

Bioquímia

Volumen
Volume **27**

Número
Number **1**

Marzo
March **2002**

Artículo:

Efecto genotóxico de la crocidolita en cultivo de leucocitos humanos

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Efecto genotóxico de la crocidolita en cultivo de linfocitos humanos

¹E. Madrigal-Bujaidar, ²E. Madrigal-Santillán, ¹M. Cassani, ¹Y. Leyva, ¹A. Piña.

¹Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F. ²Laboratorio de Farmacología,

Escuela de Medicina, ICSA-UAEH, Pachuca Hgo.

Sobretoiros: Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar; Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., Carpio y Plan de Ayala, Sto. Tomás. México D.F. CP 11340, Fax: 5 396 35 03, e-mail: eduardo.madrigal@eudor@mail.com
Recibido: 17/09/01 Aceptado: 09/09/01

Resumen

La crocidolita es un tipo de asbestos constituido por silicatos que contienen hierro y sodio, el cual forma parte del asbestos comercial utilizado en la elaboración de numerosos productos industriales y domésticos. La exposición laboral y ambiental al asbestos se ha correlacionado con diversos efectos nocivos a la salud, principalmente relacionados con el aparato respiratorio, donde puede desarrollar fibrosis (asbestosis) y varios tipos de cánceres, como el carcinoma broncogénico y el mesotelioma. Como el potencial genotóxico de los agentes químicos es un indicador preclínico del desarrollo del cáncer, se realizó esta investigación en cultivos de linfocitos humanos con los siguientes objetivos: a) determinar la capacidad de la crocidolita para producir aberraciones cromosómicas estructurales, b) evaluar su capacidad para inducir intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y c) evaluar su efecto citotóxico y sobre la velocidad de división celular. Se estudió el efecto de 5 concentraciones del compuesto (5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) sobre los linfocitos de sangre periférica de un donador femenino que se cultivaron durante 72 h. Los resultados revelaron que la crocidolita incrementó significativamente el número de ICHs con las tres primeras concentraciones, observándose una respuesta concentración-dependiente y una elevación máxima de 46.8 % con 20 µg/mL. Las 2 concentraciones más altas (40 y 80 µg/mL) tuvieron un marcado efecto citotóxico por lo que impidieron la división celular. Sin embargo este efecto se presentó desde la primera concentración probada, con la que se produjo una inhibición del índice mitótico correspondiente a 70.8%. Con respecto a la velocidad de división celular, se observó una inhibición del índice de replicación sólo con la concentración más alta (20 µg/mL), como consecuencia de una acumulación de células en primera división. En relación a la frecuencia de aberraciones cromosómicas los resultados indicaron un potente efecto del compuesto, originado principalmente por un incremento de las rupturas cromatídicas. La presencia de células fragmentadas desde la primera concentración probada indica la potencia genotóxica y citotóxica del compuesto. En conclusión, el presente estudio demostró que la crocidolita es clastogénica, citotóxica e inductora de ICHs en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Palabras clave: Crocidolita, linfocitos, intercambios de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas.

Introducción

Asbestos es el nombre comercial atribuido a diferentes fibras minerales incombustibles que contienen silicatos en su estructura química. La composición química de estas fibras inorgánicas y por consiguiente su clasificación, se establece de acuerdo a la presencia de residuos metálicos específicos, como silicatos magnésicos

