

FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS

FREQUENCY OF MICRONUCLEI AND OTHER NUCLEAR ABNORMALITIES IN DIABETIC PATIENTS

Marcelo Torquato Toneline¹, Júlio Boschini Filho³, Débora Aparecida Rodrigueiro³, Neil Ferreira Novo³

RESUMO

Objetivos: o *Diabetes mellitus* está associado ao desenvolvimento de complicações somatológicas consequentes ao dano oxidativo ao DNA. No estudo atual, avaliou-se a formação de biomarcadores de genotoxicidade como micronucleação, brotamento nuclear e ponte nuclear entre outras anormalidades nucleares em pacientes com diabetes tipo 2. **Métodos:** quarenta e cinco indivíduos foram incluídos no estudo, divididos em dois grupos: os controles normoglicêmicos e os portadores de diabetes tipo 2. As células epiteliais da mucosa bucal foram coletadas, processadas e analisadas conforme o Protocolo de Thomas *et al.* e critérios de Bolognesi *et al.* A frequência de micronucleação e das alterações nucleares observadas na análise de 2.000 células por indivíduo em microscopia óptica de luz foram registradas. Correlacionaram-se estes achados com idade, sexo, comorbidades, hábitos e consumo de medicamentos. A análise estatística foi realizada usando-se o teste de Mann-Whitney e do Qui-quadrado. **Resultados:** as células dos pacientes diabéticos apresentaram um aumento da frequência de micronúcleos (em média 4,7 por 2.000 células contra 2,0 do grupo controle, com $p < 0,001$) e brotamento nuclear (em média 6,3 por 2.000 células contra 4,1 do grupo controle, $p < 0,05$), indicativos de aumento da genotoxicidade, provavelmente devido ao estresse oxidativo e às complicações vasculares do diabetes. **Conclusão:** a elevação da glicemia parece estar envolvida com o dano oxidativo ao DNA dos pacientes diabéticos que se manifesta com aumento da micronucleação e brotamento nuclear. Atualmente essas alterações, juntamente com as pontes nucleares, estão sendo consideradas biomarcadores na avaliação da genotoxicidade em pacientes diabéticos.

Descritores: micronúcleo; brotamento nuclear; diabetes; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Purpose: *Diabetes mellitus* is associated with development of vascular complications consequent to oxidative DNA damage. In the current study, we evaluated the formation of biomarkers of genotoxicity as micronucleation, budding nuclear, nuclear bridge, and other nuclear abnormalities in patients with type 2 diabetes. **Methods:** forty-five subjects were divided into two groups of normoglycemic controls and hyperglycemic (type 2 diabetes), were banded about in the study. Epithelial cells of the oral mucosa were collected according to the international protocol of Thomas *et al.* and Bolognesi *et al.* All nuclear changes found were recorded, totaling analysis of 2,000 cells. This finding was correlated with age, sex, comorbidities, and drug consumption habits. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test and chi-square test. **Results:** cells from diabetic patients showed an increased frequency of micronuclei (on average 4.7 per 2,000 cells compared with 2.0 in the control group, $p < 0.001$) and nuclear budding (average

6.3 per 2,000 cells against 4.1 control group, $p < 0.05$) when compared to the control group, indicating a higher DNA damage due to oxidative stress and possibly related vascular complications of diabetes. **Conclusion:** the high level of glucose in the blood appears to be involved with oxidative damage in the DNA of diabetic patients, manifested as an increase in micronuclei and nuclear budding. These nuclear changes have the potential to be used as biomarkers of cell damage in diabetic patients.

Key-words: micronuclei; nuclear budding; diabetes; stress oxidative.

