

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THATIANE LORENA MIRANDA BATISTA

**AVALIAÇÃO DE DANOS GENÔMICOS EM
PACIENTES SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE, APÓS
SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA**

VITÓRIA

2012

THATIANE LORENA MIRANDA BATISTA

**AVALIAÇÃO DE DANOS GENÔMICOS EM
PACIENTES SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE, APÓS
SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Vitória

2012

THATIANE LORENA MIRANDA BATISTA

**AVALIAÇÃO DE DANOS GENÔMICOS EM
PACIENTES SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE, APÓS
SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 2 de Março de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a Dr^a Silvana do Santos Meyrelles
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a Dr^a Eliete Rabbi Bortolini
FAESA

Vitória
2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me oportunizou a vida, e diariamente me dá amparo e forças para que as aventuras da vida sejam aproveitadas da melhor forma por mim.

Aos meus pais, irmão e tios que mesmo com uma distância física se fazem presentes em cada passo meu. À vocês minha eterna gratidão.

Ao meu marido Lutz que é meu braço direito, esquerdo e principalmente meu coração, quem diariamente me revitaliza com seus olhos de esperança e paciência. Te amo sempre.

À minha orientadora e amiga, Maria do Carmo, por confiar no meu trabalho e me apoiar sem que houvesse esquecimento da seriedade e responsabilidade de cada momento.

Aos amigos do Laboratório de Genética Toxicológica e Vegetal, Juliana, Luciano, Jean, Irany, Tatiane, Patrícia, Anny, Josi pelo companheirismo e cumplicidade.

Aos meus amigos que tiveram a compreensão da minha ausência por estes anos por dedicação ao mestrado, e mesmo à distância torcem por meu sucesso.

À universidade Federal do Espírito Santo, e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela possibilidade de desenvolver esse trabalho.

Às Prof^a Dr^a Silvana Meyrelles e Eliete Bortolini que compõem essa banca examinadora, que com certeza muito irão contribuir com suas opiniões.

À Dr^a Cristiane Campostrini por ter abraçado o projeto e permitido o desenvolvimento deste com seus pacientes.

À Enf^a chefe Mayara Betini Bertoli e toda equipe de enfermagem que me acolheu e foram pacientes comigo.

Ao Instituto Capixaba do Rim por ter viabilizado e autorizado o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos queridos pacientes voluntários dessa pesquisa, que foram companhia nos dias de coleta e que mesmo em dias difíceis e de dor contribuíram e permitiram que este trabalho fosse desenvolvido. Que Deus os abençoe e proteja.

Às agências de fomento FAPES e CAPES.

*“Escolhe um trabalho de que gostes,
e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida”*

Confúcio

RESUMO

A insuficiência renal crônica (IRC) é cada vez mais frequente na população e implica na perda irreversível das funções renais, o que torna necessário um tratamento de terapia renal substitutiva. A mais comum é a hemodiálise, que realiza uma filtração extracorpórea, removendo líquidos e toxinas do sangue do paciente. Porém, esse processo não fisiológico promove um aumento do estresse oxidativo e de complicações como doenças de morbimortalidade, dentre elas a doença cardiovascular e o câncer. Para que uma redução na frequência dessas doenças seja alcançada a utilização de vitaminas se faz necessária já que o estado nutricional interfere para o desenvolvimento dessas doenças. O objetivo desse estudo foi analisar a genotoxicidade e citotoxicidade em pacientes renais crônicos utilizando o ensaio do micronúcleo em linfócitos e células da mucosa bucal após a suplementação vitamínica por ácido fólico, e vitaminas E, C e B12. Dezesesseis pacientes voluntários forneceram, cada um, três amostras para cada ensaio, uma amostra foi antes de receberem a suplementação e duas durante o tratamento, após um e dois meses de utilização das vitaminas. No ensaio dos linfócitos com bloqueio de citocinese (CBMN) foram analisados brotos, pontes nucleoplasmática e micronúcleos em células binucleadas, além do índice de divisão nuclear. Já nas células da mucosa foram analisadas células binucleadas, e as mononucleadas em apoptose, cariólise, com micronúcleos e *broken egg*. Os resultados obtidos demonstram que a frequência das alterações nucleares foi reduzida com a utilização das vitaminas, nos dois ensaios, sendo que algumas avaliações não tiveram diferenças estatísticas. Além disso, foram encontradas diferenças de comportamento dos gêneros frente à suplementação. Este trabalho fornece evidências de que a utilização vitamínica, pelos pacientes renais crônicos, foi associada a reduções das alterações nucleares avaliadas, o que pode contribuir para melhor qualidade de vida desses indivíduos.

Palavras-chave: IRC. Vitaminas. Ensaio do micronúcleo. Alterações nucleares.

ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) is increasingly common in the population and involves the irreversible loss of kidney function necessitating treatment of renal replacement therapy. The most common is hemodialysis that performs a bypass filtration, removing fluids and toxins from the blood of the patient. But this process does not physiological causes an increase in oxidative stress and complications such as diseases of morbidity and mortality among them the cardiovascular disease and cancer. For a reduction in the frequency of these diseases is achieved the use of vitamins is necessary because the nutritional status affects the development of these diseases. The aim of this study was to examine the genotoxicity and cytotoxicity in chronic renal patients using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal mucosa cells after vitamin supplementation by folic acid and vitamins E, C and B12. There were 16 voluntary patients provided that each of the three samples for each test, a sample was received before supplementation and during the treatment, after one and two months of use of vitamins. In the assay of lymphocytes with blocking cytokinesis (CBMN) were analyzed nuclear buds, nucleoplasmic bridges and micronuclei in binucleated cells, and nuclear division index. Already in the cells of mucosa were binucleated cells, mononucleated and apoptosis, karyolysis, micronucleus and broken egg. The results show that the frequency of nuclear abnormalities was reduced with the use of vitamins in two trials, and in some assessments there were no statistical differences. In addition, were found gender differences in behavior of supplementation. This study provides evidence that vitamin use by patients with chronic renal failure was associated with reductions in nuclear changes evaluated, which may contribute to better quality of life for these patients.

Keywords: CRF. Vitamins. Micronucleus assay. Nuclear alterations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo da homocisteína _____	16
Figura 2 - Vias metabólicas dependentes de ácido fólico e vitamina B12 _____	20
Figura 3 - Estrutura química do ácido fólico _____	20
Figura 4 - Estrutura química da vitamina B12 _____	21
Figura 5 - Estrutura química da vitamina C _____	22
Figura 6 - Estrutura química da vitamina E _____	23
Figura 7 - Possíveis respostas celulares após evento genotóxico _____	25
Figura 8 - Tipos celulares analisados pelo ensaio do MN em mucosa bucal _____	28
Figura 9 – Visualização de pontes nucleoplasmáticas e MN (CBMN) _____	30
Figura 10 – Formação de MN e brotos a partir de rupturas em PNP _____	31
Figura 11 – Índice de divisão nuclear no ensaio CBMN com pacientes juntos _____	40
Figura 12 – Frequência de PNP em 1000 linfócitos binucleados (pacientes juntos)	40
Figura 13 - Frequência de MN em 1000 linfócitos binucleados (pacientes juntos) _____	41
Figura 14 - Frequência de broto em 1000 linfócitos binucleados (pacientes juntos) _____	41
Figura 15 - Índice de divisão nuclear no ensaio CBMN pacientes separados pelo sexo _____	42
Figura16 - Frequência de PNP em 1000 linfócitos binucleados (pacientes separados pelo sexo) _____	42
Figura 17- Frequência de MN em 1000 linfócitos binucleados (pacientes separados pelo sexo) _____	43
Figura 18 - Frequência de brotos em 1000 linfócitos binucleados (pacientes separados pelo sexo) _____	44
Figura 19 – Frequência de células binucleadas na mucosa bucal (pacientes juntos) _____	45
Figura 20 - Frequência de <i>broken egg</i> em 1000 células da mucosa bucal (pacientes juntos) _____	46

