

## Frequência de micronucleação e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de pacientes anêmicos

*Frequency of micronucleation and others nuclear changes in cells of anemic patient's oral mucosa*

Bianca Caroline Alvim Tomaz<sup>1</sup>, Raissa Negrelli da Silva Ferri<sup>1</sup>, Júlio Boschini Filho<sup>1</sup>

### RESUMO

**Introdução:** O Teste Citogenético do Micronúcleo é um biomarcador que fornece informações para avaliar lesões cromossômicas oriundas de ações genotóxicas. A frequência de micronúcleos pode ser mensurada em situações de exposição a ambiente e substâncias com alto poder genotóxico. Muitas anemias apresentam sua gênese na deficiência nutricional e têm como consequência o aumento das lesões no DNA, assim como estresse oxidativo elevado. Ácido fólico e vitamina B12 determinam maior instabilidade cromossômica, seja pela carência de cofatores ou por lesões oxidativas no material genético, com implicações para o sistema de reparo do DNA. **Objetivos:** Considerando a correlação entre as anemias e os danos ao material genético, objetivou-se no presente estudo avaliar a frequência de micronucleação e de outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de adultos anêmicos. **Métodos:** estudo conduzido com 60 indivíduos, dos quais 30 eram anêmicos e 30 compunham o grupo controle. As amostras foram colhidas e processadas conforme protocolo preestabelecido, e as lâminas confeccionadas foram avaliadas microscopicamente para os critérios de proliferação, de genotoxicidade, de citotoxicidade e de morte celular. Para análise estatística, os testes *t* de Student, de Levene, de correlação de Pearson, e teste de Shapiro-Wilk foram utilizados para a correlação das variáveis. **Resultados:** A frequência de micronucleação e de outras alterações nucleares foram maiores em anêmicos, enquanto o grupo controle apresentou maior capacidade proliferativa. Além disso, os hábitos de vida também influenciaram nos critérios celulares avaliados. **Conclusões:** A elevada frequência de micronúcleos em anêmicos foi atribuída ao estresse oxidativo, ao déficit nutricional ou a outras condições predisponentes, como a etiologia genética da anemia ou a presença de doença crônica. **Palavras-chave:** anemia; genotoxicidade; testes para micronúcleos.

### ABSTRACT

**Introduction:** The Micronucleus Cytogenetic Test is a biomarker that provides information to assess chromosomal damage which arises from genotoxic actions. The micronucleus frequency can be measured at situations of substances and environmental exposure with high genotoxic power. Many anemias have their genesis in nutritional deficiencies and have the consequence of an increment in DNA lesions, altogether with high oxidative stress. Folic acid and B12 vitamin determines more chromosomal instability, such cofactors deficiency or oxidative lesions in genetic material, with implications in DNA repair system. **Objectives:** Considering the correlation of the anemias and damage to genetic material, the present study aims to evaluate the micronucleation rate and other nuclei alterations in oral mucosal cells of anemic adults. **Methods:** This study was conducted with 60 patients, 30 of them were anemic and 30 were in the control group. The samples were collected and processed according to a pre-established protocol and thereafter slides were microscopically evaluated for proliferation, genotoxicity, cytotoxicity and cell death criteria. For statistical analysis, Shapiro-Wilk test, Student's *t*-test, Levene test and Pearson correlation test were used to compare the variables. **Results:** The micronucleation rate and the others alterations were higher in anemic, while the control group showed a higher cellular proliferative capacity. Also, way of life influenced the cellular criteria assessed. **Conclusions:** The high frequency of micronuclei in anemia was attributed to oxidative stress, with malnutrition or other predisposing conditions such as genetic etiology of anemia or the presence of chronic disease. **Keywords:** anemia; genotoxicity; micronucleus tests.

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP), Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde – Sorocaba (SP), Brasil. Contato: biancaalvim3@gmail.com

Recebido em 25/02/2016. Aceito para publicação em 17/08/2016.