INTRODUÇÃO

O Projeto Micronúcleo Humano (HUMN Project) é um projeto internacional colaborativo organizado em 1997, com a finalidade de padronizar a metodologia de estudo da frequência de micronúcleos em diferentes tipos celulares de populações humanas. Os procedimentos preconizados por esse projeto em pesquisas que utilizam o teste citogenético do micronúcleo nos diferentes laboratórios do mundo visam a formação de um banco de dados com a finalidade de disponibilizar informações das pesquisas realizadas em serviços credenciados.¹

A mutação é um processo inerente ao desenvolvimento dos seres vivos e necessário para a diversidade e evolução das espécies. Alguns tipos desfavoráveis de mutações podem escapar do sistema de reparação do DNA, acumulando-se nas células com consequências carcinogênicas. Segundo Holland *et al.*¹ e Bolognesi *et al.*,² as alterações celulares representadas na figura 1 são indicativas de ações genotóxicas, citotóxicas e de morte celular nos diferentes tecidos.

O dano genômico é provavelmente a mais importante e fundamental causa do desenvolvimento de doenças degenerativas e neoplásicas. Além das ações de agentes genotóxicos já conhecidos, é também estabelecido que alterações genômicas sejam produzidas por deficiência micronutricional, estilo de vida, estresse oxidativo, exposição ocupacional e pré-disposições genéticas.³

O micronúcleo (MN) é uma pequena massa cromatídica nuclear delimitada por envoltório e separada do núcleo principal (Figura 2A), formado durante a telófase da mitose ou da meiose, quando o envoltório nuclear é reconstruído ao redor dos cromossomos (Figura 2B). Eles aparecem nas células-

Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v. 16, n. 2, p. 80 - 85, 2014

1. Acadêmico do curso de Medicina - FCMS/PUC-SP

2. Professor (a) do Depto. de Morfologia e Patologia - FCMS/PUC-SP

Recebido em 14/2/2014. Aceito para publicação em 21/5/2014.

Contato: jboschini@puccsp.br

filhas em decorrência de danos genéticos e/ou citotóxicos induzidos nas células parentais. Portanto, os fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros não incorporados ao núcleo principal

das células-filhas durante a divisão celular são indicativos da ocorrência de danos cromossômicos.²

Figura 1. Representação esquemática dos vários tipos de células bucais e mecanismos de origem (Modificado de Bolognesi *et al.*)²

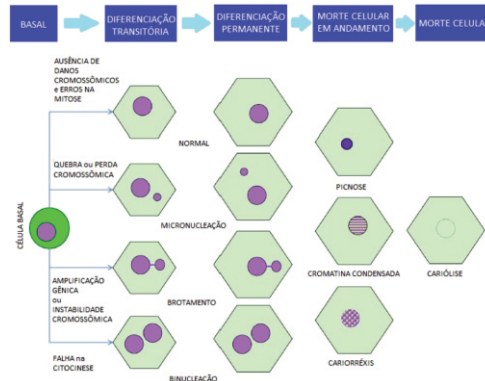
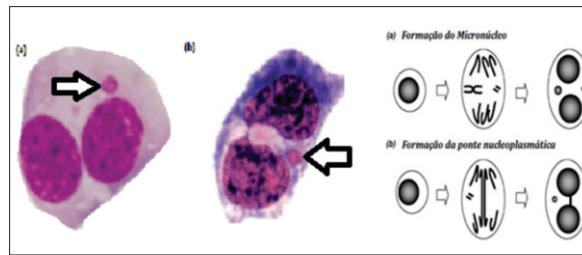


Figura 2A. Fotomicrografia de células binucleadas: (a) micronucleada (seta) e (b) micronucleada (seta) com ponte nucleoplasmática. 2B. (a) micronúcleos e (b) ponte nucleoplasmática e micronúcleo (modificado de Fenech *et al.*)⁴



O teste do micronúcleo é atualmente utilizado como um método citogenético de diagnóstico importante e simples para a avaliação da genotoxicidade com aplicação nas áreas de: ecotoxicologia, nutrição, oncologia, epidemiologia, farmacologia e agroquímica bem como no biomonitoramento de populações humanas.⁵⁻⁷