Abstract

Crocidolite is a type of asbestos formed by silicates with iron and sodium, and is a component of the commercial asbestos used for numerous industrial and domestic purposes. Laboral and environmental exposure to asbestos have been correlated with deleterious health effects, mainly affecting the respiratory apparatus, where fibrosis (asbestosis) may be developed, as well as various types of cancers, such as bronchogenic carcinoma and mesothelioma. It is known that the genotoxic potential of chemicals acts as a preclinical indicator concerning the development of cancer; therefore, this investigation was made in human lymphocyte cultures with the following purposes: a) to determine the capacity of crocidolite as an inducer of chromosomal aberrations, b) to evaluate its capacity to induce sister chromatid exchanges (SCEs), and c) to evaluate its cytotoxicity and its effect on the cellular kinetics. Five concentrations of the compound were evaluated in 72 h-lymphocyte cultures obtained from a female human donor (5, 10, 20, 40 and 80 µg/mL). The results showed a concentration-dependent SCE increase produced by crocidolite with the three low concentrations tested, being 46.8% the maximum increase obtained with 20 µg/mL. The two highest concentrations (40 and 80 µg/mL) were cytotoxic and avoided the cellular division; however, this inhibitory effect was observed even with the lowest concentration tested, which produced a 70.8% reduction of the mitotic index. Concerning the rate of cellular division, it was shown an accumulation of first cellular division with the high concentration (20 µg/mL) inducing an inhibitory effect on the replicative index. With respect to the frequency of chromosomal aberrations we showed a potent effect of the chemical which was mainly due to an increase in the number of chromatidic breaks. The presence of fragmented cells was observed from the first concentration used in the assay indicating the genotoxic and cytotoxic potency of the compound. In conclusion, the present study demonstrated that crocidolite is clastogenic, cytotoxic and an SCE inducer in culture human lymphocytes treated *in vitro*.

Key words: Crocidolite, lymphocytes, sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations.

sencillos (crisotilo), silicatos complejos con hierro y magnesio (antofilita y amosita) y silicatos que contienen hierro y sodio hidratados (crocidolita)^{1, 2}.

Debido a su alta capacidad para hilarse, el asbestos ha tenido gran demanda en la elaboración de productos industriales y domésticos (fabricación de tinacos, láminas incombustibles

utilizadas para la construcción, revestimiento de barcos y aislantes para la industria eléctrica)³. Este producto tiene una indudable utilidad en diversas actividades de la sociedad, sin embargo, la exposición laboral y ambiental al asbesto ha mostrado efectos nocivos en la salud humana, principalmente en el aparato respiratorio, donde se puede desarrollar fibrosis (asbestosis), y varios tipos de cánceres como carcinoma broncogénico y mesotelioma⁴⁻⁷.

La crocidolita es un mineral de color azul que está formado por fibras suaves, delgadas (de 0.2 a 0.6 μ de ancho), con una elevada resistencia a los ácidos y una alta capacidad de tensión, por lo que en México, se utiliza principalmente fusionada al cemento para la elaboración de tinacos, láminas y aislantes térmicos en los edificios^{8, 9}.

Los modelos experimentales que evalúan alteraciones genéticas, constituyen valiosos instrumentos que permiten establecer el potencial genotóxico de los agentes en estudio y que proporcionan información necesaria para proponer medidas de prevención en la salud de los individuos expuestos, particularmente mediante la reducción de los niveles de exposición al agente involucrado. En el caso de la crocidolita, los estudios han mostrado resultados positivos al medir aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y micronúcleos en células de hámster chino, células mesoteliales, células epiteliales bronquiales y linfocitos humanos¹⁰⁻¹³; sin embargo, también se han reportado resultados negativos, por ejemplo en células epiteliales bronquiales, fibroblastos y linfoblastos humanos^{10, 13-16}.

Uno de los modelos que permite el análisis de alteraciones producidas en los cromosomas se basa en la posibilidad de teñir diferencialmente al cromosoma, es decir, que una cromátida se observe oscura y la otra pálida. Esta técnica permite clasificar a las mitosis en aquellas de primera división (con cromosomas oscuros en ambas cromátidas), de segunda división (con una cromátida oscura y una clara) y de tercera división (con cromátidas claras y oscuras en diversa proporción)¹⁷. Este tipo de tinción permite evaluar con precisión la cantidad de aberraciones cromosómicas en las células de primera división, los ICHs en las de segunda división, y estudiar la progresión celular, al cuantificar el número de células en cada una de las tres diferentes divisiones. El ICH es una lesión cromosómica que puede producirse por la acción de agentes químicos y se refiere a la producción de intercambios de segmentos homólogos, de tamaño variable, entre las cromátidas hermanas de cualquier cromosoma. Su utilidad como indicador de daño genotóxico ha sido ampliamente estudiado¹⁸.