## INTRODUÇÃO

As anemias surgem no processo saúde-doença como uma patologia sistêmica de origem multifatorial, definida como um desequilíbrio homeostático na concentração sanguínea de hemoglobina.<sup>1</sup> Em termos patológicos, a capacidade de ligação do oxigênio aos eritrócitos está diminuída e, portanto, há um decréscimo do aporte de oxigênio aos tecidos. Esse fato contribui para o retardo do processo de reparo tecidual, pois amplifica a resposta inflamatória e aumenta os níveis de radicais livres.<sup>2</sup>

Por definição, as ditas “anemias carenciais” configuram um estado patológico decorrente da deficiência relativa ou absoluta de um ou mais nutrientes essenciais para a síntese ou maturação dos eritrócitos.<sup>3</sup> Em relação às deficiências nutricionais que permeiam a gênese das anemias, observa-se que muitos micronutrientes são essenciais para a estabilidade do genoma, na interação dieta-doença. Atualmente, o termo “Nutrigenômica” é utilizado para designar a ciência que estuda a influência dos nutrientes na expressão genética e a atuação dos genes na regulação dos processos biológicos.<sup>4</sup> Nesse contexto, alimentos ricos em ferro, vitamina B12, ácido fólico, entre outros, auxiliam na integridade do material genético humano por desempenhar suas ações em níveis moleculares.

O ferro atua na biossíntese de hemoglobina para o transporte sanguíneo de oxigênio, sendo tal processo respaldado por um conjunto de enzimas que podem desempenhar ações antioxidantes.<sup>5</sup> A vitamina B12 é essencial em diversas reações bioquímicas do organismo que implicam na dinâmica de redistribuição de elementos como o hidrogênio e carbono.<sup>6</sup> Já o ácido fólico tem um papel importante na prevenção da incorporação de uracil ao DNA e na sua metilação, atuando na estabilidade genômica juntamente com outros micronutrientes.<sup>7,8</sup> Portanto, a deficiência nutricional pode causar instabilidade cromossômica e participar da gênese do câncer, por se correlacionar com alterações genotóxicas.

Nesse sentido, algumas alternativas vêm sendo empregadas para a detecção precoce dos danos ao material genético. Para tanto, destaca-se o Teste para Micronúcleo para quebras ou perdas cromossômicas e disfunções do fuso mitótico causadas por ações genotóxicas. Os pequenos corpos nucleares foram identificados, no final dos anos 1800, por Howell e Jolly nos reticulócitos humanos.<sup>9</sup> Somente em 1970, o termo Micronúcleo (MN) foi usado pela primeira vez – por Boller, Schmidt e Heddleque, que demonstraram que o Teste era um método simples de detecção de danos ao material genético.<sup>10</sup>

Os MN originam-se de fragmentos de cromátides ou de cromossomos inteiros, os quais não segregam durante a anáfase da mitose e tornam-se encapsulados por envoltório nuclear durante a telófase. Derivam da ruptura cromossômica causada por lesões ao DNA não reparadas ou mal reparadas, ou, ainda, da segregação incorreta na anáfase.<sup>5</sup>

Além dos MN, outras alterações nucleares envolvem as evidências de dano ao genoma das células analisadas. As primeiras alterações genômicas implicam na organização nuclear e se manifestam como alterações em seu tamanho, em

sua densidade e na distribuição de sua cromatina.<sup>10</sup> Em relação aos aspectos observados, essas alterações envolvem a ponte núcleo-plasmática, o broto nuclear, a binucleação, a cariólise, a cariorrexe, a picnose e a cromatina condensada.<sup>11</sup>

A avaliação da micronucleação pode ser feita por meio de duas técnicas: a primeira pela contagem de MN em linfócitos do sangue periférico; a segunda, pela contagem de MN em células lábeis, como as epiteliais da mucosa bucal, ou nasal. Esta última vem sendo mais utilizada por sua facilidade de coleta: rápida, prática, não invasiva e indolor, além de fornecer bons resultados estatísticos.<sup>12</sup> As células lábeis epiteliais superficiais, pelo seu potencial de divisão, refletem as alterações genéticas ocorridas nas células da camada basal, durante o processo de renovação tecidual.<sup>13</sup>

Dessa forma, o Teste do Micronúcleo tem como característica o monitoramento da população frente aos agentes genotóxicos e/ou citotóxicos e ao desenvolvimento de enfermidades neoplásicas.<sup>14</sup> Tendo em vista a correlação das anemias aos danos e regeneração do DNA, vislumbramos na correlação a oportunidade de pesquisa que objetivou analisar os efeitos genotóxicos e citotóxicos das anemias em pacientes atendidos em hospital de referência na cidade de Sorocaba (SP), por meio da avaliação da frequência de micronucleação e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal.

## MÉTODOS

Características do estudo: Trata-se de um estudo transversal, analítico, não probabilístico, controlado, com pacientes sem o diagnóstico de anemias.