A determinação da taxa de micronucleação em células esfoliadas da mucosa bucal é um método minimamente invasivo usado no biomonitoramento de danos genéticos em humanos expostos às substâncias genotóxicas no local de trabalho, hábitos de vida, na dieta e no tratamento de diferentes doenças. As células da mucosa bucal são importantes fontes de informações citogenéticas, pois constituem a primeira barreira na rota de inalação ou ingestão, e são capazes de metabolizar espécies reativas de oxigênio (EROs).^{1-3,8}

O epitélio da mucosa bucal é composto por quatro camadas, sendo a basal ou germinativa a camada principal onde há células-tronco e ocorre renovação celular.¹ As novas células produzidas nessa camada ascendem dentro de sete a dez dias às camadas superiores e, ao serem coletadas, podem ser indicativas de danos genéticos ocorridos durante o processo de renovação celular. Portanto, a presença de MN nas células esfoliadas reflete eventos genotóxicos e/ou citotóxicos que ocorreram na camada basal durante a renovação celular.⁹

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma das doenças metabólicas mais comuns, afetando atualmente cerca de 3% da população mundial,³ e caracterizada por uma desordem metabólica com implicações angiopáticas periféricas comprometendo órgãos como o coração, os rins e o sistema nervoso, relacionadas ao processo vascular aterosclerótico.

Pesquisas recentes têm demonstrado que essas complicações fisiopatológicas estão relacionadas com o estresse oxidativo provocado pelo excesso de EROs formadas desproporcionalmente entre os diabéticos.¹⁰ Segundo Léan *et al.*¹¹ e Kennel *et al.*,¹² a diminuição da atividade das enzimas catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase, reduz as ações do sistema de defesa antioxidante com alterações biomoleculares importantes, principalmente do sistema de reparação do DNA, favorecendo, assim, a carcinogênese.^{1,3}

Além das implicações oxidativas, o DM é uma situação metabólica caracterizada pela elevada cetoadicose, favorecendo produção de aminoacetonas (AA),¹³ que na presença de amino oxidases sensíveis à semicarbazidas (SSAO), promovem elevação da concentração de metilglioxal (MG) com consequências para os processos de resistência à insulina, estresse oxidativo e citotoxicidade.¹⁴

O sistema enzimático das glioxalases é a principal rota utilizada na desintoxicação pelo excesso de MG.¹⁴ Segundo Thornalley,¹⁵ as enzimas glioxalase I e glioxalase II são capazes de transformar MG em metabólitos envolvidos na produção de ATP, demonstrando que o sistema glioxalases se encontra alterado nos pacientes portadores do DM, dificultando a metabolização do excesso de metilglioxal, com consequente aumento da resistência à insulina, estresse oxidativo, citotoxicidade e defeitos no sistema de reparação do DNA.

Pesquisas recentes sobre taxa de micronucleação em pacientes portadores do DM têm relacionado o aumento da frequência de MN com o nível elevado de estresse oxidativo, com consequências para o sistema de reparação do DNA.^{1,3,8,15}

Nesta investigação, através de um estudo prospectivo e aleatório, procuramos avaliar a frequência da formação de biomarcadores de genotoxicidade, como micronucleação, brotamento nuclear e ponte nuclear, entre outras anormalidades nucleares em pacientes com diabetes tipo 2 usuários da Unidade Básica de Saúde (UBS) do Bairro de Aparecidinha do Município de Sorocaba, segundo os princípios estabelecidos por Holland *et al.*,¹ Thomas *et al.*¹⁷ e Bolognesi *et al.*²

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo e mediante consentimento livre e esclarecido dos participantes voluntários divididos em dois grupos de acordo com os valores da glicemia de jejum:

- Pacientes portadores de DM tipo 2 e
- Grupo controle: indivíduos não diabéticos.

