

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2020.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**EFEITOS DOS CORANTES PRESENTES NA TINTURA CAPILAR PRETA SOBRE
CÉLULAS DE BEXIGA HUMANA.**

MICHELE PERISATTO BERRETA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro
2018

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**EFEITOS DOS CORANTES PRESENTES NA TINTURA CAPILAR PRETA SOBRE
CÉLULAS DE BEXIGA HUMANA.**

MICHELE PERISATTO BERRETA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro
2018

574.88 Berreta, Michele Perisatto
B533e Efeito dos corantes presentes na tintura capilar preta
sobre células de bexiga humana. / Michele Perisatto Berreta. -
Rio Claro, 2018
98 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Biologia molecular. 2. Tinturas capilares. 3. Corantes
azo. 4. Ensaio do cometa. 5. Linhagem celular 5637. 6.
Peróxido de hidrogênio. 7. Teste do micronúcleo. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DOS CORANTES PRESENTES NA TINTURA CAPILAR PRETA SOBRE CÉLULAS DE BEXIGA HUMANA.

AUTORA: MICHELE PERISATTO BERRETA

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. DANIELA MORAIS LEME
Departamento de Genética / Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Paulista

Rio Claro, 23 de fevereiro de 2018

*Aos meus queridos e amados pais,
Oscar e Eliana, por serem minha
inspiração e motivação diária e de
quem tenho tanto orgulho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Oscar e Eliana, por sempre me motivarem, nunca me deixarem desistir e serem meu exemplo de pessoas a se espelhar. Vocês acreditaram em mim e na minha capacidade, estiveram sempre do meu lado me apoiando e são os grandes responsáveis pelas minhas conquistas. Tenho orgulho de poder dizer quão maravilhosos meus pais são.

Ao meu namorado, Gabriel, que aguentou meu mau humor e momentos de chatice, e, ainda assim, sempre esteve ao meu lado e também nunca me deixou desistir. Você sabe o quanto essa jornada foi difícil e, por isso, agradeço toda a paciência, carinho e risadas.

À minha família jundiaiense, Rose, Amauri, Gustavo e Nathália que sempre me acolheram muito bem e me fazem sentir como parte da família. Agradeço a vocês por todo o carinho, conselhos, amizade e momentos que tenho o prazer de poder passar com vocês.

À minha orientadora e amiga Marin, que aceitou o desafio de me orientar a seis anos atrás e, mesmo após esse tempo, sempre encontra um jeito de me surpreender e maravilhar com sua sabedoria. Você acreditou e confiou em mim mesmo sabendo da rotina pesada que eu teria, e sou imensamente grata a isso. Sem você, não teria chegado tão longe. Você é um exemplo de profissional e de pessoa.

Aos amigos e colegas mutagênicos, Adriana, Camila, Cleiton, Cristina, Dânia, Fernanda, Franco, Jaqueline, Jorge, Lais, Letícia Bulascoshi, Letícia Gigeck, Letícia Gonçalves, Letícia Rocha, Márcia, Maria Tereza, Maria Paula, Matheus, Mileni, Nádia, Raphael, Raquel, Samantha, Tamara, Thays e William, alguns longe, outros perto, por todo o convívio, pelas conversas e risadas, por toda a ajuda (às vezes, até de última hora).

Às amigas Andrea, Débora, Jéssica, Laila e Tatiane, por fazerem parte dessa jornada, por toda a convivência (mesmo que à distância), pelo carinho, apoio, conversas e conselhos. Sei que posso sempre contar com vocês e, por isso, agradeço.

Aos amigos “à distância” Aira, Andréa, Luis e Mariana, que me acompanharam desde a graduação (ou antes), por todas as conversas (às vezes semestrais ou anuais), incentivo, momentos de alegria (e de tristeza). Vocês fazem parte disso, e são amigos que vou levar para a vida.

Aos amigos Cris e Gérson, do departamento de Biologia, que sempre me ajudaram e por todas as conversas e risadas.

À Capes, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

“We are at the very beginning of time for the human race. It is not unreasonable that we grapple with problems. But there are tens of thousands of years in the future. Our responsibility is to do what we can, learn what we can, improve solutions and pass them on.”