Figura 21 - Frequência de MN em 1000 células da mucosa bucal (pacientes juntos) _____	46
Figura 22 - Frequência de apoptose em 1000 células da mucosa bucal (pacientes juntos) _____	47
Figura 23 - Frequência de cariólise em 1000 células da mucosa bucal (pacientes juntos) _____	47
Figura 24 - Frequência de células da mucosa bucal binucleadas (pacientes separados pelo sexo) _____	48
Figura 25 - Frequência de <i>broken egg</i> em 1000 células da mucosa bucal (pacientes separados pelo sexo) _____	48
Figura 26 - Frequência de MN em 1000 células da mucosa bucal (pacientes separados pelo sexo) _____	49
Figura 27 - Frequência de apoptose em 1000 células da mucosa bucal (pacientes separados pelo sexo) _____	49
Figura 28 - Frequência de cariólise em 1000 células da mucosa bucal (pacientes separados pelo sexo) _____	50
Figura 29 - Fotomicrografia dos linfócitos analisados _____	79
Figura 30 - Fotomicrografia das células da mucosa bucal analisadas _____	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
BE	<i>Broken egg</i>
BN	Células binucleadas
CBMN	Teste micronúcleo com bloqueio de citocinese
Cito-B	Citocalasina- B
CL	Cariólise
DCV	Doença Cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença Renal Crônica
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Hcy	Homocisteína
HD	Hemodiálise
IDN	Índice de divisão nuclear
IRC	Insuficiência Renal Crônica
mL	mililitros
MN	Micronúcleo
pH	potencial Hidrogeniônico
PNP	Ponte Nucleoplasmática
RL	Radicais livres
RNA	Ácido ribonucleico
SUS	Sistema Único de Saúde
TRS	Terapia Renal Substitutiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Os Rins e a Insuficiência Renal Crônica	12
1.2	Hemodiálise	14
1.3	Homocisteína e Estresse Oxidativo	15
1.4	Vitaminas	19
1.4.1	Ácido Fólico	20
1.4.2	Vitamina B12	21
1.4.3	Vitamina C	22
1.4.4	Vitamina E	23
1.5	Ensaio para Detecção de Danos Genômicos	24
1.5.1	Células esfoliadas da mucosa bucal	26
1.5.2	Cultura de células com bloqueio da citocinese	89
1.6	Hipótese	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	Considerações Éticas	33
3.2	Procedimento Experimental	33
3.3	Seleção dos Voluntários	34
3.4	Coletas das Amostras Biológicas	34
3.5	Células Epiteliais Esfoliadas da Mucosa Bucal	35
3.6	Cultura de Células com Bloqueio da Citocinese	36
3.7	Análise Citológica e Microscópica	37
3.8	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Cultura de células com Bloqueio da citocinese	39
4.2	Células epiteliais da mucosa bucal	45
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	58

7	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO A	69
	ANEXO B	70
	APÊNDICE A	71
	APÊNDICE B	74
	APÊNCICE C	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os Rins e a Insuficiência Renal Crônica

Os rins são órgãos responsáveis pela eliminação de diversas toxinas do organismo e conservação de substâncias essenciais como água e aminoácidos sendo então fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano. Possuem ainda função reguladora sobre o volume líquido corporal, sobre a osmolaridade e o pH extracelular, além de exercer papéis hormonais e metabólicos vitais. Eles estimulam o processo de formação de hemácias na medula óssea, por meio da produção de eritropoetina, ativam a vitamina D e contribuem para a manutenção da saúde óssea. Dessa forma, a perda da função renal implica no comprometimento de outros órgãos. (BASTOS; BREGMAN; KIRSZTAJN, 2010)

A Doença Renal Crônica (DRC) consiste em uma lesão renal com perda progressiva e irreversível das funções dos rins (glomerular, tubular e endócrina). Em sua fase mais avançada (fase terminal de insuficiência renal crônica - IRC), os rins não conseguem mais manter a homeostase no organismo do paciente (JUNIOR, 2004). Fatores como Nefropatia Diabética, Hipertensão Arterial Sistêmica e as glomerulonefrites são apontados como principais etiologias de doença renal terminal na atualidade (SESSO et al., 2011).

A insuficiência renal crônica provoca acúmulo de metabólitos no sangue. A síndrome é assintomática, no início, e os sintomas se manifestam lentamente. Dentre eles: fadiga, espasmos musculares, anemia, edema, diminuição do débito urinário, náuseas, hipertensão, falta de apetite e, com seu avanço, úlceras, sangramento intestinal e alterações na coloração da pele (CASSINI et al., 2010).

A perda progressiva da filtração glomerular se associa a um conjunto extenso e complexo de alterações fisiológicas que resultam em elevado número de complicações e altas taxas de morbidade e mortalidade (CATTAL et al., 2007;

SESSO E GORDAN, 2007), o que caracteriza a DRC como grande problema de saúde pública (RYAN et al., 2007)

O número de pacientes portadores de IRC está aumentando em todo o mundo. No Brasil, os resultados dos Censos de 2009 e 2010, publicados pelo Jornal Brasileiro de Nefrologia, com base nos dados divulgados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, mostram que o número estimado de pacientes em tratamento dialítico era de 77.589 e 92.091 pacientes, respectivamente. O Sudeste apareceu como a região que possui mais da metade dos casos nos dois anos. O número estimado de óbitos em 2009 foi de 13.235, correspondendo a uma taxa de mortalidade bruta de 17,1%, já em 2010 foram 16.505 óbitos, correspondendo a 17,9%. Foi demonstrada uma predominância do tratamento por hemodiálise (89,6% e 90,6%, respectivamente) dentre esses pacientes, sendo a grande maioria atendida pelo Sistema Único de Saúde (SUS), por unidades com convênio ou pagas por este, porcentagem superior a 91% dos casos. (SESSO et al., 2010, 2011)

O Ministério da Saúde publicou no dia 27 de dezembro de 2011 a destinação de mais de 73,3 milhões de reais para a ampliação dos serviços de hemodiálise oferecidos pelo SUS, estes serão adicionais à verba anual de 2,1 bilhões de reais, ofertada aos procedimentos de nefrologia pela rede pública de saúde. Isso demonstra que tem sido dada uma atenção privilegiada ao tema pelo poder público, devido à necessidade de suprir a demanda crescente de tratamento para portadores de Insuficiência Renal Crônica (GARCIA, 2011).