Após aplicação do questionário sociodemográfico e econômico, 45 indivíduos voluntários residentes no Bairro de Aparecidinha (Sorocaba/SP) cadastrados no Programa Saúde da Família da respectiva Unidade de Saúde. Desses, 22 eram portadores de DM tipo 2 e 23 compunham o grupo controle.

A obtenção das amostras celulares foi realizada conforme Protocolo de Thomas *et al.*¹⁷ e a coleta das células da mucosa bucal foi realizada com uso de escovas do tipo "cytobrush" e solução tampão de Sacommano para preservação celular. Os tubos foram acondicionados para o transporte a 4°C e as amostras coletadas foram processadas no mesmo dia com um intervalo de, aproximadamente, três horas entre a coleta e o processamento.

No laboratório as amostras foram submetidas à centrifugação seguida de fixação em metanol/ácido acético 3:1. Após, com auxílio de um pipetador, 150 µL do sedimento foram gotejados na superfície de uma lâmina de microscopia previamente preparada. A seguir procedeu-se a hidrólise com ácido clorídrico 5 N, coloração com reagente de Schiff e contracoloração com Fast Green 5% (Feulgen-Fast Green).

A análise dos resultados foi realizada em duas etapas com auxílio de um microscópio óptico de luz Nikon E100 em objetiva de imersão, conforme os critérios de Thomas *et al.*¹⁷ e Bolognesi *et al.*²

- 1ª etapa: determinação do potencial proliferativo através da frequência de células basal e diferenciada (indicadoras de proliferação) e com cromatina condensada, cariorréxis, picnótica e cariólise (indicadoras de morte celular), em um total de 2.000 células por indivíduo.

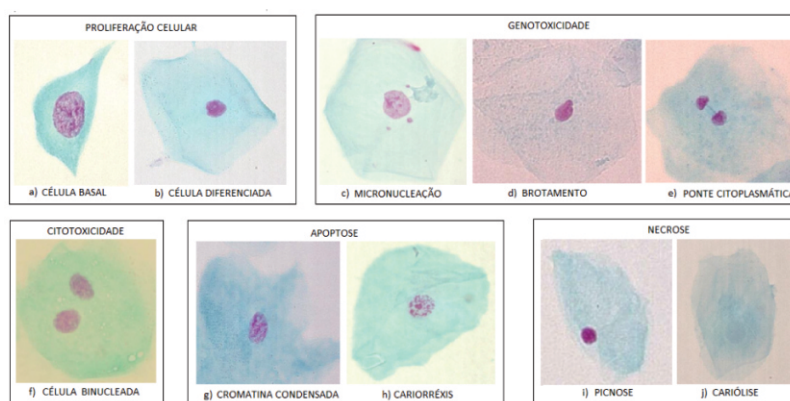
- 2ª etapa: determinação do potencial de genotoxicidade e/ou citotoxicidade através da frequência de células: micronucleada, com broto nuclear e com ponte nucleoplasmática (indicadoras de genotoxicidade) e binucleada (indicadoras de citotoxicidade).

Os vários tipos celulares e alterações nucleares observados (Figura 3) foram determinados seguindo o padrão morfológico estabelecido por Bolognesi *et al.*² a seguir descritos.

Para a análise estatística dos resultados foram aplicados os seguintes testes:

- Teste do Qui-quadrado¹⁸ para comparar os grupos controle e estudo quanto ao gênero, tabagismo, etilismo e prática de exercício físico.
- Teste de Mann-Whitney¹⁸ para comparar os grupos controle e estudo em relação à idade e marcadores da proliferação celular, genotoxicidade citotoxicidade e da morte celular. O nível de significância foi fixado em 0,05 ou 5%.

Figura 3. Fotomicrografias de células basal e diferenciada coradas com Feulgen - Fast Green sob ampliação de 1.000 x ao microscópio óptico comum (Modificado de Bolognesi *et al.*²). As alterações celulares foram agrupadas em acordo com o tipo de alteração e descrição do texto.