Casuística: Compuseram a casuística um total de 60 voluntários alocados em 2 grupos de estudo: o Grupo de Anêmicos (GA), composto por 30 indivíduos adultos, na faixa etária entre 18 e 75 anos de idade, portadores de anemia; e o Grupo Controle (GC), composto por 30 adultos, na faixa etária entre 18 e 75 anos, livres de alterações hematológicas ou outras doenças de base que cursam com a anemia. O GA foi distribuído em 3 subgrupos quanto à gênese de sua patologia: portadores de Anemia Carencial (ferropriva e megaloblástica), Anemias Hemolíticas Hereditárias Adquiridas (falciforme, talassemia, esferocitose, fármaco induzida), e Anemia Secundária a Neoplasias Hematológicas.

Coleta do Material: A coleta foi realizada no ambulatório do Serviço de Hematologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba (CHS), no período compreendido entre agosto de 2013 e julho de 2014. Os critérios de coleta e processamento das amostras foram fundamentados no Protocolo de Thomas.<sup>13</sup> Após a assepsia bucal, as células da mucosa oral foram removidas com auxílio de escovas *cytobrush*. As amostras eram mergulhadas em solução de *Sarcomano* e acondicionadas a 4°C. O período entre a coleta e o processamento das células variou entre 3 e 48 horas. Paralelamente, todos os voluntários responderam a um questionário padronizado para a obtenção de dados sociodemográficos.

Processamento do material coletado: As amostras foram processadas no laboratório de Citogenética da Faculdade de

Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (FCMS/PUC-SP), nas seguintes etapas:

1. centrifugação e lavagem das amostras com Solução Fisiológica a 0,9%;
2. adição de fixador etanol absoluto-ácido acético;
3. gotejamento das amostras na superfície das lâminas;
4. banho em Solução Etanol 50%, Solução Etanol 20% e água destilada;
5. hidrólise em HCl 5N, à temperatura de 28°C;
6. lavagem em água destilada;
7. coloração pelo método de *Feulgen* e contracoloração pelo *Fast-Green*.

**Análise microscópica:** As lâminas foram codificadas e analisadas em microscópio Nikon Eclipse E100 com auxílio da objetiva de imersão. Os critérios de amostragem e padrões morfológicos foram embasados nas recomendações descritas por Thomas et al.<sup>13</sup> e atualizados conforme Bolognesi et al.<sup>11</sup> (Figura 1 e Quadro 1).

**Análise estatística:** As variáveis consideradas foram os escores celulares que compunham os critérios de proliferação, de genotoxicidade, de citotoxicidade e de apoptose e de necrose. Os dados sociodemográficos foram comparados aos achados celulares. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, para estimar os dados paramétricos e não paramétricos.<sup>15</sup> As variáveis normais foram confrontadas pelas médias no teste *t* de Student; e, com o teste de Levene, foi estimada variância a nível de 5%. O teste *t* de Student foi aplicado para comparar as médias dos dois grupos, também a nível de 5%.<sup>16</sup> Para variáveis numéricas contínuas, o teste de correlação de Pearson foi

utilizado. A fim de estimar a dinâmica reparativa da mucosa bucal dos participantes, o Índice de Reparação Celular (IR) foi calculado.<sup>17</sup>

**Aspectos Éticos:** Os aspectos éticos e legais da presente pesquisa, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCMS/PUC-SP sob numeração 695.526, seguiram as recomendações do Ministério da Saúde.<sup>18</sup> A coleta do material foi realizada mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras foram avaliadas no anonimato, mantendo-se sigilo quanto à identificação dos pacientes. Após a conclusão do estudo, as amostras foram descartadas de acordo com os critérios de biossegurança.

## RESULTADOS

Em um total de 29.813 células do GA e de 32.972 células do GC, as células que apresentaram binucleação e cromatina condensada tiveram medianas diferentes a nível 5%. Células micronucleadas e com pontes núcleo-plasmáticas, indicativos de genotoxicidade, também apresentaram significância estatística.

Para os três subgrupos do GA, as médias das frequências de micronucleação e de outras alterações nucleares foram estimadas e tiveram destaque: a frequência de micronúcleos (MN), ponte núcleo-plasmáticas (PN), células binucleadas (BI) e células em cariorrexe (KR), quando comparados ao GC, de acordo com o Figura 2.

O Índice de Reparação Celular, segundo Çelik et al.<sup>17</sup>, apresentou  $p=0,37$ . Contudo, está aumentado no GC (mediana=3,67) em relação ao GA (mediana=2,83), conforme Figura 3.