Para o tratamento da IRC, utiliza-se uma Terapia Renal Substitutiva (TRS) como diálise peritoneal e a hemodiálise (HD), que não promove a cura do paciente, mas alivia os sintomas da doença e preserva a vida do paciente (KUSUMOTO, 2008). Outra opção de TRS é o transplante renal, que é uma opção que fornece maior sobrevida, porém, o procedimento cirúrgico não é aconselhado a todas as idades e como é crescente a quantidade de portadores de IRC, a demanda supera a quantidade de doadores, aumentando o número de pacientes admitidos nos centros de diálise (GODOY; NETO; RIBEIRO, 2007; GARCIA; ROMERO; POLLETE, 2005)

1.2 Hemodiálise

A hemodiálise, TRS mais comumente empregada, é utilizada por pacientes com doença aguda e que necessitam de diálise em curto prazo, bem como para portadores de IRC, que permanecem por longo tempo em tratamento (PIVATTO e ABREU, 2010).

Consiste num processo artificial de depuração sanguínea, o qual remove o excesso de líquido e metabólitos dos pacientes. É caracterizada como uma circulação extracorpórea com transferência dos metabólitos (toxinas e líquidos) por difusão, entre o sangue e a solução de diálise. Para tal transferência, é utilizada uma membrana semipermeável artificial, que se encontra imersa em uma solução eletrolítica, a qual possui concentração semelhante ao plasma de um indivíduo com função renal normal (FERMI, 2003).

Para realização do tratamento por HD é necessário um acesso vascular para retirada do sangue da corrente sanguínea, e seu posterior retorno ao corpo. Sendo assim, uma microcirurgia deve ser realizada estabelecendo uma anastomose arteriovenosa, que resulte em fistulação dos vasos. As punções para as sessões dialíticas são facilitadas por esta fístula. Durante a HD, a cadeia de coagulação sanguínea é ativada, por isso, para evitar a formação de trombos, é utilizado o anticoagulante heparina (DAMASCENO; LOUREIRO; SILVA, 2001)

Geralmente, são realizadas, no mínimo, três sessões semanais, cada uma com duração de três a quatro horas. Esse regime de procedimentos obriga os indivíduos/pacientes a sofrerem mudanças psicossociais e clínicas as quais interferem na sua qualidade de vida (QUEIROZ, 2008).

Diante desse processo não fisiológico de filtração do sangue, há de se esperar que advenham algumas complicações crônicas da uremia (elevação da uréia na circulação) e efeitos colaterais decorrentes da terapêutica (ARAUJO et al., 2006; SEGALL et al., 2009). Podem-se destacar problemas eventuais, porém, graves e fatais, tais como hipotensão, hipertermia, arritmias e hemorragias, ocorridos durante a sessão de hemodiálise, além dos decorrentes do tratamento em si, como o

comprometimento no seu estado nutricional, infecções, sangramentos e distúrbios no metabolismo hidroeletrolítico (ácido – básico), de lipídeos e demais macromoléculas, deficiência imunológica e anemia (BATISTA et al., 2005).

Dentre as desordens desenvolvidas nos pacientes com IRC as mais comuns são a desnutrição – com redução dos níveis de antioxidantes –, a instabilidade vascular, inflamações crônicas, sistema imunológico suprimido, acúmulo de toxinas urêmicas e o estresse oxidativo, e com isso as enfermidades a elas relacionadas, como as doenças cardiovasculares e o câncer (BIANCHI, 2007).

1.3 Homocisteína e Estresse Oxidativo

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, produto do metabolismo proteico e mais especificamente da metionina (NERBASS; DRAIBE; CUPPARI, 2005). Pacientes com insuficiência renal crônica ou em diálise possuem concentrações de Hcy sérica de duas a quatro vezes maiores que os valores normais, existindo um pequeno grupo que permanece normohomocisteinêmico (DIAS et al., 2001). O aumento dos níveis plasmáticos deste aminoácido está diretamente relacionado com aterogênese e trombogênese, e é decorrente da deficiência de enzimas envolvidas no seu metabolismo ou de seus cofatores (vitaminas) (AMORIM et al., 2011). O nível sérico elevado de Hcy (hiper-homocisteinemia) age como fator que promove aumento de estresse oxidativo (EO) uma vez que sofre autooxidação, posteriormente produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 1).