- Célula basal: originada da camada basal do epitélio da mucosa, apresenta núcleo com coloração uniforme e maior quando comparado ao das células diferenciadas. A proporção núcleo/citoplasma é maior. Sua frequência pode estar relacionada à velocidade de proliferação celular no tecido observado (Fig. 3a).
- Célula diferenciada: apresenta coloração nuclear uniforme e morfologia oval ou arredondada, com proporção núcleo/citoplasma menor em relação à basal. Pode ser indicativo de homeostase tecidual quando a frequência equivale à das células basais (Fig. 3b).
- Célula micronucleada: caracterizada pela presença do núcleo principal e outro de tamanho inferior denominado micronúcleo. Este se apresenta com morfologia oval ou redonda, diâmetro aproximadamente de 1/3 a 1/16 do núcleo principal; indicativo de fragmentação cromossômica por genotoxicidade (Fig. 3c).
- Célula com brotamento nuclear: caracterizada pela presença de uma pequena saliência de cromatina do núcleo principal, processo esse denominado de brotamento nuclear. O mecanismo responsável pelo brotamento nuclear parece estar relacionado à amplificação do DNA ou ao complexo de reparação por extrusão do DNA amplificado (Fig. 3d).

- e) Célula com ponte nucleoplasmática: apresenta o núcleo principal e o acessório próximo ligado por fino filamento de cromatina. O núcleo acessório apresenta mesmas características morfológicas e de coloração que o núcleo principal. No entanto, ele apresenta um diâmetro inferior a ¼ do núcleo. Acredita-se que esse tipo morfológico seja originado pela presença de cromossomos dicêntricos com comportamento anafásico anormal durante a segregação (Fig. 3e).
- f) Célula binucleada: caracterizada pela presença de dois núcleos com características similares ao das células diferenciadas. A ocorrência de binucleação é indicativa de falha devido ação citotóxica no processo da citocinese durante a reprodução celular (Fig. 3f).
- g) Célula com cromatina condensada: apresenta regiões do núcleo com agregados condensados de cromatina exibindo um padrão morfológico nuclear heterogêneo. Nessas células a cromatina apresenta variações do grau de condensação relacionadas ao processo de morte celular por apoptose (Fig.3g).
- h) Célula em cariorréxis: caracterizada pela maior extensividade da agregação cromatídica proporcionando fragmentação e desintegração nuclear no estágio avançado da morte celular por apoptose (Fig. 3h).
- i) Célula picnótica: caracterizada por um núcleo pequeno com cromatina condensada e intensa coloração. O diâmetro nuclear é de 1/3 a 2/3 inferior ao da célula diferenciada e são relacionadas a um estágio avançado da morte celular por necrose (Fig. 3i).
- j) Célula em cariólise: apresenta cromatina fracamente corada ao método de Feulgen, dificultando a visualização do núcleo à microscopia de luz. Relacionada ao estágio mais avançado do processo de morte celular por necrose (Fig. 3j).

RESULTADOS

A maioria dos participantes era do sexo feminino (66%), com idade média de 60 anos, grau de escolaridade com ensino fundamental incompleto e trabalhava como dona de casa ou era aposentada. Cerca de metade dos entrevistados afirmou realizar exercícios físicos, principalmente caminhada, com frequência de três vezes por semana com duração média de 40 minutos. A maioria (66%) negou ser tabagista e/ou etilista.

A maior parte dos entrevistados com DM (77,3%) se apresentava com hipertensão arterial sistêmica e 13% declarou ter problemas cardíacos. Enquanto isso, no grupo controle, cerca de 30% dos indivíduos se mostrou hipertenso.