O cruzamento das informações entre as alterações celulares e as variáveis sociodemográficas foi descrito no Quadro 2.

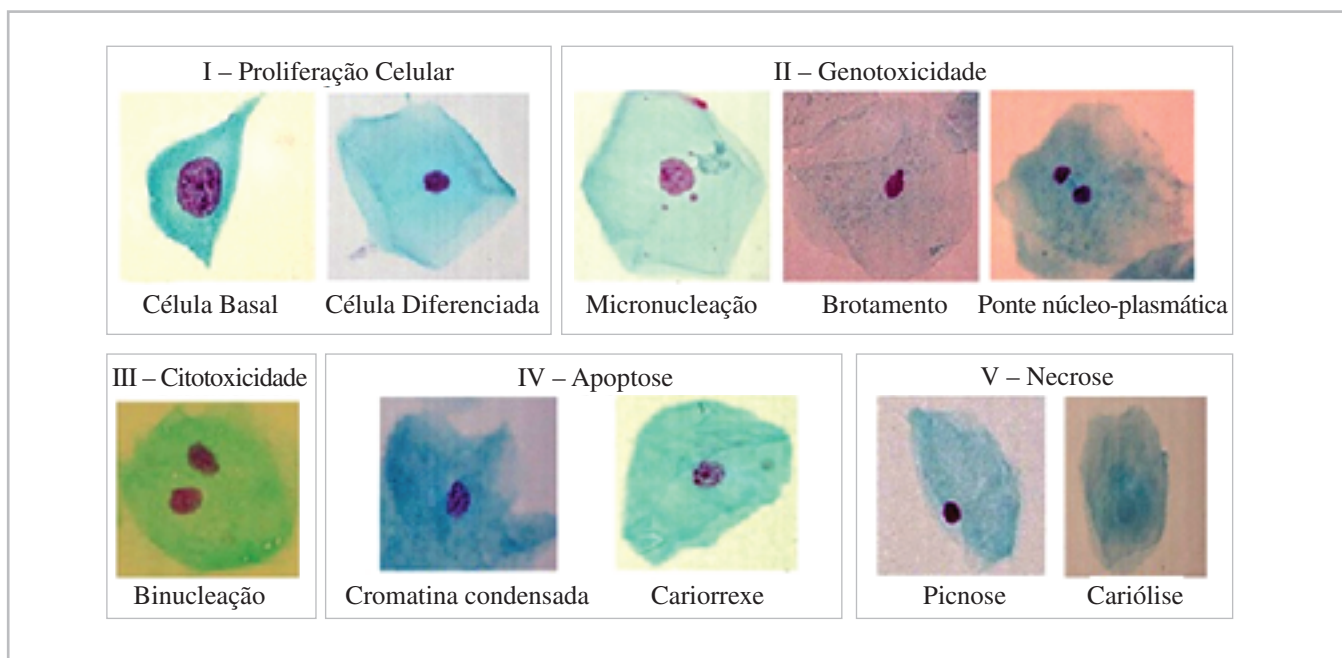


Figura 1. Fotomicrografias dos critérios de proliferação celular, de genotoxicidade, de citotoxicidade, de apoptose e de necrose em células de mucosa bucal coradas com Feulgen-Fast Green sob amplificação de 1000x ao microscópio de luz, segundo Bolognesi et al.<sup>11</sup>, modificado.

Quadro 1. Descrição dos critérios de proliferação celular, de genotoxicidade, de citotoxicidade, de apoptose e de necrose das células avaliadas de acordo com as recomendações de Thomas et al.<sup>13</sup> e atualizadas conforme Bolognesi et al.<sup>11</sup>.