Richard P. Feynman

RESUMO

Fazer uso de tinturas capilares é uma prática amplamente difundida por todo o mundo e, por isso, motivo de debate sobre os impactos que elas podem conferir à saúde humana. Essa preocupação se deve, além do fato das tinturas serem constituídas por diversos compostos, também por algumas delas possuírem corantes azo que são compostos que, ao serem reduzidos, liberam aminas aromáticas, que podem ser ainda mais tóxicas que os compostos originais. Tanto os corantes quanto seus derivados podem ser absorvidos pela pele e alcançar órgãos como a bexiga, onde podem representar um risco para o desenvolvimento de câncer. Frente a essa problemática, esse estudo teve como objetivo avaliar, na linhagem de células de bexiga (5637), a citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e o potencial de indução de estresse oxidativo dos corantes Arianor Cherry Red, Arianor Sienna Brown e Arianor Ebony, utilizados na formulação da tintura capilar preta. Para avaliar a citotoxicidade pelo teste da resazurina, foram testadas concentrações entre 20 a 1,25 mg/L do corante Cherry Red, 400 a 18,75 mg/L do Sienna Brown, 3.200 a 3,75 mg/L do Ebony, 100 a 0,16 % dos corantes associados entre si e 0,31 a 0,03 % dos corantes associados entre si e com peróxido de hidrogênio. Dessas concentrações, foram escolhidas três com viabilidade celular acima de 80 % por tratamento: Cherry Red: 5,0, 2,5 e 1,2 mg/L; Sienna Brown: 100, 50 e 25 mg/L; Ebony: 10, 7,5 e 5 mg/L; associação entre corantes: 0,31, 0,26 e 0,16 %; e associação com peróxido de hidrogênio: 0,08, 0,06 e 0,04 %. Essas concentrações foram utilizadas para avaliar a genotoxicidade, mutagenicidade e as atividades antioxidativas das células. Pelo ensaio do cometa foi observado que todos os tratamentos tiveram efeito genotóxico significativo sobre as células de bexiga. Esse efeito foi confirmado pelo teste do MN em que foi observado um número significativo de pontes, para quase todos os tratamentos (com exceção da concentração de 5 mg/L do Cherry Red, 0,16 % da associação e 0,08 e 0,04 % da associação com peróxido de hidrogênio) e valores significativos de brotos para todos os tratamentos testados. O teste do MN ainda mostrou que foi encontrado um número significativo de micronúcleos para todos os tratamentos testados, indicando que todos eles têm potencial mutagênicos sobre as células de bexiga. Ainda pelo teste do MN foi possível observar que todos os tratamentos reduziram significativamente os índices de divisão celular. As defesas antioxidantes das células foram avaliadas pela atividade da enzima SOD e pelos níveis de GSH e TBARs. Os níveis enzimáticos da SOD foram significativamente maiores, em relação ao controle negativo, para a concentração de 1,25 mg/L do Cherry Red e para todas as associações com e sem peróxido de hidrogênio. Os níveis de GSH mostraram-se significativamente maiores para as concentrações de 5 e 1,25 mg/L do Cherry Red, 10 mg/L do Ebony, 0,16 % da associação e 0,06 e 0,04 % da associação com peróxido de hidrogênio e significativamente menores para as concentrações de 50 e 25 mg/L do Sienna Brown. Os níveis de TBARs foram estatisticamente maiores apenas para as concentrações de 50 mg/L do Sienna Brown, 10 e 7,5 mg/L do Ebony e 0,04 % da associação de corantes com peróxido de hidrogênio. Esses resultados indicam que, de forma geral, os corantes estudados têm potencial de danificar as células, tanto na ausência como na presença de peróxido de hidrogênio. Os efeitos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos e indutores de estresse oxidativos foram observados para concentrações muito mais baixas que as presentes nas tinturas capilares. Essa ação danosa pode ser devida tanto a presença de estruturas azo como de aminas aromáticas derivadas da redução desses corantes. Os

resultados desse estudo, além de trazer informações para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos corantes, servem de alerta para consumidores e profissionais da área da estética, que se expõem, diariamente, a esses compostos.

Palavras-chave: corantes azo, ensaio do cometa, estresse oxidativo, linhagem celular 5637, peróxido de hidrogênio, teste da resazurina, teste do micronúcleo.

