrevista foi aplicado para caracterizar a amostra e para determinar um índice refletindo o estilo de vida (IVS). A frequência de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas foi significativamente maior entre os idosos ($p < 0,001$) e não diferiu em função do gênero entre os jovens ($p > 0,05$). Ocorrência de micronúcleos foi similar entre homens e mulheres idosos ($p > 0,10$), mas cariorréxis e cariólise foram mais frequentes entre os homens ($p < 0,005$ e $p < 0,025$, respectivamente), que também apresentaram o menor IVS em relação aos demais grupos ($p < 0,0004$). Os resultados deste estudo permitem concluir que a idade foi o principal fator associado à indução de danos ao material genético.

Palavras-chave: Grupos Etários; Apoptose.

Abstract

The effects of aging, gender and lifestyle factors on inducing chromosomal damage (micronuclei) and nuclear degenerative changes were assessed using the micronucleus test on exfoliated cells of the oral mucosa. The sample included 80 healthy subjects divided into four groups according to age and gender: men and women aged 19-29 years (M19, W19) and men and women aged over sixty years (M60, W60). An interview questionnaire was used to characterize the sample and to determine an index reflecting lifestyle (HLI). The frequency of micronuclei and nuclear degenerative changes was significantly higher among the elderly ($p < 0.001$) and did not differ by gender among young people ($p > 0.05$). The occurrence of micronuclei was similar among elderly men and women ($p > 0.10$), but karyorrhexis and karyolysis were more frequent among men ($p < 0.005$ and $p < 0.025$, respectively), who also had a lower HLI than the other groups ($p < 0.0004$). The results of the study indicate that age is the main factor associated with the induction of genetic material damage.

Key words: Age Groups; Apoptosis.

¹ Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Toxicológica. Feira de Santana, BA, Brasil.

INTRODUÇÃO

O avanço da idade é caracterizado por uma redução geral na eficiência fisiológica, resultando no desequilíbrio homeostático com conseqüente surgimento de doenças inerentes ao processo de envelhecimento. Estudos sugerem que esse processo está associado a um aumento da instabilidade genômica decorrente da redução da capacidade de reparo de danos ao DNA.^{1,2} Tem sido relatado que, com o avançar da idade, biomarcadores de instabilidade genômica, a exemplo de micronúcleos (MN), têm elevadas suas frequências em linfócitos periféricos^{3,4} e células epiteliais esfoliadas.^{5,6}

O acúmulo de danos ao DNA, deste modo, pode ser considerado um evento importante no processo de envelhecimento celular. Durante esse processo ocorre uma progressiva diminuição de enzimas metabólicas, assim como enzimas de reparo do DNA, o que aumenta a predisposição e suscetibilidade da célula a agentes genotóxicos exógenos e/ou endógenos. Esses fatores contribuem para o aumento da frequência de danos espontâneos ao DNA relacionados com a idade.^{7,8}

Assim, modificações no material genético ocorrem não apenas em conseqüência da exposição a agentes mutagênicos, mas podem resultar de reações químicas relacionadas a processos fisiológicos⁹. Adicionalmente, estudos têm apontado, além da idade, diferenças na ocorrência de danos genéticos em função do sexo¹⁰⁻¹². Trzeciak *et al.*¹¹ relataram que a remoção de carcinógenos ativos do tabaco é menor em mulheres evidenciando, assim, diferenças bioquímicas entre os sexos. Maior ocorrência de MN em função da idade e do sexo foi relatada por Iarmarcovai *et al.*¹⁰ e Kažimírová *et al.*¹²

A frequência de danos ao DNA é também influenciada por fatores relacionados ao estilo de vida. Hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas, longas horas de trabalho, poucas horas de sono, inatividade física, tipo de dieta e estresse psicológico contribuem para o aumento dessa frequência e, conseqüentemente, desenvolvimento de doenças, incluindo o câncer.¹³⁻¹⁵

O câncer resulta de alterações em genes envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular;

nos mecanismos de reparo do DNA e na apoptose. Assim, a quantificação de danos genéticos tem um papel importante na avaliação dos riscos de desenvolvimento dessa doença^{16,17}.

O teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral é considerado um método eficaz na identificação de danos genéticos, evidenciando perdas e quebras cromossômicas, particularmente quando feito de acordo com os protocolos de Tolbert *et al.*^{18,19} e Thomas *et al.*¹⁷ nos quais, além de MN, são computadas alterações nucleares (AN) degenerativas indicativas de apoptose e necrose.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da idade e do sexo sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas considerando também fatores relacionados ao estilo de vida.

MÉTODOS

Aspectos éticos

O estudo foi realizado de acordo com a legislação brasileira do Conselho Nacional de Saúde (CNS 196/96), a qual tem base na Declaração de Helsink/Hong Kong. A pesquisa foi iniciada após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (Protocolo 063/2009). Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Período de realização do estudo

O estudo foi realizado entre os meses de março a novembro de 2010.

Amostra

A amostra foi composta por 80 indivíduos, distribuídos em quatro grupos de vinte:

- H19: homens com idade entre 19 e 29 anos;
- M19: mulheres com idade entre de 19 a 29 anos;

- H60: homens com idade maior ou igual a sessenta anos;
- M60: mulheres com idade maior ou igual a sessenta anos.

Caracterização da amostra

A amostra foi caracterizada através de questionário de entrevista, adaptado de Caires,²⁰ contendo indagações a respeito do gênero, idade, dieta, hábitos de fumar e/ou ingerir bebidas alcólicas, horas de sono, ocupação profissional, prática de exercício físico, nível de estresse, uso de antisséptico bucal, doença crônica e exposição a agentes genotóxicos e/ou produtos tóxicos. Exceto a idade e o gênero, as demais variáveis foram utilizadas para o cálculo do Índice de Vida Saudável.

Índice de vida saudável

O estilo de vida foi avaliado através do Índice de Vida Saudável (IVS) determinado com base nos parâmetros adotados por Morimoto *et al.*²¹ Tais sejam: não fumar, não ingerir bebidas alcólicas diariamente, tomar café da manhã todos os dias, dormir entre sete e oito horas por noite, trabalhar menos de dez horas por dia, praticar exercício físico pelo menos uma vez por semana, manter uma dieta nutricionalmente balanceada, moderado nível de estresse mental (inferido por autoavaliação do entrevistado). Adicionalmente, a essas variáveis sugeridas por Morimoto *et al.*,²¹ também foram consideradas: não usar antisséptico bucal, ausência de doença crônica e não exposição a agentes genotóxicos e produtos tóxicos. Para cada uma dessas variáveis consideradas saudáveis, foi atribuído 01 (um) ponto. Às respostas diferentes dessas especificadas, foi atribuída a pontuação 0 (zero) para cada uma. O cálculo do IVS foi realizado para cada um dos integrantes da amostra somando-

se a pontuação obtida nos parâmetros acima mencionados. Consideraram-se três categorias de IVS: bom (11-12 pontos); moderado (9-10 pontos) e ruim (0-8 pontos).

Teste de micronúcleo

Células esfoliadas da mucosa oral de cada indivíduo foram coletadas com uso de escova endocervical e transferidas, por esfregaço, para lâminas de microscopia contendo duas gotas de soro fisiológico (NaCl 0,9%). Após secagem à temperatura ambiente as lâminas foram submersas em solução de metanol/ácido acético (3:1) para fixação. Após 24 horas, o material foi corado com reativo de Shiftt e contra-corado com *fast green* a 1%.

A análise citológica foi realizada sob microscopia óptica, em teste cego em relação aos dados obtidos nos questionários de entrevista. Um total de 2000 células por indivíduo foi analisado. Os critérios descritos por Sarto *et al.*²² foram adotados para identificação dos MN. Assim, foram considerados MN estruturas citoplasmáticas morfologicamente similares ao núcleo com até 1/3 do tamanho deste e visualizadas no mesmo plano. Alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose) e necrose (cariólise), também foram computadas.

Análise estatística

As médias de idade e de IVS entre os grupos foram comparadas com uso do teste de Kruskal-Wallis. A ocorrência de MN e AN entre os grupos foi comparada com o uso do Teste Condicional para Comparação de Proporções em Situações de Eventos Raros.²³ O teste de Kruskal-Wallis foi também empregado para avaliação da ocorrência (em média) de MN e AN em função do IVS e da faixa etária.