I – Caracterização das células que compunham o índice de proliferação:
Célula basal: apresenta uma proporção maior da relação núcleo-citoplasma; o núcleo apresenta-se uniformemente corado e assume um formato ovalado; o citoplasma apresenta coloração mais intensa. É originada da camada basal do epitélio da mucosa e sua frequência pode estar relacionada à velocidade de proliferação celular do tecido observado.
Célula diferenciada: apresenta relação núcleo-citoplasma pequena; o núcleo mostra-se disforme e não é corado de forma homogênea; o citoplasma é mais plano e sua coloração é menos intensa. Pode ser um indicativo de homeostase tecidual quando sua frequência equivale à das células basais.
II – Caracterização das células indicadoras de ações genotóxicas:
Célula micronucleada: contém núcleo e um ou mais fragmentos de núcleo que podem variar de 1/3 a 1/6 do tamanho original do núcleo, os chamados micronúcleos; possuem formato arredondado ou oval; coram-se com intensidade semelhante ao núcleo principal de forma a possuir textura semelhante ao último. É um indicativo de fragmentação cromossômica.
Célula com brotamento nuclear: o núcleo mostra-se em constrição, formando um broto; esse broto possui mesma morfologia e coloração do núcleo e seu diâmetro pode variar de 1/2 a 1/4 do tamanho do núcleo original. Parece ser originado de um mecanismo de amplificação do DNA.
Célula com ponte núcleo-plasmática: varia entre o micronúcleo e o brotamento celular. É caracterizada por um fragmento do núcleo ainda conexo ao núcleo principal por uma área de constrição; esse fragmento possui mesma morfologia e textura do núcleo principal. Acredita-se que esse tipo morfológico seja originário de cromossomos dicêntricos com comportamentos anafásicos anormais.
III – Caracterização das células indicadoras de ações citotóxicas:
Célula binucleada: células com dois núcleos principais de intensidade e tamanho semelhantes; geralmente os núcleos apresentam-se muito próximos. Aparenta ser originada de falha na citocinese durante processo de replicação celular.
IV – Caracterização das células indicadoras de apoptose:
Célula com cromatina condensada: a cromatina está agregada em algumas regiões do núcleo e, ao mesmo tempo, é perdida em outras; assume um padrão nuclear estriado, o que é um indicativo de apoptose.
Célula em cariorrexe: apresenta padrão nuclear densamente heterogêneo, indicativo de fragmentação nuclear; é composta por núcleo com agregação de cromatina que formarão os corpos apoptóticos, um indicativo de apoptose.
V – Caracterização das células indicadoras de necrose:
Célula picnótica: contém núcleo contraído; apresenta alta densidade de material nuclear, manifestando-se em coloração intensa e uniforme; diâmetro nuclear de 1/2 e 1/3 do diâmetro nuclear original, o que é um indicativo de necrose.
Células em cariólise: apresenta-se anucleada; evidencia-se como uma imagem fantasmagórica que não tem coloração Feulgen, um indicativo de estado avançado de necrose.