Em relação à análise citológica dos marcadores da

genotoxicidade e da morte celular (Tabela 1 e Gráfico 1), o grupo de 22 pacientes portadores de DM demonstrou um aumento significativo na taxa de micronucleação e brotamento nuclear quando comparado ao grupo de 23 indivíduos controle (4,7 vs 2,0 com $p < 0,001$ e 6,3 vs 4,1 com $p < 0,05$, respectivamente). As demais variáveis quanto aos marcadores de morte celular [cromatina condensada ($p = 0,1701$), cariorréxis ($p = 0,1481$), picnose ($p = 0,1234$) e cariólise ($p = 0,1101$)], marcadores de proliferação celular [célula basal ($p = 0,4014$) e células diferenciadas ($p = 0,1759$)] e marcadores de citotoxicidade [células binucleadas ($p = 0,1569$)] analisadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

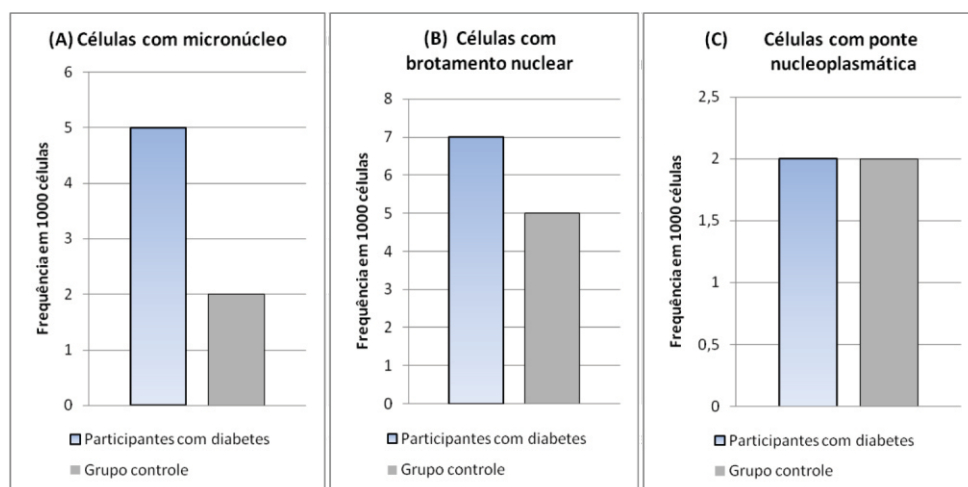
Tabela 1. Marcadores de genotoxicidade na análise de 22 pacientes portadores de DM e 23 indivíduos do grupo controle

	Micronúcleo		Brotamento nuclear		Ponte nucleoplasmática	
	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle
	5	1	5	8	3	3
	4	1	6	5	2	1
	3	1	9	8	2	1
	4	1	11	6	4	0
	4	1	15	5	1	0
	5	4	16	7	3	3
	5	0	7	3	1	1
	4	1	12	5	2	0
	5	2	6	2	1	2
	4	2	12	5	1	2
	4	2	11	6	1	1
	5	1	9	5	1	0
	5	2	1	7	1	3
	2	3	4	8	1	1
	6	3	4	6	7	2
	6	3	0	3	3	3
	6	3	4	4	1	1
	5	2	1	7	3	1
	6	3	7	1	4	9
	6	3	8	4	5	5
	6	3	5	2	6	3
	5	2	8	5	6	5
		3		7		2
Mediana	5	2	7	5	2	2
Média	4,7	2	6,3	4,1	2,1	2

Teste de Mann-Whitney
(Diabético x Controle)

Micronúcleos	Brotamento	Ponte nucleoplasmática
Z(calculado) = 5,29 ($p < 0,0001$) Diab > Cont	Z(cal.) = 1,77 ($p = 0,038$) Diab > Cont	Z(cal.) = 1,14 ($p = 0,1268$) NS

Gráfico 1. Marcadores de genotoxicidade encontrados na análise de 22 pacientes portadores de DM e 23 indivíduos do grupo controle. Frequência em 1.000 células da mucosa bucal dos participantes - (A) células micronucleadas com morfologia nuclear normal. (B) células com brotamento nuclear. (C) Frequência de células com ponte nucleoplasmática.