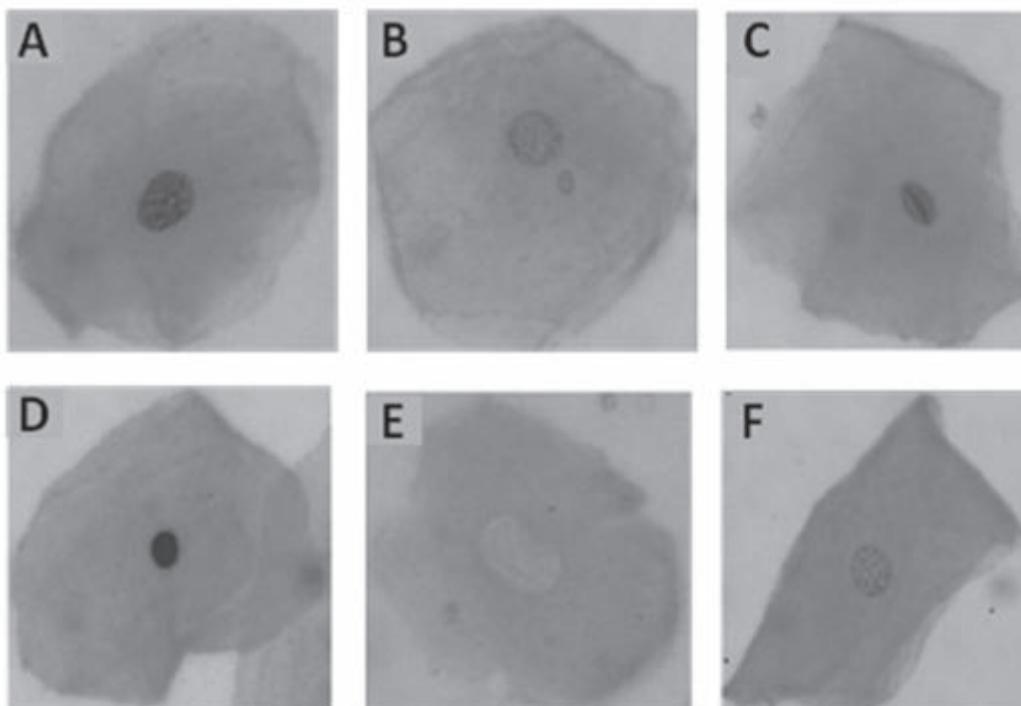


Figura 1. Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa oral coradas pelo método Felguen/Fast green apresentando morfologia nuclear normal (A), micronúcleo (B), cromatina condensada (C), picnose (D), cariólise (E), cariorréxis.

RESULTADOS

As médias de idade e de IVS \pm desvio padrão dos participantes são apresentadas na Tabela 1.

A prova de Kruskal-Wallis mostrou que a média de idade dos indivíduos dos grupos mais jovens foi significativamente menor em relação aos mais idosos ($p < 0,00001$). Em um mesmo grupo etário,

homens e mulheres não diferiram quanto à idade. Em relação ao IVS, observou-se que os indivíduos dos grupos H19, M19 e M60 apresentaram esse índice significativamente mais alto ($p < 0,0004$).

A análise estatística comparando as frequências de MN e AN (Fig. 01) entre indivíduos na faixa etária de 19-29 e indivíduos com ≥ 60 anos revelou diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 1. Média de idade e de IVS da amostra por grupo. Feira de Santana/BA, 2010.

Grupo	Média de Idade \pm desvio padrão	Média de IVS \pm desvio padrão
H60	69,00 \pm 9,30	7,65 \pm 1,31
M60	81,25 \pm 9,11	8,65 \pm 0,81
H19	22,20 \pm 1,79	9,15 \pm 0,99
M19	21,90 \pm 1,71	9,20 \pm 1,11

IVS = Índice de Vida Saudável.

Tabela 2. Ocorrência de micronúcleo e alterações nucleares em indivíduos de duas diferentes faixas etárias. Feira de Santana/BA, 2010.

<i>Endpoints</i>	observado		esperado		χ^2	<i>p</i>
	19-29	≥ 60	19-29	≥ 60		
Micronúcleo	5	38	21,50	21,50	25,3256	<0,001
Cariólise	2	56	29,00	29,00	50,2758	<0,001
Cariorréxis	12	209	110,50	110,50	175,6064	<0,0001
Cromatina Condensada	192	533	362,50	362,50	160,3876	<0,0001
Picnose	151	740	445,50	445,50	389,3614	<0,00001

Endpoints = marcadores de dano cromossômico (micronúcleo) e alterações nucleares (cariólise, cariorréxis, cromatina condensada e picnose).