ABSTRACT

Hair dyeing is a widespread worldwide practice and because of this, the reason of the discussion about the impacts that the hair dyes may have over human health. This concern is since some dyes have azo compounds which, after being reduced, release aromatic amines that can be even more toxic than the original compounds. Both the dyes and its derivatives can be absorbed by skin and reach organs, like the bladder, where they may present a risk for cancer development. Due to this problem, this study aimed to assess, on the bladder cell line (5637), the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and the stress oxidative induction potential of the dyes Arianor Cherry Red, Arianor Sienna Brown e Arianor Ebony used in the black hair dye formula. To evaluate the cytotoxicity by the resazurina assay, 10 concentrations of Cherry Red, 10 of Sienna Brown, 22 of Ebony, 17 of mixture of the dyes and 12 of the mixture of dye and hydrogen peroxide were tested. Among these concentrations, three of each treatment with cell viability of 80 % or more were chosen: Cherry Red: 5.0, 2.5 e 1.2 mg/L; Sienna Brown: 100, 50 e 25 mg/L; Ebony: 10, 7.5 e 5 mg/L; dye mixture: 0.31, 0.26 e 0.16 %; e dye mixture with hydrogen peroxide: 0.08, 0.06 e 0.04 %. These concentrations were used to assess the genotoxicity, mutagenicity and the antioxidant activity of the cells. The comet assay showed that all treatments had a significant genotoxic effect over the bladder cells. This effect was confirmed by the MN test which showed significant values for bridge, to almost all treatments, and significant values for nuclear buds to all tested treatments. The MN test also presented a high number of micronuclei to all tested treatments, indicating that all of them have a mutagenic potential over the cells. It was observed by the MN test that all treatments significantly decreased the cell division index. The antioxidant defenses of the cell were evaluated by the activity of the enzyme SOD and by the levels of GSH and TBARs. The enzymatic levels of SOD were significantly higher, in relation to the negative control, to the concentrations of 1.25 mg/L of Cherry Red and to all concentrations of the dye mixture, with and without hydrogen peroxide. GSH levels showed significantly higher to the concentrations of 5 and 1.25 mg/L (Cherry Red) 10 mg/L (Ebony), 0.16 % (dye mixture) and 0.06 e 0.04 % (dye mixture with hydrogen peroxide) and significantly lower to the concentrations of 50 and 25 mg/L (Sienna Brown). TBARs levels were statistically higher only for the concentrations of 50 mg/L (Sienna Brown), 10 and 7,5 mg/L (Ebony) e 0,04 % (dye mixture with hydrogen peroxide). These results indicate that, in general, the studied dyes have the potential to damage cell, both in the presence or absence of the hydrogen peroxide. The toxic, genotoxic, mutagenic and oxidative stress inductor effects were observed to concentrations much lower than the one present in the hair dyes. This harmful action may be due to both the presence of azo structures and aromatic amines derived from the reduction of these dyes. The results of this study, besides bringing information to a better comprehension of the action mechanisms of the dyes, serve as an alert to consumers and professionals that get exposed, daily, to these compounds.

Palavras-chave: azo dyes, cell line 5637, comet assay, hydrogen peroxide, micronucleus test, oxidative stress, resazurina assay.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDCP	Black Dye Commercial Product
CHO-K1	Células de ovário de hamster chinês
CN	Controle Negativo
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Controle Positivo
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido dinitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPIs	Equipamentos de proteção individual
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
ICDN	Índice Citotóxico de Divisão Nuclear
KCl	Cloreto de potássio
kHz	Quilohertz
mA	Miliampere
MDA	Malondialdeído
MMS	Methyl methanesulfonate (metano sulfonato de metila)
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de 3-(4,5dimetiltiazil-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
PBS-EDTA	Tampão fosfato salino com EDTA
PPD	Parafenilenodiamina
PTD	2,5-diaminotolueno
ROS	Reactive species of oxygen (espécies reativas de oxigênio)
SBF	Soro bovino fetal
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloacético
Tris	Tris aminometano
UV	Ultravioleta
V	Volt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS GERAIS	13
2.1. Objetivos específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Histórico das tinturas.....	14
3.2. As tinturas capilares.....	15
3.3. Alerta sobre o uso de tinturas capilares.....	17
3.4. O uso de cultura celular	19
3.5. Testes de citotoxicidade com resazurina	20
3.6. O ensaio do cometa	21
3.7. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese.....	22
3.8. Estresse oxidativo	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Material químico.....	25
4.2. Material biológico	25
4.2.1. <i>Manutenção e uso da linhagem celular 5637</i>	25
4.3. Ensaio da resazurina	26
4.4. Ensaio do cometa	26
4.5. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese.....	28
4.6. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes	28
4.6.1. <i>Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)</i>	29
4.6.2. <i>Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)</i>	29
4.6.3. <i>Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)</i>	30
5. RESULTADOS	31
Artigo 1: Cito- genotoxicidade de corantes de cabelo para células de bexiga humana.	32
Artigo 2: Avaliação dos efeitos da mistura de corantes usada em tinturas capilares, com e sem associação com peróxido de hidrogênio, sob células de bexiga humana.	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de tinturas capilares é uma prática comum em todo o mundo e o impacto que elas proporcionam à saúde humana se tornou um assunto de grande interesse de estudo e discussão. Um dos motivos dessa preocupação deve-se ao fato dessas tinturas terem em sua constituição a presença de corantes sintéticos, principalmente os pertencentes à classe dos corantes azo ($R-N=N-R'$), que apresentam alta toxicidade (NOVOTNÝ et al., 2006; GIORGETTI et al., 2011). Esses corantes, ao sofrerem biotransformação durante a detoxificação celular, podem formar aminas aromáticas que são ainda mais tóxicas que os compostos originais (UMBUZEIRO et al., 2005; CHUNG, 2016). Estudos mostram que tanto os corantes azoicos quanto as aminas aromáticas produzidas pela metabolização dos corantes são carcinogênicas, pois são compostos capazes de interferir e modificar a molécula do DNA (YAHAGI et al., 1975).