El presente trabajo se desarrolló al considerar que la crocidolita es una parte fundamental del asbesto comercial y que es un agente causal del cáncer; además, que los antecedentes sobre su genotoxicidad muestran datos heterogéneos y que existen pocos

estudios realizados *in vitro*. El trabajo se efectuó en cultivos de linfocitos humanos con los objetivos: a) determinar la capacidad del compuesto para producir aberraciones cromosómicas estructurales, b) evaluar su capacidad para inducir ICHs, c) analizar su efecto citotóxico y d) analizar su efecto sobre la proliferación celular.

Material y Métodos

Material biológico

Se utilizó la sangre periférica de un donador femenino de 27 años, clínicamente sano, el cual no había estado expuesto a radiaciones o cualquier otro mutágeno en un período de 2 meses previos al estudio.

Material químico

Los reactivos utilizados en el estudio se compraron en diferentes compañías: la colchicina, el colorante Höechst 33258 y la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) se obtuvieron en Sigma Chemicals (St Louis, Mo, USA.), el colorante de Giemsa se obtuvo en Merck (Méjico, D.F.), el medio de cultivo McCoy 5A y la fitohemaglutinina se compraron en *In vitro* (Méjico, D. F.) y las sales para preparar el amortiguador de fosfatos se obtuvieron en J.T. Baker (Méjico D.F.).y fueron el fosfato de sodio dibásico y el fosfato de potasio monobásico.

La crocidolita fue una donación de la M. en C. Ma. Dolores Gutiérrez, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, el compuesto se diluyó en solución salina (3.6mg/mL) y la mezcla se sonificó durante un minuto en 5 ocasiones, utilizando un aparato Broun-Sonic 1510 Mulsungen AG. Posteriormente la mezcla se esterilizó en autoclave (15lb/15min) y se hicieron las diluciones apropiadas para obtener las concentraciones finales de 5, 10, 20, 40 y 80 μ g/mL.

Ensayo genotóxico

Se prepararon 12 frascos estériles (por duplicado), cada uno con 8.5mL de medio McCoy 5A, 0.4mL de fitohemaglutinina y 0.5mL de sangre periférica. Una vez preparados con estas sustancias se les adicionó las concentraciones seleccionadas de crocidolita. Los frascos se incubaron a 37°C durante 24 horas y entonces se agregó la BrdU (20 μ M), manteniendo dicho agente por 48 horas más. Una hora antes de finalizar este período se agregó colchicina (0.02 μ g/mL) a cada frasco. La suspensión celular se colocó en solución de KCL (0.075 M) a 37°C por 30 minutos para propiciar la separación de los cromosomas y posteriormente se fijó 3 veces en una solución de metanol-ácido acético (3:1). Se hicieron 4 laminillas por tubo y se tiñeron durante 30 minutos con Hoechst 33258; posteriormente se lavaron con agua destilada, se cubrieron con una solución buffer

Tabla 1. Efecto de la crocidolita en cultivos de linfocitos humanos. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs), índice mitótico (IM) e índice de replicación (IR).

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ICHs Intervalo	ICHs $\bar{X} \pm \text{D.E}$	IM %	IR
0	2 - 9	7.5 ± 0.4	2.4	2.07
5	5 - 14	9.8 ± 0.5	^a 1.3	2.08
10	6 - 17	12.5 ± 0.6	^b 0.9	2.11
20	9 - 21	14.1 ± 0.6	^b 0.7	^b 1.86
40			^b 0.4	
80			^b 0.2	

Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control:
^a con la prueba t de Student, ^b con la prueba Chi² ($p < 0.05$)

de citrato-fosfato y se expusieron a luz negra durante 60 minutos, al término de este período las células se lavaron en agua destilada, se secaron y se sumergieron en una solución salina-citratos durante 20 minutos a 60°C, nuevamente se lavaron, se secaron y finalmente se tiñeron con una solución de Giemsa al 4% durante 10 min. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones descritas previamente ¹⁹.