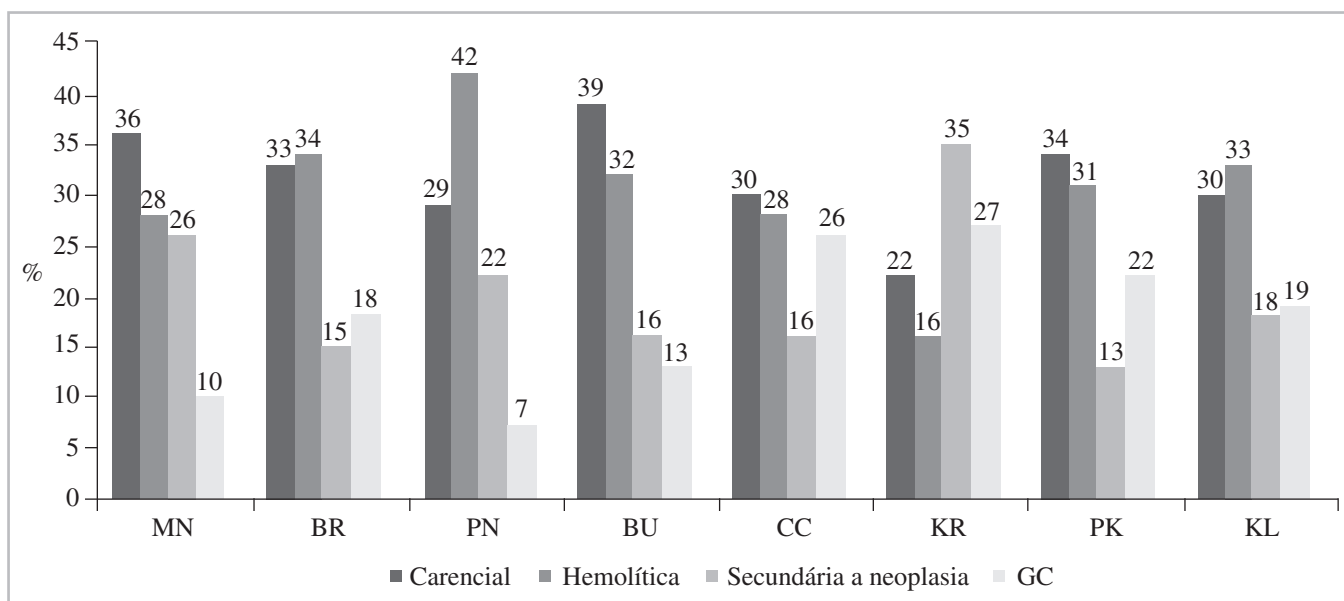


Figura 2. Porcentagem das médias dos critérios de genotoxicidade, de citotoxicidade, de apoptose e de necrose nos três subtipos de anemias comparadas ao Grupo Controle (MN: micronucleação; BR: broto celular; PN: ponte núcleo-plasmática; BI: binucleação, CC: célula com cromatina condensada; KR: célula em cariorrexe; PK: célula em picnose; KL: célula em cariólise).

## DISCUSSÃO

Segundo Fenech<sup>14</sup>, o Teste para Micronúcleo é um dos métodos mais comumente utilizados na mensuração dos danos ao DNA, uma vez que permite avaliar de maneira abrangente e seletiva as múltiplas vias de instabilidade do genoma. Também avalia a capacidade de recuperação do tecido através da eliminação de células alteradas por necrose e apoptose. O teste é um método não invasivo de simples execução, de baixo custo e de fácil interpretação no monitoramento do processo saúde-doença.

Na análise dos resultados dos parâmetros observados entre anêmicos comparados aos voluntários do grupo controle, foi possível avaliar que a genotoxicidade (micronucleação e ponte núcleo-plasmática), a citotoxicidade (binucleação) e a

apoptose (cromatina condensada) apresentaram uma frequência significativamente aumentada.

Tais resultados estão correlacionados com os dados de estudos anteriores sobre o aumento de danos citogenéticos em células somáticas de pacientes portadores de anemia, principalmente por deficiência de vitamina B12. Portanto, nossos resultados corroboram as afirmações da literatura, ao correlacionar a dieta com o risco de desenvolvimento de doenças crônicas e com a instabilidade do DNA.<sup>19</sup> Para Fenech<sup>14</sup>, alguns micronutrientes destacam-se na função de mantenedores do genoma por serem cofatores necessários para o metabolismo do DNA.

Tendo em vista a elevada frequência de micronucleação dentre os pacientes portadores de anemias carenciais, destaca-se a importância da vitamina B12 e do ácido fólico na otimização da metilação do DNA e na diminuição dos riscos de dano ao genoma<sup>20</sup>. A vitamina B12 e o ácido fólico são requeridos na síntese de metionina e de S-adenosil metionina.<sup>14</sup> Esses produtos são doadores de radical metil ao DNA e determinam a expressão gênica adequada por meio da estabilidade do material genético. O ácido fólico é um componente essencial na incorporação de uracil ao DNA, e sua deficiência aumenta as taxas de formação de micronúcleos. Mais recentemente, alguns autores associaram a deficiência de ácido fólico com a homeostase dos telômeros: a instabilidade global do DNA pela deficiência desse micronutriente desencadeia uma deposição excessiva de uracil aos telômeros, o que causa alongamento dessas terminações e grandes flutuações na extremidade do DNA.<sup>21</sup> Esses efeitos coincidem, em longo prazo, com a formação de micronúcleos, com as perdas cromossômicas terminais e com a aparente segregação disfuncional das cromátides, responsável pela formação das pontes núcleo-plasmáticas.

Para os autores Kirsh-Volders et al.<sup>22</sup>, além de micronucleação, outras alterações nucleares também estão incluídas entre os marcadores de genotoxicidade que, segundo Fenech e Crott<sup>23</sup>, são válidos para determinar o impacto da deficiência nutricional na estabilidade do genoma. Nesse sentido, ganham destaque os brotos nucleares e as pontes núcleo-plasmáticas. De acordo com Fenech et al.<sup>24</sup>, os brotamentos nucleares resultam da eliminação do excesso de DNA amplificado, provavelmente uma via comum de formação do micronúcleo. Embora os resultados não tenham concordado com os achados da literatura na correlação entre brotamentos e micronúcleos, associações positivas frente às pontes núcleo-plasmáticas foram encontradas.<sup>25</sup>

Em relação aos demais subtipos de anemias estudadas, observa-se que, nas hemolíticas, ocorre proliferação medular aumentada, com altas taxas de replicação do DNA e consumo de quantidades elevadas de ácido fólico e de outros cofatores que permitem a biossíntese segura de material genético. Pacientes em hemólise podem cursar com a coexistência de deficiências nutricionais associadas ao estresse oxidativo induzido pela anemia de base, incrementando as taxas de micronucleação.<sup>12</sup>

Supõe-se que o estresse oxidativo também possa respaldar os achados celulares em anemias secundárias a neoplasias.