A células presentes na epiderme têm a capacidade de reduzir os corantes azo (BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017), formar metabólitos que podem ser absorvidos pela pele (KORINTH et al., 2013) e alcançar órgãos como a bexiga (ANDREW et al., 2004). Alguns autores encontraram tanto componentes de tinturas capilares como os seus derivados em urina de pessoas que fazem uso desses cosméticos (HOWES; BLACK, 1983; YOURIC; BRONAUGH, 2000). Assim, a bexiga torna-se um alvo de vulnerabilidade para ação tóxica desses compostos. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos realizados por Nohynek et al. (2015), onde os autores encontraram parafenildiamina, um composto presente em tinturas capilares, na urina de usuários desses cosméticos. Estudos realizados por Kogevinas et al. (2003) mostraram que, na população masculina do oeste da Europa, 1 entre 20 cânceres de bexiga podem ser atribuídos a atividades ocupacionais. Alguns estudos epidemiológicos mostram que pessoas que se expõem às tinturas capilares, como cabeleireiros, barbeiros e esteticistas, apresentam um risco maior de desenvolver câncer de bexiga (CZENE et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Mulheres que fazem uso de tintura permanente também apresentam risco de carcinogenicidade de bexiga, como mostrado por Gago-Dominguez et al. (2001). Os autores apontam para um fator de risco 2,1 vezes maior, em comparação com mulheres que não fazem uso desses produtos. Um estudo publicado recentemente por Hadkhale et al. (2017) também mostrou que cabeleireiros do Canadá e cabeleireiras dos países nórdicos apresentam um alto risco de desenvolver câncer de bexiga.

Frente às evidências apontadas anteriormente sobre os prováveis efeitos tóxicos das tinturas capilares, fica clara a necessidade de estudos que melhor avaliem os corantes que as compõem, para que se possa ter uma melhor compreensão dos efeitos desses corantes sobre os constituintes celulares, inclusive sobre o material genético. Essas informações permitiriam o estabelecimento de níveis de segurança para o uso de tinturas, não só para consumidores, mas também para profissionais da área da cosmetologia.

O presente estudo avaliou, por meio de diversos bioensaios realizados com células de uma linhagem de bexiga humana (linhagem 5637), os efeitos dos corantes utilizados na formulação da tintura de cabelo preta. Os ensaios *in vitro*, realizados com culturas celulares, possuem a vantagem de serem desenvolvidos sob condições ambientais controladas, usar células com características estáveis e expor as células em diferentes fases do ciclo celular (RABELLO-GAY 1991). Outras vantagens desses bioensaios são a utilização de pequenas amostras de células, o que evita o uso e sacrifício de animais na pesquisa (CARVALHO, 1993).

O potencial citotóxico de diversos compostos pode ser avaliado pelo teste da resazurina, que é um corante que não apresenta ação tóxica para as células (VAN TONDER et al., 2015). Esse teste é muito eficiente para avaliar compostos que possuem cor pois, a resazurina, quando metabolizada, se transforma em resofurina, e emite fluorescência rosa (O'BRIEN et al, 2000; RAMPERSAD, 2012), por isso a leitura deste teste é feito em fluorímetro.

Os danos no DNA, causados por corantes capilares, podem ser estimados pelo ensaio do cometa. Este teste é capaz de detectar baixos níveis de danos e pode ser aplicado em cultura celular, necessitando uma pequena quantidade de células para análise (COLLINS, 2004). Esse ensaio baseia-se em lisar a membrana das células, submetendo o nucleóide a uma corrente elétrica. Quando houver danos no DNA, haverá a migração de fragmentos na lâmina, cujo arraste lembra a figura de um cometa.