Las laminillas se evaluaron microscópicamente para determinar los siguientes parámetros por cada concentración: a) la frecuencia de aberraciones cromosómicas en 100 células metafásicas de primera división, b) la frecuencia de ICHs en 30 metafases de segunda división, c) la capacidad de división celular (índice mitótico) en 3000 células, y d) la cinética de replicación celular en 100 células metafásicas, la cual se establece al identificar la frecuencia de células en primera, segunda y tercera división celular (M1, M2, y M3), datos con los que se obtiene el índice de replicación (IR) de acuerdo a la ecuación: $IR = M1 + 2M2 + 3M3/100$.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos. Para evaluar la frecuencia de aberraciones cromosómicas y de ICHs se utilizó la prueba t de Student, mientras que los correspondientes al IR se analizaron con la prueba Chi².

Resultados

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos respecto a la frecuencia de ICHs, cinética de proliferación celular e índice mitótico. Se observó un incremento de ICHs, estadísticamente significativo, con las tres concentraciones que tuvieron suficientes células en segunda división para efectuar el análisis. Con las concentraciones más altas (40 y 80 $\mu\text{g/mL}$) la inhibición de la división celular

No. ICHs

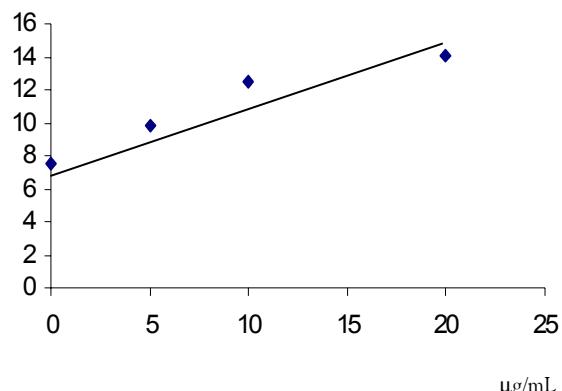


Figura 1. Inducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) producido por la crocidolita en cultivos de linfocitos humanos. Análisis de regresión lineal.
 $Y = 0.328X + 8.099$, con un coeficiente de correlación $r = 0.9614$

impidió la evaluación citogenética. El mayor daño se presentó con 20 $\mu\text{g/mL}$ y alcanzó casi el doble del nivel obtenido con el control, resultado que coincidió con la diferencia entre el número neto mas alto de ICHs observado en el testigo y el correspondiente a la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ (9 y 21 respectivamente). Además, el efecto fue dosis-dependiente, con un coeficiente de correlación de 0.9614 obtenido con la ecuación $Y = 0.328X + 8.099$ (Fig 1).

La crocidolita redujo el índice mitótico desde la primera concentración probada, la magnitud del efecto con las dos concentraciones mas altas sólo permitió la detección de escasas células en división, lo que explica la insuficiencia de mitosis para observación de ICHs. Por lo que se refiere al índice de replicación, sólo la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ inhibió este parámetro, como consecuencia de una acumulación de células en primera división.

La frecuencia de aberraciones cromosómicas se presenta en la tabla 2. Los resultados generales indicaron un potente efecto del compuesto, originado principalmente por un incremento de las rupturas cromatídicas, seguido por las lesiones isocromatídicas. La presencia de células fragmentadas indica la potencia del daño y es de hacerse notar que este fenómeno se presentó desde la primera concentración. Las brechas e isobrechas se refieren a adelgazamientos de la cromátida y usualmente se clasifican en forma independiente a las otras aberraciones por la posibilidad de introducir un factor subjetivo en el análisis; con la crocidolita se observó un resultado congruente, con un mayor incremento de las isobrechas y un comportamiento que fue dependiente de la concentración.