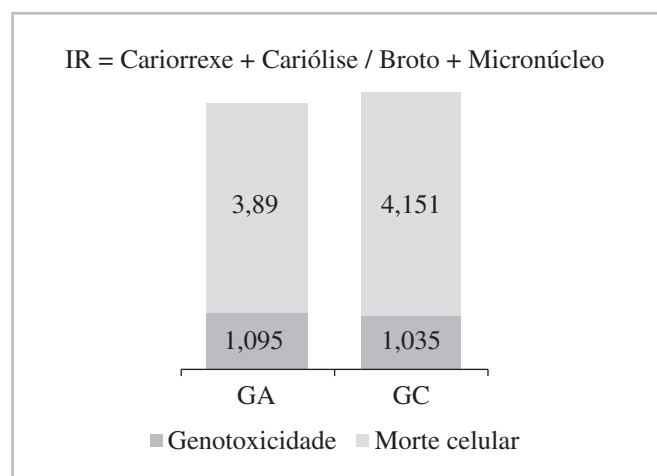


Figura 3. Proporção entre os critérios de morte celular (cariorrexe e cariólise) e genotoxicidade (brotamentos e micronucleação) entre os grupos GA e GC.

Quadro 2. Correlações entre as alterações celulares e as variáveis sociodemográficas estudadas.

Variável Analisada	Grupo de influência	Parâmetro celular	Valor p
Sexo (masculino)	GA	Cariólise	↑ 0,0127
Consumo de álcool	GA	Micronúcleos	↑ 0,0427
	GC	Cromatina Condensada	↑ 0,0292
Tabagismo	GC	Pontes Nucleo-plasmáticas	↑ 0,0279
Não usar antisséptico	GA e GC	Células Binucleadas	↑ 0,011 e 0,0394, respectivamente
	GA	Células Picnóticas	↑ 0,0204
Uso de Polivitamínicos	GA	Células Picnóticas	↓ 0,0376

Outros autores afirmam que muitos dos caminhos de sinalização e de expressão gênicas nas neoplasias são acionados pela privação de glicose e pelo estresse oxidativo, decorrente do defeito na função mitocondrial ou de outros mecanismos.<sup>26</sup> No caso das anemias causadas por neoplasias, Hoffbrand e Moss<sup>27</sup> comentam, ainda, que a diminuição da disponibilidade de micronutrientes no plasma pode atuar como geradora de citotoxicidade e de genotoxicidade, aumentando a frequência de micronucleações e de outras alterações nucleares em células de portadores de doenças crônicas. Os nossos resultados do subtipo secundário à neoplasia mostram frequência aumentada de nucleação e de pontes núcleo-plasmáticas, exceto brotamentos, embora a média das frequências desses marcadores de toxicidade tenha sido menor, o que provavelmente está relacionado à casuística bastante reduzida para esse subtipo. Contrariamente ao esperado, elevadas taxas de apoptose foram demonstradas entre os portadores de doenças crônicas malignas.

Embora os dados da literatura não demonstrem relação entre o sexo e a ocorrência dos parâmetros indicadores de genotoxicidade e citotoxicidade<sup>28</sup>, em nossas investigações, observamos maior frequência de brotamentos entre os homens do grupo controle.

Quanto ao estilo de vida dos indivíduos etilistas de nossa casuística, observamos a influência do consumo de álcool sobre a frequência de micronucleações entre os anêmicos e de cromatina condensada no grupo controle. Andrade et al.<sup>29</sup> comentam que a mobilização de bebidas alcólicas promove a biotransformação do etanol em metabólitos altamente lesivos, como as nitrosaminas, os hidrocarbonetos policíclicos e aromáticos e acetaldeído, o que justificaria os efeitos genotóxicos da biotransformação do álcool no organismo do etilista.