A avaliação do potencial mutagênico em culturas celulares é feita por meio do ensaio do micronúcleo (MN). Nesse ensaio, o material genético que foi perdido do núcleo celular, por quebras cromossômicas que originaram fragmentos acêntricos, ou por perda de cromossomos inteiros, que não se ligaram aos fusos mitótico, formam micronúcleos, que podem ser observados após um ciclo de divisão (FENECH, 2000). Para assegurar que houve um ciclo celular nas células analisadas, usa-se

citocalasina B, uma substância que impede a citocinese, mas não a cariocinese, tendo como resultado, uma célula com dois núcleos e os eventuais micronúcleos que foram induzidos pelo agente testado (FENECH, 2000).

Um outro parâmetro importante na avaliação da ação de xenobiontes sobre culturas celulares é a análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células, após a exposição das mesmas ao agente investigado.

As ROS são moléculas que possuem elétrons livres ou não pareados, isso conferem a elas uma alta instabilidade elétrica. Mesmo tendo uma meia vida muito curta, elas podem reagir com qualquer composto que possa doar ou compartilhar elétron para sua estabilização. Quando elas reagem com componentes celulares, podem gerar moléculas que induzem danos às células. Quando os níveis de espécies reativas aumentam muito, são acionados os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos das células, para eliminar as ROS do meio (CESARATTO et al., 2004).

Existem duas fontes de ROS nas células: as endógenas, que são induzidas naturalmente pelos subprodutos do metabolismo aeróbio das células e as exógenas, geradas por ação de agentes externos à célula. Esses xenobiontes desequilibram o sistema celular e causam danos às macromoléculas, como o DNA (KRYSTON et al., 2011). O acúmulo de danos oxidativos ocorre por ineficiência do sistema de reparo ou por reparo incompleto das células. As ROS de origem exógenas podem ser perigosas para o sistema celular e dar início a processos de carcinogênese (KRYSTON et al., 2011).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nessa pesquisa nos permitem concluir que:

- Todos os corantes estudados, individualmente ou em associação, com e sem adição de peróxido de hidrogênio, apresentaram efeitos citotóxicos para células de bexiga, tanto para as concentrações são usadas na formulação da tintura capilar preta como as indicadas para uso pelo fabricante. A viabilidade celular, maior que 80 %, necessária para ser usadas em testes genotóxicos (ensaio do cometa) e mutagênicos (MN), só foi obtida para células expostas à concentrações muito mais baixas que as utilizadas pelos consumidores;
- Mesmo em baixas concentrações, todos os tratamentos (corante individuais e em mistura e misturas associadas com peróxido de hidrogênio) apresentaram efeitos genotóxicos (ensaio do cometa) sobre as células de bexiga;
- Foi observado efeito genotóxico também para o teste do MN, pois as células apresentaram altos índices de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, provavelmente devido à ação clastogênica dos corantes azo;
- Todos os corantes, individualmente ou em associações, entre si e com o peróxido de hidrogênio apresentaram atividade mutagênica, comprovada pelo teste do MN;
- Pelo teste do MN, ainda foi possível observar que todos os corantes, individualmente e em associações com e sem adição de peróxido de hidrogênio, foram capazes de induzir uma significativa redução na divisão celular, indicando citotoxicidade. Esse efeito também foi conferido por concentrações muito inferiores à utilizada na preparação da tintura capilar preta;
- Algumas concentrações da mistura dos corantes, presentes na formulação da tintura preta, foram capazes de alterar o equilíbrio ROS-defesa antioxidante das células, efeito este que pode levar a risco oxidativos para elas e até a indução de processos de carcinogênese;
- Devido a todas essas evidências, podemos afirmar que existe uma alta possibilidade desses corantes (em todas as formas testadas) conferirem riscos à saúde humana, tanto para os profissionais que se expõem diariamente a eles como para os consumidores desses produtos;
- Essa pesquisa é pioneira na avaliação dos efeitos desses corantes sobre as células de bexiga, órgão este considerado vulnerável a ação esses compostos. Pela

característica funcional deste órgão, ele pode permanecer exposto tanto aos corantes como aos seus metabólitos, ficando mais tempo vulneráveis à ação dos mesmos, o que pode conferir um maior risco de desenvolvimento de cânceres;

- São necessários mais estudos que elucidem os mecanismos de ação dos corantes utilizados em tinturas capilares, para poder avaliar as reais consequências do uso de tinturas capilares, para a saúde humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Isolating cells and growing them in culture. In: _____. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002, p.469-478.

ANDREW A.S.; SCHNED, A.R.; HEANEY, J.A.; KARAGAS, M.R. Bladder cancer risk and personal hair dye use. **International Journal of Cancer**, v.109, p.581–586, 2004.