Si consideramos la frecuencia de alteraciones de tipo cromatídico/isocromatídico y los triradiiales, el aumento porcentual que se obtuvo con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ con relación al valor del control fue de 97.0, 97.5 y 98.6 %. Además la respuesta fue

Tabla 2. Frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales producidas por crocidolita en cultivo de linfocitos humanos.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	brechas	isobrechas	rupturas cromatídicas	rupturas isocromatídicas	triradiales	células fragmentadas	células afectadas	*Total % ± D.E
0	4	3	0	1	0	0	6	1 ± 0.01
5	7	8	23	11	0	0	37	^a 34 ± 0.34
10	11	9	19	18	4	3	43	^a 37 ± 0.37
20	13	18	39	26	9	6	68	^a 86 ± 0.65

* Total de rupturas cromatídicas e isocromatídicas

^aDiferencia estadísticamente significativa con respecto al control (t de Student, p < 0.05)

concentración-dependiente con un coeficiente de correlación igual a 0.9596 ($Y = 0.4697x + 14.4519$).

Discusión

En principio es conveniente mencionar que en México, al igual que en otros países, persiste una elevada incidencia de fibrosis y de mesotelioma maligno²⁰ y que en relación a estas afecciones, la mayoría de los estudios señalan a la crocidolita como uno de los principales agentes causales^{21, 22}. Por otro lado, las evidencias han mostrado que personas afectadas por estas enfermedades, o expuestas al asbestos durante varios años, presentan un significativo incremento de ICHs en comparación con la población control^{11, 23, 24}. Estos datos indican que el análisis de este parámetro es un valioso instrumento para establecer el potencial genotóxico de la crocidolita. La importancia de esta lesión también queda de manifiesto, al considerar que algunos investigadores han sugerido que el incremento de ICHs puede estar relacionado con el grado de mutación y de transformación neoplásica^{25, 26}. Lo anterior permite ubicar la relevancia que para la salud pueden tener los datos del presente trabajo, que demuestran el potencial genotóxico y citotóxico de la crocidolita. Sin embargo, es necesario que para la correcta interpretación de los resultados se considere la diferencia entre un sistema *in vitro* y uno *in vivo*, en el que participan los procesos de absorción, metabolismo, desintoxicación y eliminación, que podrían modificar en alguna medida los efectos aquí descritos.

Algunos estudios previos coinciden con nuestros resultados; por ejemplo, Price-Jones y colaboradores observaron que 30 $\mu\text{g/mL}$ de crocidolita produjo una duplicación en el número de ICHs en cultivos de fibroblastos ováricos de hámster chino²⁷, y con respecto a la citotoxicidad, Livingston y colaboradores²⁸, en un modelo similar al anterior, observaron que el compuesto permitió el crecimiento y división celular sólo con 10 $\mu\text{g/mL}$ pero lo inhibió con 100 $\mu\text{g/mL}$.

También el uso de modelos *in vivo* han dado resultados positivos; por ejemplo, la administración de crocidolita durante una semana en el agua de beber produjo un incremento en el número de micronúcleos y de ICHs en rata²⁹. La capacidad de la crocidolita para producir aberraciones cromosómicas se ha observado *in vitro* utilizando líneas celulares diferentes a las del presente estudio, aunque las lesiones preponderantes son similares (rupturas cromatídicas), lo que parece confirmar la actividad clastogénica del compuesto. En particular se han detectado aberraciones en la región heterocromática centromérica de los cromosomas 1 y 9^{12, 30-32}.

El mecanismo por el cual se produce el daño genotóxico aun no está elucidado. Estudios con microscopía electrónica indican un contacto directo entre la crocidolita y la célula³³, lo que ha sugerido que el daño podría originarse en alteraciones del ciclo celular que conducen a un retraso de la fase G2, lo que propicia cambios genéticos y anomalías en el proceso de mitosis^{34, 35}. Sin embargo, también se ha observado que la crocidolita induce la formación de radicales libres de oxígeno^{36, 37, 38}. Las evidencias al respecto provienen de análisis en cultivos celulares y en modelos animales y sugieren que estas moléculas, altamente reactivas, activan el factor de transcripción "Kappa-nuclear B" que regula la expresión de varios genes que codifican para la inmunoregulación de proteínas y de procesos inflamatorios, además, dicho factor de transcripción también participa en la activación del factor de necrosis tumoral^{39, 40}.