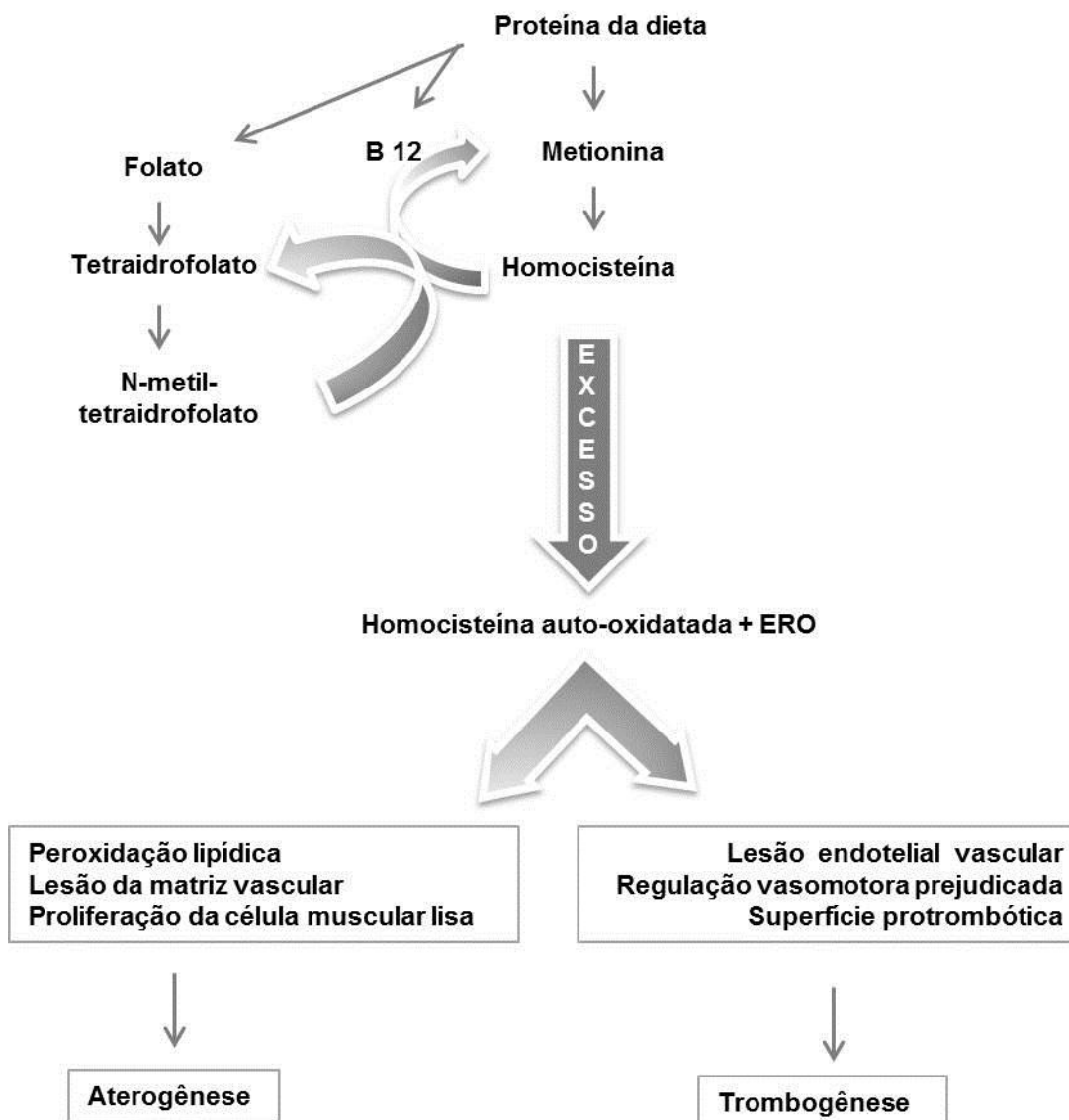


Figura 1: Metabolismo da Homocisteína e possível mecanismo de doença aterotrombótica. Fonte: adaptado de Neves et al., 2004.

O estresse oxidativo, também muito frequente em pacientes com IRC e principalmente nos que realizam hemodiálise (BIANCHI et al., 2009; STOYANOVA et al 2010), é definido como um desequilíbrio entre os fatores pró e antioxidantes, seja pela produção rápida e/ou excessiva de radicais livres (RL), pela deficiência nas defesas antioxidantes ou por combinação de ambas as condições (GALLI et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

Os radicais livres são estruturas químicas muito instáveis e reativas capazes de se combinar com as biomoléculas integrantes e seus derivados (BARREIROS; DAVID,

2006). Os radicais livres se formam em condições fisiológicas (cadeia respiratória na mitocôndria) e em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares, que extinguem as espécies reativas de oxigênio, limpam moléculas danificadas e reparam injúrias moleculares, no caso de organismos saudáveis. As ERO são radicais livres derivados do oxigênio e suas proporções são controladas ou seus efeitos deletérios minimizados pelo sistema antioxidante enzimático e/ou não enzimático, produzido pelo organismo ou adquirido pela dieta (VASCONCELOS et al., 2007).

Contudo, a capacidade total antioxidante do plasma humano é diminuída durante a sessão de diálise, indicando possíveis mecanismos de modificação de antioxidantes endógenos (WEINSTEIN et al., 2000; ROMEU et al., 2010). Além da deficiência no sistema antioxidante, existem evidências de que a formação das ERO não seja apenas consequência do tratamento dialítico ou do progresso da doença, mas também um dos agentes causadores da IRC, e que o estresse oxidativo pode estar presente em portadores da doença, mesmo na ausência de hemodiálise. (THABET e CHAN, 2006; ROMEU et al., 2010) Entende-se, dessa forma, que havendo estresse oxidativo, há ação degenerativa dos radicais livres.

Os radicais livres, em situações de estresse oxidativo, promovem reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos às macromoléculas (proteínas, lipídeos e DNA) afetando a saúde humana. Os danos considerados de maior relevância são aqueles causados ao material genético, DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é rompida, pode ocorrer, durante o mecanismo de reparo, uma ligação de bases em posição diferente da original/correta, constituindo um dos processos básicos da mutação.

Para que se possa identificar se há ocorrência de EO, são utilizados biomarcadores, que são indicadores de eventos biológicos, que permitem a discriminação entre condições biológicas normais e anormais. Classificam-se como biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade genética (STOYANOVA et al., 2010).

Vários marcadores de estresse oxidativo foram estudados para a IRC, entretanto, como a maioria é de transeuntes, - que estão sendo metabolizados, excretados ou eliminados pela diálise -, não atuam como um bom biomarcador (STOYANOVA et

al., 2010). Dessa forma, o dano oxidativo no DNA foi identificado como um bom índice de EO, já que não apresenta um caráter tão transitório como o de outros marcadores desse estresse. Como exemplos de biomarcadores genotóxicos, que são evidências de injúrias ocorridas no material genético, têm-se os micronúcleos, as pontes nucleoplasmáticas e as protusões nucleares, que se enquadram nos biomarcadores de efeito.

A manutenção dos pacientes em diálise aumenta o risco de câncer por diversas razões, dentre elas: a presença de infecção crônica (como no aparelho urinário); enfraquecimento do sistema imunológico; uso de drogas imunossupressoras ou citotóxicas; deficiências nutritivas; e alteração no reparo de DNA (MAISONNEUVE et al., 1999). Grande parte de dano endógeno no DNA é induzida por ERO que escapam à maquinaria da desintoxicação do organismo. Nas circunstâncias que envolvem altos níveis de ERO, as rupturas próximas de fita simples podem conduzir à formação de rupturas de dupla fita e o não reparo dessas quebras na molécula de DNA resulta na ocorrência de fragmentos da cromatina ou em perdas de cromossomos inteiros, que não são distribuídos corretamente durante a mitose, o que pode conduzir à formação dos micronúcleos (MN) (STOPPER et al., 1999).

Os micronúcleos são compostos por formas transcricionais ativas e inativas, sendo que com frequência as atividades transcricionais são indetectáveis, ou seja, a informação nele contida fica indisponível para a célula (HOFFELDER et al., 2004 apud LADEIRA 2009). Na interfase seguinte, o MN pode ser detectado no citoplasma como uma estrutura que contém material da cromatina envolvido por membrana. O MN é assim um indicador sensível do dano genético causado exógena ou endogenamente e a consequência clínica importante do dano genômico é o desenvolvimento posterior do câncer (STOPPER et al., 1999). Dessa forma o MN se transformou num importante marcador de genotoxicidade em testes *in vivo* e em *in vitro*.

O câncer é uma doença complexa, com número crescente de portadores. De modo geral, as células neoplásicas possuem crescimento desordenado, por vezes, invadindo outros tecidos e perturbando as funções normais do organismo. Isso ocorre devido a alterações no DNA, em genes chaves envolvidos no controle da morte por apoptose e da divisão celular. Existem mecanismos moleculares

responsáveis pela manutenção da integridade do genoma, seja atuando no reparo das mutações/lesões no DNA ou induzindo a apoptose. Na falha destes mecanismos, as células mutadas não são excluídas e nem reparadas, e se multiplicam ocorrendo a predisposição ao câncer. (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010) e a possibilidade de desenvolver tumores no rim, bexiga e cavidade oral é até nove vezes maior nesses pacientes (SCHUPP et al., 2008).

Dado o exposto, o nível elevado de Hcy, presente em portadores da IRC, por si só é um fator de risco cardiovascular, mas também é um causador de EO, que ocasiona danos nas biomoléculas, dentre elas o DNA. As agressões ao material genético resultam em mutações e o acúmulo de mutações está relacionado à carcinogênese. Dessa forma, o ensaio do micronúcleo é utilizado como bioindicador desse tipo de dano, e este está relacionado diretamente com as concentrações de Hcy e estresse oxidativo, “fatores” importantes na etiologia das doenças de morbimortalidade da IRC como a doença cardiovascular e o câncer.