Obs.: figuras e gráfico em cores disponíveis na versão *on line* desta revista (<http://revistas.pucsp.br/rfcm>).

DISCUSSÃO

Na presente pesquisa utilizamos o teste do micronúcleo em células da mucosa bucal com o objetivo de analisar a frequência de células basais e diferenciadas (marcadores de proliferação celular), micronucleadas e outras alterações nucleares (marcadores de genotoxicidade e citotoxicidade) em indivíduos portadores de DM comparados a de um grupo controle. Além disso, investigamos a provável influência das consequências dessa doença, principalmente o estresse oxidativo provocado pelas ações da formação excessiva de EROs na ocorrência de alterações clastogênicas e aneugênicas, nessas células da mucosa bucal. É descrito na literatura uma associação entre o processo de envelhecimento,¹⁹ trabalho, condições de saúde, diferentes estilos de vida e alterações na frequência de marcadores de dano ao DNA.^{8,20,21}

O MN, um marcador citogenético indicativo de perda e/ou quebra cromossômica, apresenta uma maior prevalência em linfócitos periféricos e fibroblastos de indivíduos com idade avançada e em portadores de DM.²²

Nossos resultados são indicativos de que a idade avançada (idade média em nosso estudo foi de 66 anos) associada à presença de DM podem estar relacionados ao aumento na taxa de micronucleação e de brotamento nuclear quando comparado a do grupo controle, como demonstrado por alguns autores.^{15,22} Esse aumento pode estar relacionado ao elevado nível de estresse oxidativo como consequência de um acúmulo de EROs, ocasionando maior grau de genotoxicidade.^{3,22} A não incorporação do fragmento cromossômico leva à exteriorização nuclear do mesmo e, dependendo do momento da análise, crê-se que o brotamento nuclear seja um estágio precoce ou inicial do processo de micronucleação.²³

As complicações fisiopatológicas do DM estão relacionadas ao estresse oxidativo provocado pelo excesso de EROs formadas desproporcionalmente em diabéticos.²⁴ Ademais, Léan *et al.*¹¹ defendem que há redução da atividade das enzimas catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase, reduzindo as ações do sistema de defesa antioxidante, principalmente de reparação do DNA pelo sistema de glicoxalases,¹³ favorecendo o acúmulo de EROs e suas eventuais consequências, elevando o risco também de carcinogênese.^{3,15,25}

Outro mecanismo responsável pela produção elevada de EROs foi sugerida por Kalapos.¹³ O autor defende que a cetoacidose diabética favorece a produção de aminoacetona, a qual, numa reação de oxidação, acaba por produzir ferritina e acumular Fe^{2+} . O ferro, por meio da reação de Fenton, está diretamente relacionado à produção de EROs e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo e lesões ao DNA, podendo levar à perda ou quebra cromossômica. Isso pode explicar o fato da frequência elevada de micronucleação e brotamento nuclear em indivíduos portadores de DM.

Estudos com células humanas indicaram que a deficiência de folato e vitamina B_{12} e elevados níveis de homocisteína estão associados com a expressão excessiva de uracil, hipometilação do DNA e micronucleação.^{2,22,26}

Infrarregulação da insulina, devido níveis elevados da enzima reparadora do DNA XPD, aumento da extensão dos danos ao DNA²⁷ ou uso de drogas antidiabéticas, como metformina, que pode reduzir os níveis de vitamina B_{12} e elevar de homocisteína, provavelmente por inibir sua absorção,²⁸ podem corroborar no aumento da micronucleação. Aumento da genotoxicidade e sem aumento proporcional de morte celular são indicativos de danos ao sistema de reparo do DNA.^{16,29}