Los resultados del presente trabajo están en la misma línea que parte de alteraciones moleculares propiciadas por cambios genéticos, los cuales se reflejan en diversos efectos cromosómicos, cuya última expresión podría ser el desarrollo de una neoplasia. La información obtenida señala la importancia de continuar con la investigación acerca de la genotoxicidad producida por los diferentes tipos de asbestos, particularmente en el de tipo comercial que es al que usualmente están expuestos los organismos.

Referencias

1. Merchant JA. Human epidemiology: A review of fiber type and characteristics in the development of malignant and non-malignant disease. *Environ Health Perspect* 1990; 88: 287-293.
2. Warheit DB, Hart GA, Hesterberg TW. Fibers. Toxicology. 1a. ed. Academic Press, San Diego. USA; 1999. p. 833 - 834.
3. Selikoff JJ. Historical developments and perspectives in inorganic fiber toxicity in man. *Environ Health Perspect* 1990; 88: 269 - 276.
4. Henry C, Pitot I, Dragan Y. Chemical carcinogenesis. Casarett and Doull's Toxicology The basic science of poisons. 5a. ed. New York. USA: McGraw-Hill.; 1996. p. 244 - 245.
5. Bofetta P. Health effects of asbestos exposure in humans: a quantitative assessment. *Med Lav* 1998; 89: 471 - 480.
6. Albin M, Magnani C, Krstev S, Rapiti F, Shefer I. Asbestos and cancer: A review of current trends in Europe. *Environ Health Perspect* 1999; suppl 2: 289 - 298.
7. Rodríguez-Panadero F. Malignant pleural diseases. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55: 17 - 19.
8. Sandoval OH, Schorr TS. Asbesto. ECO-OPS-OMS. México; 1983. p. 13 - 45.
9. Linddell D. Exposure to mineral fibers and human health: historical background. In: Liddell, Miller K. (Eds). Boca Raton. Florida. CRC Press; 1991. p. 1 - 10.
10. Kuroki T, Matsushima T. Performance of short-term for detection of human carcinogens. *Mutagenesis* 1987; 2: 33 - 37.
11. Fatma N, Jain AK, Rahman Q. Frequency of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in asbestos cement workers. *Br J Ind Med* 1991; 48(2): 103 - 105.
12. Dopp E, Saedler J, Stopper H, Weiss DG, Schiffmann D. Mitotic disturbances and micronucleus induction in Syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos fibers. *Environ Health Perspect* 1995; 103(3): 268 - 271.
13. Achard S, Perderiset M, Jaurand M. Sister chromatid exchanges in rat pleural mesothelial cells treated with crocidolite, attapulgite, or benzo3-4 pyrene. *Br J Ind Med* 1987; 44(4): 281 - 283.
14. Kelsey KT, Yano E, Liber H, Little JB. The *in vitro* genetics effects of erionite and crocidolite asbestos. *Br J Cancer* 1986; 54(1): 107 - 114.
15. Hei TK, Geard CR, Osmak RS, Travisano M. Correlation of *in vitro* genotoxicity and oncogenicity induced by radiation and asbestos fibers. *Br J Cancer* 1985; 52(4): 591 - 597.
16. Kodama Y, Boreiko CJ, Maness SC, Hesterberg T. Citotoxic and cytogenetic effects of asbestos on human bronchial epithelial cells in culture. *Carcinogenesis* 1993; 14: 691 - 697.
17. Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251(5471): 156 - 158.
18. Madrigal-Bujaidar E, Sánchez-Sánchez MA. Sister-chromatid exchange análisis using different 5 bromodeoxyuridine labeling systems. *Mutat Res* 1991; 262: 15 - 19.
19. Goto K, Akewatsu T, Shimazo H, Sugiyama T. Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 1975; 53: 223 - 230.
20. García-López MP, Barrera-Rodríguez R. Malignant mesothelioma: clinical and radiological description of 45 cases with and without asbestos exposure. *Salud Pública Mex* 2000; 42(6): 511 - 519.
21. Algranti E. Asbestos: Current issues related to cancer and to uses in developing countries. *Cad Saude Publica* 1998; 14(3): 173-176.