ANTELMÍ, A.; YOUNG, E.; SVEDMAN, C.; ZIMERSOON, E.; ENGFELDT, M.; FOTI, C.; BRUZE, M. Are glove sufficiently protective when hairdressers are exposed to permanent hair dyes? An *in vivo* study. **Contact Dermatitis**, v.72, p.229-236, 2015

BAFANA, A.; DEVI, S.S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, presentt and future. **Environmental Reviews**, v.19, p.350-370, 2011.

BOLT, H.M.; GOLKA, K. The debate on carcinogenicity of permanent hair dyes: new insights. **Critical Reviews in Toxicology**, v.37, p.521-536, 2007.

BRÜSCHWEILER, B.J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are no regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.88, p.214-226, 2017.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGUREL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. **Mutation Research**, v.627, p.31-35, 2007.

CARTER, S. B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. **Nature**, v.213, p.261–264, 1967.

CARVALHO, T. U.; Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF., v.2, p.45-58, 1996.

CERNIGLIA, C.E.; ZHUO, Z.; MANNING, B.W.; FEDERLE, T.W.; HEFLICH, R.H. Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black 38 by human intestinal microflora. **Mutation Research**, v.175, p.11–16, 1986.

CESARATTO, L.; VASCOTTO, C.; CALLIGARIS, S.; TELL, G. The importance of redox state in liver damage. **Annals of Hepatology**, v.3, p.86-92, 2004.

CHAUDHRI, S.K.; JAIN, N.K. History of cosmetics. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v.3, p.164-167, 2009.

CHEONG, H.S. J.; SETH, I.; JOINER, M.C.; TUCKER, J.D. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis- block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v.28, p.433-440, 2013.

CHOI, J.H. Dye. In: Encyclopedia of Color Science and Technology. DOI: 10.1007/978-3-642-27851-8_182-1

CHUNG, K. Azo dyes and human health: A review. **Journal of Environmental Science and Health**, v.34, p.233-261, 2016.

COLLIER, S.W.; STORM, J.E.; BRONAUGH, R.L. Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.118, p.73-79, 1993.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.

CORBETT, J.F. Chapter 10 – Synthetic dyes for human hair. In: PETERS, H.S.F.T (Ed.). **Colorants for Non-Textile Applications**. Amsterdam: Elsevier Science, p.456-477, 2000.

COTELLE, S., FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p. 246-255, 1999.

CZENE, K.; TIIKKAJA, S.; HEMMINKI, K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. **International Journal of Cancer**, v.105, p.108–112, 2003.

DEHON, G.; CATOIRE, L.; DUEZ, P.; BOGAERTS, P.; DUBOIS, J. Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.650, p.87-95, 2008.

DRAELOS, Z. D. **Hair Care - An Illustrated Dermatologic**, 1st Ed., Taylor & Francis: London, 2005.

EL-ZEIN, R.A.; FENECH, M.; LOPEZ, M.S.; SPITZ, M.R.; ETZEL, C.J. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiology*, **Biomarkers & Prevention**, v.17, p.1111-1119, 2008.

EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 13, p.34-43, 1989.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v.339, p.37-59, 1995.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v.147, p.29-36, 1985.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v.600, p.58-66, 2006.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.252–259, 2007.

FRANÇA, S.A.; DARIO, M.F.; ESTEVES, V.B.; BABY, A.R.; VELASCO, M.V.R. Types of hair dye and their mechanism of action. **Cosmetics**, v.2, p.110-126, 2015.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LHD, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; CASTELAO, J.E.; YUAN, J.M.; YU, M.C.; ROSS, R.K. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. **International Journal of Cancer**, v.91, p.575–579, 2001.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GIORGETTI, L.; TALOUIZTE, H.; MERZOUKI, M.; CALTAVUTURO, L.; GERI, C.; FRASSINETTI, S. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: a case study. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.74, p.2275-2283, 2011.

GUERRA-TAPIA, A.; GONZALEZ-GUERRA, E. Hair cosmetics: dyes. **ACTAS Dermo-Sifiliográficas**, v.105, p.833-839, 2014.

GUO, H.; BASSIG, B.A.; LAN, Q.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; HOLFORD, T.R.; LEADERER, B.; BOYLE, P.; QIN, Q.; ZHU, C.; LI, N.; ROTHMAN, N.; ZHENG, T. Polymorphisms in DNA repair genes, hair dye use and the risk of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Causes Control**, v.25, p.1261-1270, 2014.

HADKHALE, K.; MACLEOD, J.; DEMERS, P.A.; MARTINSEN, J.I.; WEIDERPASS, E.; KJAERHEIM, K.; LYNGE, E.; SPAREN, P.; TRYGGVADOTTIR, L.; HARRIS, M.A.; TJEPKEMA, M. PETERS, P.A.; PUKKALA, E. Occupational variation in incidence of bladder cancer: a comparison of population-representative cohorts from Nordic countries and Canada. **BMJ Open**, v.7, p.1-10, 2017.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; RICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vitro* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p.45-51, 2003.