CONCLUSÃO

A investigação da micronucleação e de outras alterações nucleares em células da mucosa bucal foi efetiva na identificação de importantes alterações no DNA, na observação das taxas de proliferação e dos marcadores de genotoxicidade e ou citotoxicidade. Isto reflete o envelhecimento celular no grupo controle e as alterações genotóxicas e citotóxicas encontradas nos portadores de DM. Os resultados encontrados nesta pesquisa indicam que DM resulta em elevadas taxas de micronucleação e brotamento nuclear, podendo estar relacionados à elevada taxa de estresse oxidativo nesses indivíduos e, por conseguinte, danos genômicos. Considerando que os parâmetros de morte celular não apresentaram resultados estatisticamente diferentes e a genotoxicidade através da frequência de micronucleação e brotamento nuclear se mostrou aumentada no grupo DM,

podemos sugerir que a eficiência do sistema de reparação do DNA no grupo DM está prejudicada.

REFERÊNCIAS

- 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;659:93-108.
- Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 2013;753(2):100-13.
- Blasiak J, Arabski M, Hrupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, et al. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res.* 2004;554:297-304.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protocols.* 2007;2:1084-104.
- Fenech M, Ferguson LR. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat Res.* 2001;475(1):1-6.
- Scott D, Burrill W, Barber JBP, Roberts SA, Bulman B. Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with the lymphocyte micronucleus assay. *Int J Radiat Biol.* 2000;76(12):1617-9.
- Fenech M, Holland N, Chang W P, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999;428:271-83.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay involves into cytome assay of chromosome instability, mitotic dysfunction and cells death. *Mutat Res.* 2006;600:58-66.
- Martinez-Pérez LM, Cerda-Flores RM, Gallegos-Cabriales EC, Dávila-Rodríguez MI, Ibarra-Costilla E, Cortés-Gutiérrez EI. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep.* 2007;108(3):248-55.
- Marintim AC, Sanders RA, Watkins JB III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *JBiochem Mol Toxicol.* 2003;17(1):24-38.
- Léan ME, Noroozi M, Kelly I, Berns J, Talwar D, Sattar N, et al. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes.* 1999;48:176-81.
- Kennel WB, Mcgee DI. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular diseases. The Farmington study. *Diabetes Care.* 1979;2:120-6.
- Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett.* 1999;110(3):145-75.
- Dutra F, Bechara EJH. Bioquímica e ação citotóxica de alfa-aminocetonas endógenas. *Quim Nova.* 2005;28(3):483-91.
- Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J.* 1990;269:1-11.
- Çelik A, Diler BB, Eke D. Assessment of genetic damage epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA Cell Biol.* 2010;29(6):277-84.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protocols.* 2009;4(6):825-37.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res.* 2008;638:37-47.
- Siegel S, Castellan Jr. NJ. *Estatística não paramétrica para ciências do comportamento.* 2ª ed. Porto Alegre: ArtMed; 2006.
- Friedrich JR, Pra D, Maluf SW, Bittar CM, Mergener M, Pollo T, et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Mutat Res.* 2008;649:213-20.
- Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.* 2009;671(1-2):76-83.
- Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Muñoz-Magallanes T, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res.* 2007;634:126-34.
- Salazar AM, Sordo M, Ostrosky-Wegman P. Relationship between micronuclei formation and p53 induction. *Mutat Res.* 2009;67(2):124-8.
- Froguel P, Velho G. Genetic determinants of type 2 diabetes. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:91-105.
- Whiteman M, Hong HS, Jenner A, Halliwell B. Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with reactive oxygen species: implications for assessment of oxidative damage in vivo. *Biochem Biophys Res Comm.* 2002;294:883-9.
- Fenech M. Micronutrients frequency and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RAs). *Food Chem Toxicol.* 2002;40:1113-7.
- Merkel P, Khoury N, Bertolotto C, Perfetti R. Insulin and glucose regulate the expression of the DNA repair enzyme XPD. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;20:175-85.
- Fenech M. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. *Mutat Res.* 1999;428:299-304.
- Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res.* 2002;1(3):246-60.