22. Sakai K, Hisanaga N, Shibata E, Kojima A, Takeuchi Y. Types and dimensions of mineral fibers in the atmosphere and from lungs of residents in the urban area. *Nippon Koshu Eisei Zasshi* 1998; 45(9): 921-933.
23. Donmez H, Ozkul Y, Ucak R. Sister chromatid exchange frequency in habitants exposed to asbestos in Turkey. *Mutat Res* 1996; 361(2-3): 129 - 132.
24. Atalay F, Baltaci V, Alpas I, Savas I, Atikcan S, Balci S. Sister chromatid exchange rate from pleural fluid cells in patients with malignant mesothelioma. *Mutat Res* 2000; 465(1-2): 159 - 163.
25. Carranco AV, Thompson LM. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature* 1978; 271: 551 - 553.
26. Rom WN, Livingston GK, Casey KR, Wood SD, Egger MJ, Chui GL, et al. Sister chromatid exchanges frequency in asbestos works. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70(1): 45 - 48.
27. Price-Jones MC, Gubbings C. The genetic effects of crocidolite asbestos: comparations of chromosome abnormalities and sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 1980; 79: 331 - 336.
28. Livingston GK, Rom WN, Morris MV. Asbestos-induced sister chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovarian fibroblast cells. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 4(2-3): 373 - 382.
29. Varga C, Pocsai Z, Horvath G, Timbrell V. Studies on genotoxicity of orally administered crocidolite asbestos in rats: implications for ingested asbestos induced carcinogenesis. *Anticancer Res* 1996; 16(2): 811 - 814.
30. Dopp E, Schuler M, Schiffmann D, Eastmond DA. Induction of micronucleic, hyperploidy and chromosomal breakage affecting the centric/pericentric regions of chromosomes 1 and 9 in human amniotic fluid cells after treatment with asbestos and ceramic fibers. *Mutat Res* 1997; 377(1): 77 - 87.
31. Dopp E, Schiffmann D. Analysis of chromosomal alterations induced by asbestos and ceramic fibers. *Toxicol Lett* 1998; 96-97: 155 - 162.
32. Preston-Martin S, Pike M, Ross R, Jones P, Henderson B. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 7415 - 7421.
33. Wang N, Jaurand MC, Magne L, Kheuang L, Pinchon M. The interactions between asbestos fibers and metaphase chromosomes of rat pleural mesothelial cells in culture. *Am J Pathol* 1987; 126(2): 343 - 349.
34. Mossman BT. Carcinogenesis and related cell and tissue response to asbestos: a review. *Ann Occup Hyg* 1994; 38(4): 617 - 624.
35. Levresse V, Renier A, Fleury-Feith J, Levy F, Moritz S, Vivo C, Pilatte Y, Jaurand MC. Analysis of cell cycle disruptions in cultures of rat pleural mesothelial cells exposed to asbestos fibers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17(6): 657 - 659.
36. Dong H, Buard A, Renier A, Levy F, Saint-Etienne L, Jaurand MC. Role of oxygen derivates in the cytotoxicity and DNA damage produced by asbestos on rat pleural mesothelial cells *in vitro*. *Carcinogenesis* 1994; 15(6): 1251 - 1255.
37. Xu A, Wu Lj, Santella RM, Hei TK. Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells. *Cancer Res* 1999; 59(23): 5922 - 5926.
38. Kinnula VL. Oxidant and antioxidant mechanisms of lung disease caused by asbestos fibres. *Eur Respir J* 1999; 14(3): 706 - 716.
39. Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein D, Janssen YM, Mossman BT. Crocidolite activates NF-kappa B and MIP-2 gene expression in rat alveolar epithelial cells. Role of mitochondrial-derived oxidants. *Environ Health Perspect* 1998; 106(5): 1171 -1174.
40. Fujino A, Hori H, Higashi T, Morimoto Y, Tanaka I, Kaji H. *In vitro* biological study to evaluate the toxic potentials of fibrous materials. *Int J Occup Environ Health* 1995; 1(1): 21 - 28.