HAYFLICK, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v.37, p.614-636, 1965.

HEIKKINEN, S.; PITKÄNIEMI, J.; SARKEALA, T.; MALILA, N.; KOSKENVUO, M. Does hair dye use increase the risk of breast cancer? A population-based case-control study of Finnish women. **PLoS ONE**, v.10, p.1-14, 2015.

HOWES, D.; BLACK, J.G. Percutaneous absorption of 2-nitro-p-phenylenediamine. **International Journal of Cosmetic Science**, v.5, p.215–26, 1983.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Vol.57. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1993.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, Vol.99. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/tintura_cabelo.asp>. Acesso em: 20 dez. 2017.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; DEFÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

JOSEPHY, P.D.; MANNERVIK, B. **Molecular toxicology**. Second edition. New York: Oxford University Press, 2006.

KAZANDJIEVA, J.; GROZDEV, I.; TSANKOV, N. Temporary henna tattoos. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.383-387, 2007.

KELSH, M.A.; ALEXANDER, D.D.; KALMES, R.M.; BUFFLER, P.A. Personal use of hair dyes and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiologic data. **Cancer Causes Control**, v.19(6), p.549–558, 2008.

KIM, K.H.; KABIR, E.; JAHAN, S.A. The use of personal hair dye and its implication for human health. **Environment International**, v.89-90, p.222-227, 2016.

KOGEVINAS, M.; MANNETJT, A.; CORDIER, S.; RANFT, U.; GONZALEZ, C.A.; VINEIS, P.; CHANG-CLAUDE, J.; LYNGE, E.; WAHRENDORF, J.T.; ZONO, A.; JOCKEL, K.H.; SERRA, C.; PORRU, S.; HOURS, M.; GRIESER, E.; BOFFETIA, P. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. **Cancer causes and control**, v.14, p.907-914, 2003.

KORINTH, G.; SCHALLER, K.H.; DREXLER, H. Percutaneous absorption of aromatic amines and the risk assessment resulting from the dermal pathway. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.928-938, 2013.

KOUTROS, D.T.; SILVERMAN, D.B. Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study. **International Journal of Cancer**, v.129, p.2894-2904, 2011.

KRYSTON, T.B.; GEORGIEV, A.B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v.711, p.193-201, 2011.

L'ORÉAL GROUP. **L'Oréal's history: 1909-1956: the first steps, constructing a model**. Disponível em: <<http://www.loreal.com/group/history/1909-1956>>. Acesso em 03 jan. 2018.

LEWIS, D.; MAMA, J.; HAWKES, J. A review of aspects of oxidative hair dye chemistry with special reference to n-nitrosamine formation. **Materials**, v.3, p.517-534, 2013.

LIND, M.L.; BOMAN, A.; SOLLENBERG, J.; JOHNSON, S.; HAGELTHORN, G.; MEDING, B. Occupational dermal exposure to permanent hair dyes among hairdressers. **Annals of Work Exposures and Health**, v.49, p.473-480, 2005.

LIND, M.L.; JOHNSON, S.; LIDÉN, C.; MEDING, B.; BOMAN, A. Hairdresser's skin exposure to hair dyes during different hair dyeing tasks. **Contact Dermatitis**, v.77, p.303-310, 2017.

LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P.; BOENIGER, M.F.; NONY, C.R.; BOWMAN, M.C. Chemical monitoring of urine from workers potentially exposed to benzidine-derived azo dyes. **Toxicology Letters**, v.7, p.29-36, 1980.

LOYSON, P. Chemistry in the time of the pharaohs. **Journal of Chemical Education**, v.88, p.146-150, 2011.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p.6049-6055, 1969.

MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Rocca, 2007, 503 p.

MORRIS, P.J.T.; TRAVIS, A.S. A history of the international dyestuff industry. **American Dyestuff Reporter**, v.81, p.1-49, 1992.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NGUYEN, T.; SALEH, M.A. Detection of azo dyes and aromatic amines in women undergarment. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v.51, p.744-753, 2016.

NOHYNEK, G.J.; FAUTZ, R.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.517-543, 2004.

NOHYNEK, G.J.; SKARE, J.A.; MEULING, W.J.A.; WEHMEYER, K.R.; DEBIE, A.T.H.J.; VAES, W.H.J.; DUFOUR, E.K.; FAUTZ, R.; STEILING, W.; BRAMANTE, M.; TOUTAIN, H. Human systemic exposure to [¹⁴C]-paraphenylenediamine-containing oxidative hair dyes: Absorption, kinetics, metabolism, excretion and safety assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v.81, p.71-80, 2015.