Não foram observadas diferenças na ocorrência de quaisquer dos *endpoints* entre homens e mulheres do grupo jovem. No grupo de idosos a frequência de cariólise e cariorréxis foi maior entre os homens (Tabela 3).

A avaliação da ocorrência de MN e AN em função do IVS e da idade foi realizada dividindo-se a amostra em dois grupos (IVS Ruim e IVS Moderado), uma vez que apenas três indivíduos (um

homem e duas mulheres do grupo jovem) foram classificados como tendo IVS Bom. Esses grupos foram divididos em dois subgrupos de acordo com a faixa etária. A análise revelou que para mesma faixa etária não há diferença significativa na frequência de MN e AN independente do IVS. Por outro lado, também independente do IVS, indivíduos mais idosos apresentaram maior ocorrência dos *endpoints* analisados (Tabela 4).

Tabela 3. Ocorrência de micronúcleo e alterações nucleares em homens e mulheres da faixa etária ≥ 60. Feira de Santana/BA, 2010.

<i>Endpoints</i>	observado		esperado		χ^2	<i>p</i>
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres		
Micronúcleo	23	15	19,00	19,00	1,6842	> 0,10
Cariólise	37	19	28,00	28,00	5,7857	< 0,025
Cariorréxis	130	79	104,50	104,50	12,4450	< 0,005
Cromatina Condensada	264	269	266,59	266,59	0,0469	> 0,10
Picnose	370	370	370,00	370,00	0,0000	= 1,000

Endpoints = marcadores de dano cromossômico (micronúcleo) e alterações nucleares (cariólise, cariorréxis, cromatina condensada e picnose).

Tabela 4. Ocorrência, em média, de micronúcleo e alterações nucleares em função do Índice de Vida Saudável (IVS) e da idade. Feira de Santana/BA, 2010.

Endpoints	IVS Ruim		IVS Moderado	
	Acima de 60 (n = 15)	Entre 19 e 29 (n = 15)	Acima de 60 (n = 25)	Entre 19 e 29 (n = 22)
Micronúcleo	1,09 ± 0,90 ^A	0,00 ± 0,00 ^B	0,76 ± 0,66 ^A	0,12 ± 0,33 ^B
Cariólise	1,30 ± 1,46 ^A	0,00 ± 0,00 ^B	1,53 ± 2,35 ^A	0,04 ± 0,20 ^B
Cariorréxis	5,04 ± 3,43 ^A	0,30 ± 0,67 ^B	5,47 ± 5,37 ^A	0,23 ± 0,51 ^B
Cromatina Condensada	12,48 ± 4,47 ^A	5,20 ± 2,15 ^B	10,53 ± 4,05 ^A	4,50 ± 2,35 ^B
Picnose	18,91 ± 6,63 ^A	3,00 ± 1,63 ^B	17,94 ± 13,22 ^A	3,88 ± 2,67 ^B

Endpoints = marcadores de dano cromossômico (micronúcleo) e alterações nucleares (cariólise, cariorréxis, cromatina condensada e picnose)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O teste de micronúcleo em células esfoliadas é um método eficaz na detecção de danos genéticos e tem sido amplamente empregado no biomonitoramento populacional.²⁴ Micronúcleos são estruturas que resultam de quebras cromossômicas ou cromossomos inteiros que durante a divisão celular falharam em sua ligação com o fuso e não foram incluídos nos núcleos das células filhas. Assim, micronúcleo é um *endpoint* de dano cromossômico decorrente de evento clastogênico ou aneugênico.

Além de danos cromossômicos, a ocorrência de outros *endpoints* indicativos de apoptose e necrose pode ser identificada nesse teste. Alteração nos níveis de apoptose, inferida pela ocorrência de cariorréxis, cromatina condensada e picnose, revela efeitos genotóxicos e está relacionada com iniciação do câncer.¹⁷⁻¹⁹ Necrose, por sua vez, é inferida pela ocorrência de cariólise, revelando assim, efeito citotóxico relacionado à promoção do câncer.¹⁷ Neste contexto, o computo desses *endpoints* é importante para aumentar a sensibilidade do teste de micronúcleo.