Abasova et al.<sup>30</sup> relataram, em recente publicação, os efeitos antimutagênicos da suplementação vitamínica, principalmente A e C, em humanos. Em nossa casuística, observamos que entre os que faziam uso de suplementação vitamínica, houve redução da ocorrência de picnose.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se com a presente pesquisa que a elevada frequência de micronúcleos em anêmicos foi atribuída ao estresse oxidativo, ao déficit nutricional ou a outras condições predisponentes como a etiologia genética da anemia ou a presença de doença crônica. Embora poucos estudos apontem os danos genéticos com presença de micronúcleos e de outras alterações nucleares em doenças hematológicas, acredita-se que as alterações no genoma desses doentes possam ter sido geradas pela nutrigenômica. Tal fato pode propor um modo diferente de tratar o paciente anêmico visando, além dos tratamentos tradicionais, à obtenção de nutrientes essenciais para a estabilidade genômica.

## REFERÊNCIAS

1. Patel KV. Epidemiology of anemia in older adults. *Semin Hematol.* 2008; 45(4):210-7.

2. Afonseca MA, De Almeida RR, Reis SR, Medrado, AR. Repercussão de doenças sistêmicas no reparo tecidual. *Rev Bahiana Odontol.* 2012;3(1):63-75.
3. Adamson JW, Longo DL. Anemia e policitemia. In: Braunwald E, Kasper AS, Fauci J, Jameson JL, Longo DL, Hauser S. *Medicina Interna de Harrison.* Porto Alegre: Artmed; 2013. p. 448-57.
4. Castro RCB, Waitzberg DL. Nutrigenômica e câncer: qual a evidência? *Onco&.* 2013;38-42.
5. Sung C, Hsu Y, Chen C, Lin Y, Wu C. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative Med Cell Longevity.* 2013;1-15.
6. Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pomblum VJ, Garcia SC. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *J Bras Patol Med Lab.* 2005;41(5):323-34.
7. Andrés E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ.* 2004;171(3):251-9.
8. Bull CF, Mayrhofer G, O'Callaghan NJ, Au AY, Pickett HA, Low GK, et al. Folate deficiency induces dysfunctional long and short telomeres; both states are associated with hypomethylation and DNA damage in human WIL2-NS cells. *Cancer Prev Res.* 2014;7(1):128-38.
9. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res.* 2003;540(2):153-63.
10. Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna MG, Nava A, Flores-García A, Ramos-Ibarra ML. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers.* 2014; Article ID 956835.
11. 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.
12. Lal A, Ames BN. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. *Mutagenesis.* 2011; 26(1):57-62.
13. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37.
14. Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology.* 2002;181-182:411-6.
15. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics.* 2a ed. Nova Jersey: John Wiley; 1980.
16. Morettin PA, Bussab WO. *Estatística básica.* 6a ed. São Paulo: Saraiva; 2010.
17. Çelik A, Diler SB, Eke D. Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA Cell Biol.* 2010;29(6):277-84.

18. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 [Internet]. Brasília (DF): Conselho Nacional de Saúde; 2012. 12 p. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>
19. Milić M, Rozgaj R, Kašuba V, Oreščanin V, Balića M, Jukić I. Correlation between folate and vitamin B<sub>12</sub> and markers of DNA stability in healthy men: preliminary results. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(3):339-45.
20. Fenech M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutat Res.* 2012;733(1-2):21-33.
21. Bull CF, Mayrhofer G, O'Callaghan NJ, Au AY, Pickett HA, Low GK, et al. Folate deficiency induces dysfunctional long and short telomeres; both states are associated with hypomethylation and DNA damage in human WIL2-NS cells. *Cancer Prev Res.* 2014;7(1):128-38.
22. Kirsch-Volders M, Bonassi SB, Knasmueller S, Holland N, Bolognesi C, Fenech MF. Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-a HUMN project perspective. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014;759:49-58.
23. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res.* 2002;504(1-2):131-6.
24. Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res.* 2001;475(1-2):57-67.
25. Cheong HS, Seth I, Joiner MC, Turcker JD. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis.* 2013;28(4):433-40.
26. Limoli CL, Giedzinski E. Induction of chromosomal instability by chronic oxidative stress. *Neoplasia.* 2003;5(4):339-46.
27. Hoffbrand AV, Moss PA. *Fundamentos em hematologia.* Porto Alegre: Artmed; 2013.
28. Kashyap B, Reddy PS. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(2):184-91.
29. Andrade MG, Reis SR, Robinson WM, Borges-Osório MR. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Rev Odonto Ciência.* 2005;20(48):137-41.
30. Abasova OY, Reutova NV, Sycheva LP, Chernysheva EA. Studies of antimutagenic effects of vitamins A and C in humans. *Bull Exp Biol Med.* 2013;154(5):649-53.