NOVOTNÝ, Č.; DIAS, N.; KAPANEN, A.; MALACHOVÁ, K.; VÁNDROVCOVÁ, M.; ITÄVAARA, M.; LIMA, M. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes, **Chemosphere**, v.63, p.1436-1442, 2006.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.5421-5426, 2000.

OHNISHI, T.; OHNISHI, K.; TAKAHASHI, A.; TANIGUCHI, Y.; SATO, M.; NAKANO, T.; NAGAOKA, S. Detection of DNA damage induced by space radiation in Mir and space shuttle. **Journal of Radiation Research**, v.43, p.133-136, 2002.

OLIVEIRA, R.A.G.; ZANONI, T.B.; BESSEGATO, G.G.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V.B. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. **Química Nova**, v.37, p.1037-1046, 2014.

ORESKOV, K.W.; SØSTED, H.; JOHANSEN, J.D. Glove use among hairdressers: difficulties in the correct use of gloves among hairdressers and the effect of education. **Contact Dermatitis**, v.72, p.362-366, 2015.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p.291-298, 1984.

PARBOOSING, R.; MZOBE, G.; CHONCO, L.; MOODLEY, I. Cell-based assays for assessing toxicity: A basic guide. **Medicinal Chemistry**, v.13, p.13-21, 2017.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G.I.V.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in hemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.490, p.209-214, 2001.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação, Ribeirão Preto – SP. **Sociedade Brasileira de Genética**, 1991, p. 59-75.

RAMPERSAD, S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel)**, v.12, p.12347-12360, 2012.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, v.2014, p1-19, 2014.

SAMPATHKUAR, K.; YESUDAS, S. Hair dye poisoning and the developing world. **Journal of Emergencies, Trauma and Shock**, v.2, p.129-131, 2009.

SCHERER, W.F.; SYVERTON, J.T.; GEY, G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **The Journal of Experimental Medicine**, v.97, p.695-710, 1953.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976, p.31-53.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, p.227-36, 2004.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **Journal of Cell Biology**, v.140, p.1307-1320, 1998.

SUN, J.; JIN, J.; BEGER, R.D.; CERNIGLIA, C.E.; CHEN, H. Evaluation of metabolism of azo dyes and their effects on *Staphylococcus aureus* metabolome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.1471-1481, 2017.

STOCKERT, J.C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v.114, p.785-796, 2012.

THOMPSON, R. H. **Naturally occurring quinones**: Academic Press, New York, 1957.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TOWLE, K.M.; GRESPON, M.E.; MONNOT, A.D. Personal use of hair dyes and risk of leukemia: a systematic literature review and meta-analysis. **Cancer Medicine**, v.6, p.2471-2486, 2017.

TURATI, F.; PELUCCHI, C.; GALEONE, C.; DECARLI, A.; LA-VECCHIA, C. Personal hair dye use and bladder cancer: a meta-analysis. **Annals of Epidemiology**, v.24, p.151–159, 2014.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 21 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.49-56, 2005.

VEDEL-KROGH, S.; NIELSEN, S.F.; SCHNOHR, P.; NORDESTGAARD, B.G. Morbidity and mortality in 7,684 women according to personal hair dye use: the Copenhagen City Heart Study followed for 37 years. *PLoS One*, v.11, p.1-16, 2016.

VELOSO, L.A. Dossiê Técnico (Corantes e Pigmentos). Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (BRT) / Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), 2012.

VITA, A.C.R. **História da maquiagem, cosmética e do penteado: em busca da perfeição**. 1ªEd. São Paulo: Editora Anhembi Morumbi, 2009.

WOLFRAM, L.J. Endeavors in the area of hair care – chemical aspects of hair care processes and products. *Cosmetics*, v. 30, p.1-24, 2016.

YAHAGI, T.; DEGAWA, M.; SEINO, Y.; MATSUSHIMA, T.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T.; HASHIMOTO, Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Letters*, v.1, p.91-96, 1975.

YOURICK, J.J.; BRONAUGH, R.L. Percutaneous penetration and metabolism of 2-nitro-p-phenylenediamine in human and fuzzy rat skin. *Toxicology Applied Pharmacology*, v.166, p.13–23, 2000.

ZHANG, Y.; HOLFORD, T.R.; LEADERER, B.; BOYLE, P.; ZAHM, S.H.; FLYNN, S.; TALLINI, G.; OWENS, P.H.; ZHENG, T. Hair-coloring product use and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study in Connecticut. *American Journal of Epidemiology*, v.159, p.148-154, 2004.