Para que seja amenizado o risco de desenvolvimento de doenças de comorbidade em portadores de IRC, como, por exemplo, as DCV e o câncer, é imprescindível que sejam reduzidos os níveis de homocisteína, assim como o estresse oxidativo e, conseqüentemente, que seja mantida a estabilidade genômica. Para isso, substâncias ou compostos com características antioxidantes e/ou que participem da via metabólica da Hcy podem ser utilizados como protagonistas nas ações de prevenção dessas doenças.

1.4 Vitaminas

Fenech (1999, 2005) afirma que os níveis micronutrientes estão relacionados com a formação de micronúcleos (MN) e estes são resultados de danos cromossômicos e mitóticos. A alteração das quantidades plasmáticas ideais das vitaminas e minerais (fundamentais para a manutenção da integridade genômica) produzem efeitos enzimáticos desordenados semelhantes aos causados por exposição a carcinogênicos (FENECH; FERGUSON, 2001).

No metabolismo da homocisteína (Figura 2) duas vitaminas atuam como cofatores a vitamina B12 (cobalamina) e o ácido fólico (vitamina B9). Moura e colaboradores (2011) apontam que dois terços de todos os casos de hiper-homocisteinemia estão associados com a insuficiência das vitaminas B12 e ácido fólico, sugerindo que a deficiência nutricional é a principal causa de níveis elevados de Hcy na população. Além disso, estas duas vitaminas estão relacionadas com as vias de síntese de nucleotídeos, logo, de DNA, no reparo de lesões no DNA e de sua metilação (BULL; FENECH, 2008; FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010).

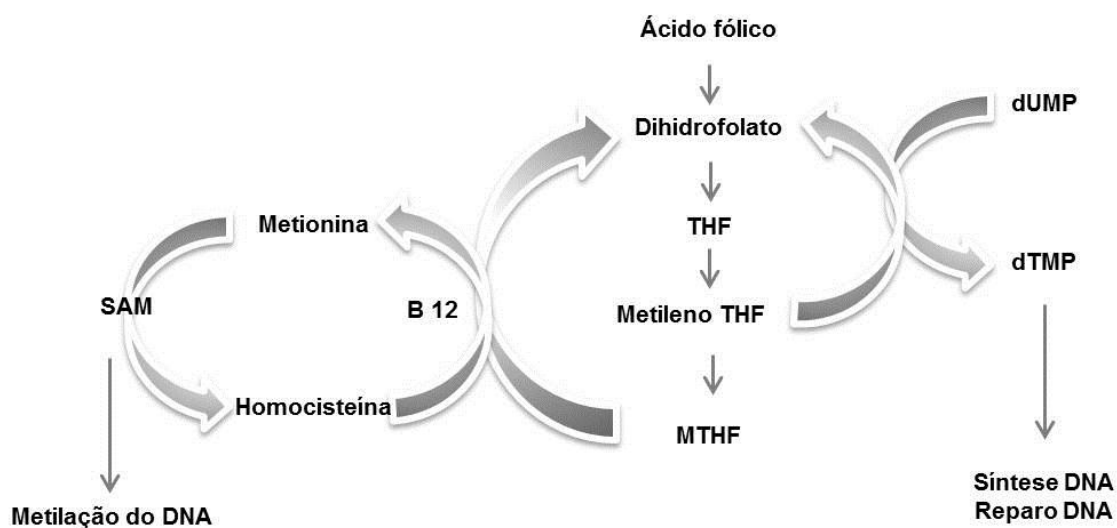


Figura 2: Participação das vitamina B12 e do ácido fólico no metabolismo da homocisteína e na síntese e metilação do DNA. Fonte: Adaptado de Wang; Fench, 2003.

1.4.1 Ácido Fólico

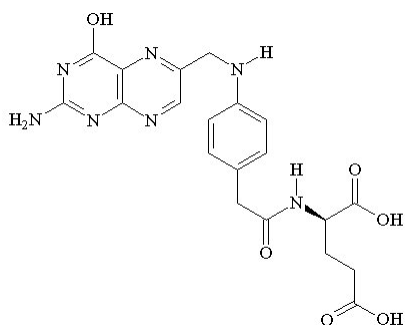


Figura 3: Estrutura química do ácido fólico. Fonte: Katzung, 1998.

O ácido fólico é a forma sintética do folato (vitamina B9 do complexo B) e atua como um cofator essencial em muitas reações do metabolismo intermediário, como: transferência de unidades de carbono, síntese de nucleotídeos, interconversão de aminoácidos (metionina-homocisteína), biossíntese de purinas e pirimidinas (ZIEGLER; LIM, 2007) (Figura 3). A deficiência desta vitamina causa quebras no cromossomo humano, devido à insuficiente metilação da uracila à timina, e posterior incorporação da uracila no DNA humano, ao invés de timina, gerando uma perturbação à integridade do material genético e possível formação de MN (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010).

Nutrientes como as vitaminas B6 e B12 interagem metabolicamente com o folato (BAILEY, 2003). Estudos apontam uma relação entre a ingestão de folato e a redução dos riscos de câncer de mama (ZHANG et al. 2003; FERRAZ et al., 2010), ovário, esôfago, estômago, cólon retal (HARNAK et al., 2002; KIM, 2004; GIOVANNUCCI 2002) pâncreas e tecidos linfóides (ZIEGLER; LIM, 2007). Fenech et al. (2003, 2005) analisaram os índices de ingestão de vitaminas e minerais associados à instabilidade genômica, a partir de índices de indicadores de quebra cromossômica (MN). Os resultados demonstraram que o aumento da ingestão de vitaminas, dentre elas o folato, está relacionado com uma redução significativa de frequência de MN.

1.4.2 Vitamina B12

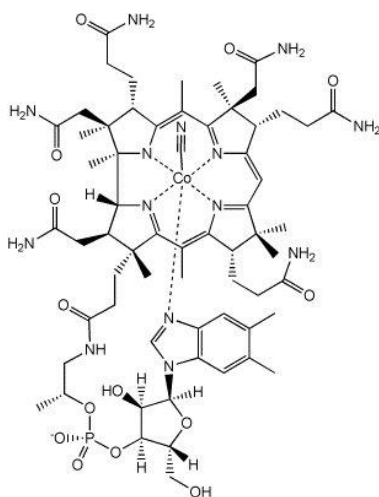


Figura 4: estrutura química da vitamina B12. Fonte: Katzung,1998.

A vitamina B12 (Figura 4) foi isolada no ano de 1948, sendo identificada como substância preventiva da “anemia perniciosa” (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010). Atua na metilação da homocisteína e participa da síntese de DNA, RNA, hemoglobina e em funções neurológicas (SHANE, 2000; AMES, 2001; DAHLIN et al., 2008). Ela interage intimamente com o folato no metabolismo de aminoácidos e DNA, e quando em deficiência ocorre menor capacidade das reações de metilação, podendo levar à elevação das taxas de lesões ao DNA (FENECH, 2001, 2002). Um estudo realizado por Fenech, Dreosti e Rinaldi (1997) em homens adultos australianos demonstrou que o aumento de Hcy e redução dos níveis de B12 plasmáticos, foram associados com um biomarcador de quebra cromossômica em células brancas do sangue. Quando ocorreu a complementação com ácido fólico e B12 o mesmo marcador foi minimizado.