Dentre as muitas aplicações desse teste, inclui-se o uso para avaliação dos efeitos mutagênicos consequentes aos hábitos de fumar e/ou de ingerir bebidas alcoólicas^{25,26} e dos efeitos da depleção de nutrientes na dieta.²⁷ Os efeitos da idade e gênero sobre as frequências de micronúcleo têm

sido avaliados mais frequentemente em linfócitos, quer isoladamente, como objetivo principal do estudo, quer como fatores que poderiam estar interferindo nos resultados de estudos relacionados a outras variáveis.^{28,29}

Segundo Bonassi *et al.*,²⁷ os efeitos do gênero sobre as frequências de MN em células esfoliadas não são significativos, diferentemente do observado em linfócitos em que mulheres, geralmente, apresentam frequências mais elevadas. Concorde com esses autores, no presente estudo o gênero não interferiu na frequência de MN, mas cariólise e cariorréxis foram de maior ocorrência entre os homens com idade ≥ 60 , o que pode estar associado ao IVS mais baixo apresentado por este grupo. A avaliação da associação entre a ocorrência de micronúcleo, alterações nucleares e estilo de vida (inferido pelo IVS), feita neste estudo não revelou, contudo, diferenças significantes. Investigações adicionais acerca da influência do gênero e do estilo de vida na ocorrência de alterações nucleares são necessárias, uma vez que maior ocorrência de MN em função de um estilo de vida pouco saudável tem sido relatado.¹⁵

A influência da idade na promoção de danos ao material genético tem amplo registro na literatura. Os resultados deste estudo em relação a essa associação são corroborados por diversos autores que também observaram maior ocorrência de danos genéticos em indivíduos mais idosos,^{12,28,29} o que segundo, Huang *et al.*¹⁵ decorre do fato de

envelhecimento estar associado à instabilidade genética. Estudos adicionais que incluam amostras de maior tamanho, entretanto, são necessários uma vez que pode ser considerado como uma limitação deste estudo o número de indivíduos analisados.

Segundo Fenech e Bonassi,³⁰ o aumento de MN com a idade é provavelmente devido a uma combinação de fatores que incluem (a) o efeito cumulativo de mutações em genes envolvidos no reparo do DNA, na segregação cromossômica e nos *checkpoints* do ciclo celular e, (b) alterações numéricas e estruturais nos cromossomos induzidas por genotoxinas endógenas e/ou exógenas, bem como por uma ampla gama de fatores de estilo de vida pouco saudáveis.

Assim, os efeitos do envelhecimento parecem ser uma combinação de processos geneticamente programados e alterações genéticas induzidas por fatores exógenos e endógenos. Durante o processo de envelhecimento ocorre progressivamente insuficiência de enzimas, a exemplo daquelas

relacionadas ao reparo do DNA, o que aumenta a susceptibilidade das células a agentes genotóxicos^{31,32}. Kirsch-Volders *et al.*,³³ sugeriram que falhas nos sistemas de defesa celular que protegem contra a fixação de danos no DNA e a diminuição na eficácia no reparo de DNA são fatores que podem levar a um acúmulo de mutações que, isoladamente ou em combinação com outras alterações relacionadas com a idade, podem contribuir para o envelhecimento e desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontam a idade como um fator consistentemente associado à indução de danos ao material genético. Deste modo, a adoção de hábitos de vida saudável pode contribuir para minimizar esses efeitos do envelhecimento, reduzindo conseqüentemente os riscos de desenvolvimento de doenças degenerativas.