Em estudo publicado em 2003, Zhang e colaboradores, associaram a diminuição do risco de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa com os altos níveis plasmáticos da vitamina B12. Da mesma forma Dahlin et al. (2008) encontraram que as concentrações de vitamina B12 foram inversamente associadas ao risco de câncer retal (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010).

As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, sendo estes encontrados em muitos alimentos. Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função. Dentre os antioxidantes estão a vitamina C, a glutathiona, o ácido úrico, a vitamina E e os carotenóides (SHAMI; MOREIRA, 2004; MORAES; COLLA, 2006).

1.4.3 Vitamina C

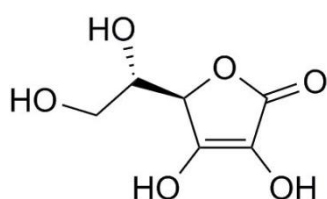


Figura 5: estrutura química da vitamina C. Fonte: Katzung, 1998.

O termo vitamina C (Figura 5) é empregado para todos os compostos com atividade biológica do ácido ascórbico e de seus produtos oxidados. É um importante antioxidante hidrossolúvel, não sintetizado pelo organismo humano sendo adquirido por meio da dieta (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010) e por vezes é adicionado a produtos alimentares para inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos. A utilização terapêutica da vitamina C, em ensaios biológicos com animais, traz como benefícios o efeito protetor contra os danos causados pela exposição às radiações e medicamentos (MORAES; COLLA, 2006).

Possui funções como: doar elétrons, atuando como agente redutor/antioxidante, neutralizar substâncias carcinogênicas (STAHL; SIES, 1997 apud (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010); inibir a formação de metabólitos nitrosos, prevenir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade, que a torna aterogênica; regenerar a forma ativa da vitamina E (KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ et al., 2006).

Estudos epidemiológicos demonstram que uma dieta com vitamina C têm uma associação inversa, particularmente para câncer de estômago (JENAB et al., 2006), boca, esôfago, pulmão, pâncreas e colo do útero (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010). Em uma revisão de literatura, publicada em 2004, foi realizada uma metanálise que avaliou o risco relativo de câncer de mama em 26 publicações, de 1982 a 1997, evidenciou uma relação inversa entre o consumo de vitamina C e risco relativo deste tipo de neoplasia (PADILHA; PINHEIRO, 2004).

1.4.4 Vitamina E

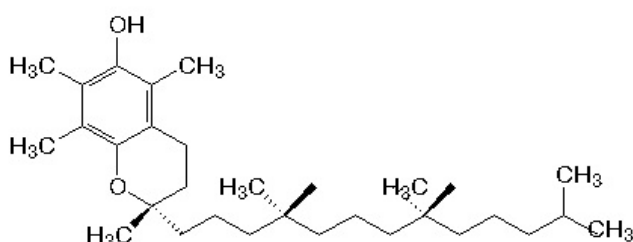


Figura 6: estrutura química da vitamina E. Fonte: Katzung, 1998.

A vitamina E (α -tocoferol, Figura 6) é um antioxidante não enzimático e lipossolúvel. Ela possui a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999 apud MORAES; COLLA 2006), conferindo importante proteção contra a peroxidação lipídica nas membranas celulares (STAHL; SIES, 1997), além de proteger as lipoproteínas de baixa densidade (THABET e CHAN, 2006).

Alguns estudos reportam os efeitos da vitamina E na estabilidade genômica e diminuição do risco de câncer. Stolzenberg-Solomon et al. (2009) constataram que altas concentrações de α -tocoferol promoveram uma diminuição de 48% no risco do câncer pancreático em homens finlandeses. Liang e colaboradores (2008) relataram redução do risco do câncer de bexiga, também associado com o aumento de α -tocoferol plasmático (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010). Tumores induzidos experimentalmente tiveram incidência reduzida após uso de Vitamina E (PADILHA; PINHEIRO, 2004). Souza e colaboradores (2003) informam que a ingestão de vitamina E em quantidades acima das recomendações correntes pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, melhorar a condição imune e modular condições degenerativas importantes associadas com envelhecimento.

1.5 Ensaio para detecção de danos genéticos: Testes do Micronúcleo

As análises de micronúcleos emergiram como um dos métodos preferidos para avaliação de danos cromossômicos, pois permitem medidas confiantes de perdas e rupturas cromossômicas (FENECH, 2000), quer em cultura de linfócitos como em células epiteliais (KIRSH-VOLDERS et al., 2006).

Os micronúcleos são compostos por fragmentos de cromossomos, ou cromossomos inteiros. São decorrentes dos erros e estes frutos de danos no DNA, ocorridos durante a divisão celular e refletem em uma distribuição desigual do material genético entre as células filhas (Figura 7). Esse material genético, se excluído ou não incorporado corretamente no núcleo da célula-filha, origina um núcleo de menores dimensões designado de micronúcleo (FENECH, 2002). Quando o

conteúdo dos MN são fragmentos cromossômicos, significa que ocorreu quebra na dupla fita de DNA, ou mesmo conversão de quebra de fita simples em de fita dupla de DNA. Já os MN formados por cromossomos inteiros, são originários de defeitos na maquinaria de segregação de cromossomos como falha no fuso mitótico (MATEUCA et al., 2006).

A formação de MNs pode ser interpretada como uma das formas de adaptação do organismo ao dano no material genético, gerado por agentes exógenos ou endógenos, mantendo a célula viável. Apesar da elevada frequência de MN ser em resposta à ação de agentes genotóxicos, sua ocorrência não deve ser apenas interpretada como um evento necessariamente negativo ligado à predição de transformação maligna, já que a técnica não permite avaliar a importância do material genético que os compõe. No entanto, ocorrendo exposição sucessiva a agentes genotóxicos a capacidade de reparo do organismo fatalmente será suplantada, o que pode levar a fenômenos degenerativos capazes de gerar morte celular ou danos cumulativos no sentido da transformação maligna (CARRARD et al., 2007).

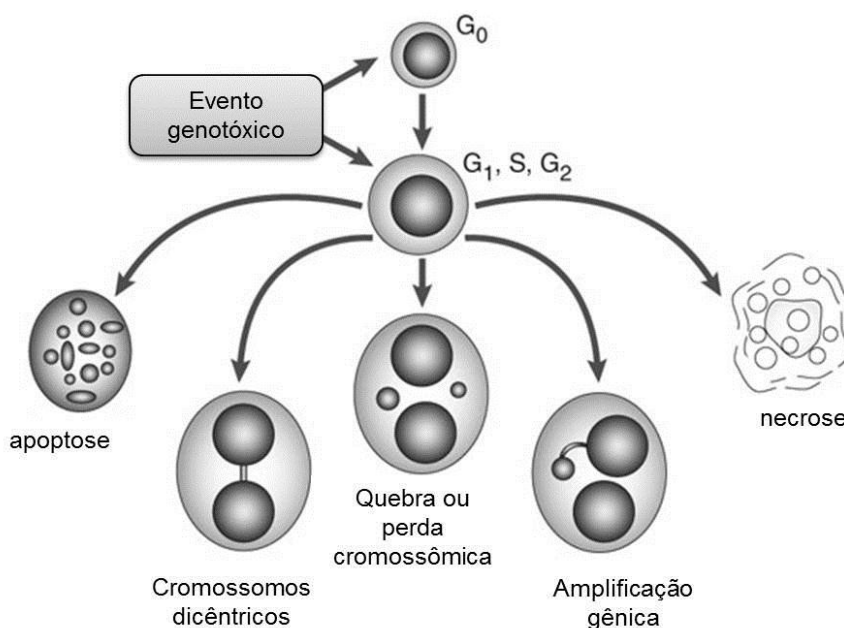


Figura 7: As possíveis respostas celulares frente à ação de agentes citotóxicos e genotóxicos no ensaio com bloqueio da citocinese. Fonte: Adaptado de Fenech, 2007.

1.5.1 Células esfoliadas da mucosa bucal

A citologia esfoliativa, a partir de raspado de mucosas, em relação às demais, é uma técnica simples, rápida, eficiente, econômica e de fácil reprodutibilidade, o que permite seu emprego em estudos em âmbito populacional (MAJER et al., 2001; AYYAD et al., 2006).

A mucosa bucal é constantemente alvo de substâncias tóxicas, sejam inaladas ou ingeridas, as quais podem ter efeito genotóxico, sendo assim, um dosímetro interno de danos teciduais (KARAHALIL et al., 1999 apud CARRARD et al., 2007). As células da mucosa bucal podem ser obtidas pela esfoliação/raspagem seja por espátulas, cytobrushes ou swabs. Utilizando este método de coleta, pode-se obter um alto número de células viáveis de forma não invasiva e bem tolerada pelo paciente (SARTO et al., 1987; CASARTELLI et al., 2000; CHEN et al., 2006).

O período de renovação do epitélio bucal é de aproximadamente 25 dias (SQUIER; FINKELSTEIN, 1998), então a formação de MNs deve ser considerada um dano citogenético agudo e local (SUHAS et al., 2004). Como os pacientes dialisados possuem um aumento de nove vezes na possibilidade de desenvolvimento de tumores na cavidade oral, é interessante a aplicação desse teste para monitoramento na gênese de neoplasias nesse grupo (TESCHNER et al. 2002 apud SCHUPP et al., 2008).

Diversos estudos comprovaram a eficiência do teste do MN em células esfoliadas e também sua grande aplicabilidade. O teste pode ser utilizado: para monitoramento de exposição a agentes potencialmente genotóxicos; em protocolos de quimioprevenção nas vias aéreas digestivas superiores; como indicador de danos citogenéticos em células do revestimento oral, brônquico e esofágico (CARVALHO et al., 2002; na avaliação citomorfológica direta na região afetada pelo agente estudado (AYYAD et al., 2006); como identificador de novos agentes ambientais tóxicos, informando a respeito da possibilidade de os mesmos serem genotóxicos.

No teste com células esfoliadas da mucosa bucal, além da análise na frequência de micronúcleos, podem ser identificadas outras alterações nucleares chamadas de

metanucleares (Figura 8). Elas representam fenômenos celulares degenerativos e/ou adaptativos próprios do tecido epitelial e segundo Tolbert; Shy e Allen (1992) precisam ser levadas em conta, já que estão relacionadas à morte celular e por vezes apresentam uma relação inversa em relação aos MNs (RAMIREZ; SALDANHA, 2002).

As alterações descritas por Tolbert; Shy e Allen (1992) são as seguintes:

- ✓ Cromatina condensada/núcleo picnótico – Correspondem ao aumento de intensidade da coloração do núcleo e redução de volume respectivamente.

- ✓ Células binucleadas (BN) - células apresentando dois núcleos. Provavelmente não relacionadas a alterações do DNA, mas parecem estar envolvidas com atraso da divisão celular.

- ✓ Cariorrexe - Fragmentação do núcleo em pequenos corpos arredondados ou ovalados dentro do citoplasma intacto. Estão em número variável, surgindo como pontos negros ou formações alongadas, inteiramente separadas umas das outras ou ligadas por uma tênue linha de cromatina.

- ✓ Cariólise - Dissolução do núcleo caracterizada pela sua ausência. Etapa do processo de morte celular por necrose.

- ✓ Brotos nucleares/protusões “*broken egg*” (BE) – Corpos arredondados, contendo pequena quantidade de material genético, ligados ao núcleo por um filamento de cromatina.

Outra situação de defesa celular contra o dano genético é a apoptose. A apoptose é um processo geneticamente controlado de morte celular, que elimina células não mais necessárias ao organismo, ou em resposta à injúria genotóxica (SCHULTE-HERMANN et al., 2000; MILLER et al., 2002). Este processo tem, assim, papel essencial como mecanismo de proteção contra a carcinogênese por eliminar células geneticamente danificadas (ROY et al., 2003), já que o desenvolvimento de um tumor maligno envolve uma quebra no balanço entre a proliferação celular e a morte por apoptose. Além disso, a frequência aumentada de alterações celulares relacionadas à apoptose é indicativa de genotoxicidade (MEIRELES et al., 2006) e a análise dessas alterações tem se mostrado mais efetiva do que a análise de

micronúcleos na mucosa bucal (CELIK et al., 2003; CERQUEIRA et al., 2004; FREITAS et al., 2005). A apoptose é inferida pelo somatório de cariorréxis, cromatina condensada e picnose (SOUTO 2008).