REFERÊNCIAS

- Garm C, Moreno-Villanueva M, Bürkle A, Petersen I, Bohr VA, Christensen K, et al. Age and gender effects on DNA strand break repair in peripheral blood mononuclear cells. *Aging Cell* 2013;12(1):58-66.
- Trzeciak AR, Barnes J, Ejiogu N, Foster K, Brant LJ, Zonderman AB, et al. Age, sex, and race influence single-strand break repair capacity in a human population. *Free Radic Biol Med* 2008;45(12):1631-41.
- Kazimírová A, Barancoková M, Džupinková Z, Wsólóvá L, Dusinská M. Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: Possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutat Res* 2009;661(1-2):35-40.
- Joseph LJ, Patwardhan UN, Samuel AM. Frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res* 2004;564(1):83-8.
- Pinto D, Ceballos JM, García G, Guzmán P, Del Razo LM, Vera E, et al. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutat Res* 2000;467(2):105-11.
- Wu PA, Loh CH, Hsieh LL, Liu TY, Chen CJ, Liou SH. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat Res* 2004;562(1-2):27-38.
- Milosevic-Djordjevic O, Grujicic D, Novakovic T, Arsenijevic S, Marinkovic D. Micronuclei and ageing in a sample of yugoslavian population. *Genetika* 2002;38(2):264-7.
- Picerno I, Chirico C, Condello S, Visalli G, Ferlazzo N, Gorgone G, et al. Homocysteine induces DNA damage and alterations in proliferative capacity of T-lymphocytes: a model for immunosenescence? *Biogerontology* 2007;8(2):111-9.
- Heuser VD, Andrade VM, Peres A, Braga LMGM, Chies JAB. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int* 2008;32(10):1223-9.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res* 2008;658(3):215-33.
- Trzeciak AR, Barnes J, Ejiogu N, Foster K, Brant LJ, Zonderman AB, et al. Age, sex, and race influence single-strand break repair capacity in a human population. *Free Radic Biol Med* 2008;45(12):1631-41.

12. Kazimírová A, Barancoková M, Džupinková Z, Wsólóvá L, Dusinská M. Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutat Res* 2009;661(1-2):35-40.
13. Johnson JV, Lipscomb J. Long working hours, occupational health and the changing nature of work organization. *Am J Ind Med* 2006;49(11):921-9.
14. Metcalfe C, Smith GD, Macleod J, Hart C. The role of self-reported stress in the development of breast cancer and prostate cancer: a prospective cohort study of employed males and females with 30 years of follow-up. *Eur J Cancer* 2007;43(6):1060-5.
15. Huang P, Huang B, Weng H, Nakayama K, Morimoto K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Prev Med* 2009;48(4):383-8.
16. 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.
17. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2009;4(6):825-37.
18. 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(8):840-50.
19. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 1992;271(1):69-77.
20. Caires NFR. Sobrepeço e obesidade entre os funcionários da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA [dissertação]. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana; 2004.
21. Morimoto K, Takeshita T, Inoue-Sakurai C, Maruyama S. Lifestyles and mental health status are associated with natural killer cell and lymphokine-activated killer cell activities. *Sci Total Environ* 2001;270(1-3):3-11.
22. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 1987;2(1):11-7.
23. Bragança-Pereira CA. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MAR, Monteleone Neto R, organizadores. *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo: Sociedade Brasileira de genética; 1991. p.113-21.
24. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. In: Didenko VV, organizator. *DNA damage detection in situ, ex vivo, and in vivo: methods and protocols*. New York: Springer Science+Business Media; 2011. p. 235-48.
25. Pellicoli AC, Visioli F, Ferreira LA, Danilevicz CK, Carrard VC, Rados PV. Cytogenetic abnormalities in exfoliated oral mucosal cells and their association with oral cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 2011;33(5):271-6.
26. Pradeep MR, Yadavalli G, Maji J, Kartikay S, Deepa K, Vishnudas P. Comparative study of genotoxicity in different tobacco related habits using micronucleus assay in exfoliated buccal epithelial cells. *J Clin Diagn Res* 2014;8(5):21-4.
27. 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.
28. Wojda A, Zietkiewicz E, Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 2007;22(3):195-200.
29. Nefic H, Handzic I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutat Res* 2013;753(1):1-11.
30. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011;26(1):43-9.
31. Chen SK, Hsieh WA, Tsai MH, Chen CC, Hong AI, Wei YH, et al. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res* 2003;44(1):31-5.
32. Nassour J, Martien S, Martin N, Deruy E, Tomellini E, Malaquin N, et al. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun* 2016;29(7):10399.
33. Kirsch-Volders M, Mateuca RA, Roelants M, Tremp A, Zeiger E, Bonassi S, et al. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2006;15(5):1038-42.

Recebido: 04/08/2015

Revisado: 26/05/2016

Aprovado: 15/06/2016