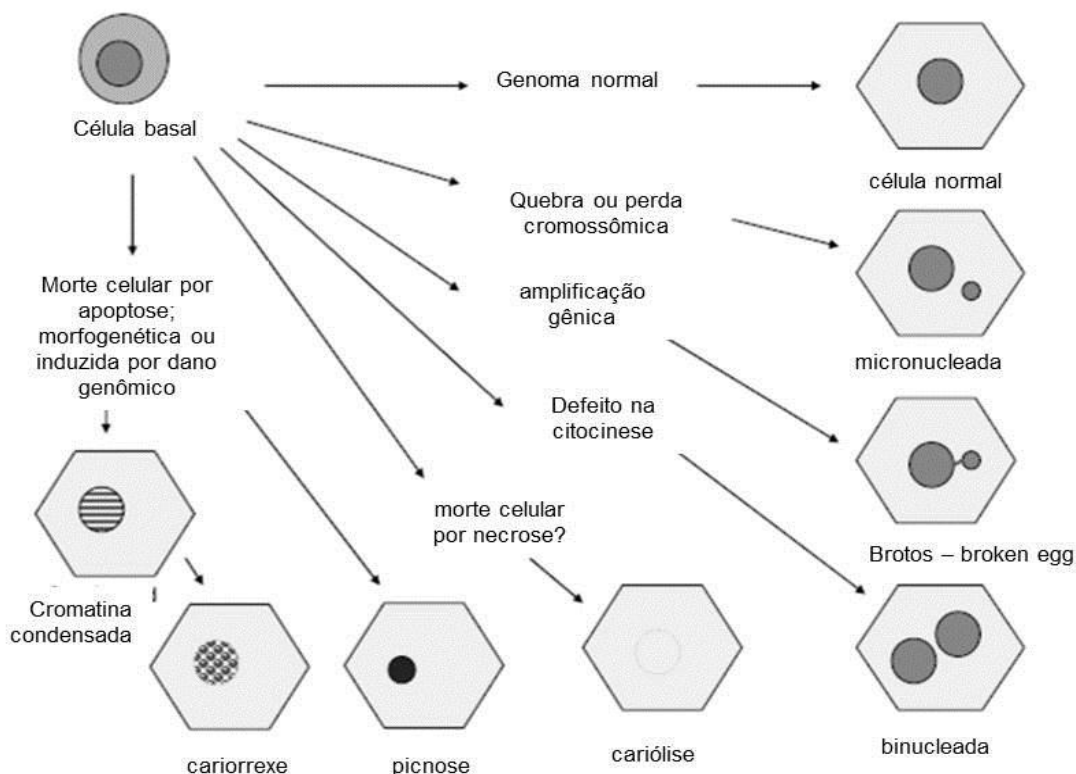


Figura 8: Representação dos vários tipos celulares analisados no ensaio com células esfoliadas da mucosa bucal. Fonte: Adaptado de Migliore et al., 2011.

1.5.2 Cultura de Células com Bloqueio da Citocinese (CBMN)

O ensaio de micronúcleo *in vitro* mais utilizado é o teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese. Esse ensaio é considerado um teste sensível, simples e de fácil análise das células (MILLER et al., 1998), o qual permite uma identificação confiável de células que tenham concluído somente uma divisão nuclear. Além disso, essa técnica permitiu a exploração de novos parâmetros de genotoxicidade e cinética de divisão celular como índice de divisão nuclear (IDN); pontes

nucleoplasmáticas (PNP) brotos nucleares; detecção de perdas cromossômicas ou elementos de não disjunção, dentre outros.

O teste CBMN em linfócitos humanos foi desenvolvido por Fenech e Morley (1985) e usa a citocalasina-B (Cito-B) como inibidor da citocinese, produzindo células binucleadas (FENECH, 2000; THOMAS et al., 2003). Muitos estudos testaram se há uma indução de MN dose-dependente ao uso da Cito-B, e não foi encontrada essa relação para as células que normalmente são usadas (fibroblastos, linfócitos humanos e de roedores para concentrações 1-6 μ g/mL de meio de cultura (FENECH, 1997).

Fenech e Morley (1985) afirmam que a desvantagem do ensaio CBMN é de restringir a utilização da técnica a populações de células que estejam em divisão, ou seja, não pode ser aplicado em culturas de tecido muscular e cerebral. Essa afirmação se deve ao fato de que as células só podem expressar tais danos no DNA, como o MN, se for completado pelo menos um evento de ciclo celular. Além dessa observação, também relatam que a frequência de MN diminui quando as células realizam mais que uma divisão após sofrerem o dano no DNA e por este fato, uma comparação de frequência de MN entre populações celulares somente é confiável, a menos que a cinética da divisão celular seja mantida de forma idêntica após a injúria ao material genético. Sendo assim, o MN é registrado apenas nas células que se dividiram uma única vez.

Fenech (2000) detalhou a técnica de MN *in vitro*, descrevendo os critérios para a seleção de células binucleadas e os parâmetros nelas avaliados.

Segundo o autor, para selecionar as células binucleadas elas devem apresentar membrana celular intacta; os núcleos devem estar dentro do limite citoplasmático; os dois núcleos devem apresentar tamanhos semelhantes; o citoplasma deve estar intacto e distinto do citoplasma das células vizinhas; e os núcleos não devem estar sobrepostos;

Os critérios para Análise de micronúcleos em células binucleadas são: o tamanho do MN pode variar de 1/16 a 1/3 do tamanho do núcleo principal; devem possuir formato arredondado ou oval; não serem refringentes; não estarem ligados ao

núcleo principal; podem tocar o(s) núcleo(s); devem apresentar a mesma coloração do núcleo principal ou, eventualmente mais intensa.

Para análise de pontes nucleoplasmáticas elas devem ser ligações contínuas entre os 2 núcleos, com diâmetro que não ultrapasse $\frac{1}{4}$ do diâmetro do núcleo principal; devem apresentar a mesma coloração do núcleo principal;

As pontes nucleoplasmáticas são originadas na anáfase, durante a migração de cromossomos dicêntricos nos quais os centrômeros são puxados para pólos opostos da célula (Figura 9). Podem indicar uma falha no reparo do DNA, a ocorrência de rearranjos cromossômicos ou fusão de telômeros. A visualização das pontes é difícil, já que as células rapidamente terminam as etapas da anáfase e telófase, chegando à citocinese onde geralmente ocorre ruptura da ponte nucleoplasmática. Com a utilização do ensaio CBMN é possível a visualização da PNP durante a intérfase.

Os brotos ou protusões nucleares representam material genético amplificado (Figura 10), visualizado na periferia do núcleo e em associação com este por meio de uma conexão nucleoplasmática. A gênese da formação de protusões nucleares e de micronúcleos é muito próxima e existe a possibilidade do broto desintegrar-se do núcleo e formar um micronúcleo (LADEIRA, 2009)

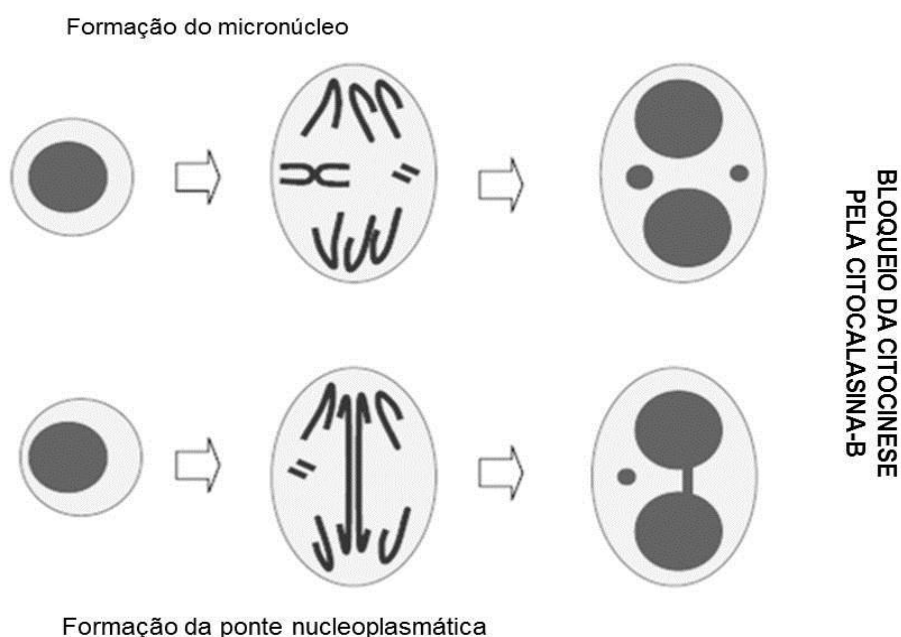


Figura 9: Visualização das pontes nucleoplasmáticas e micronúcleos pelo ensaio com bloqueio da citocinese. Fonte: Fenech et al., 2011.

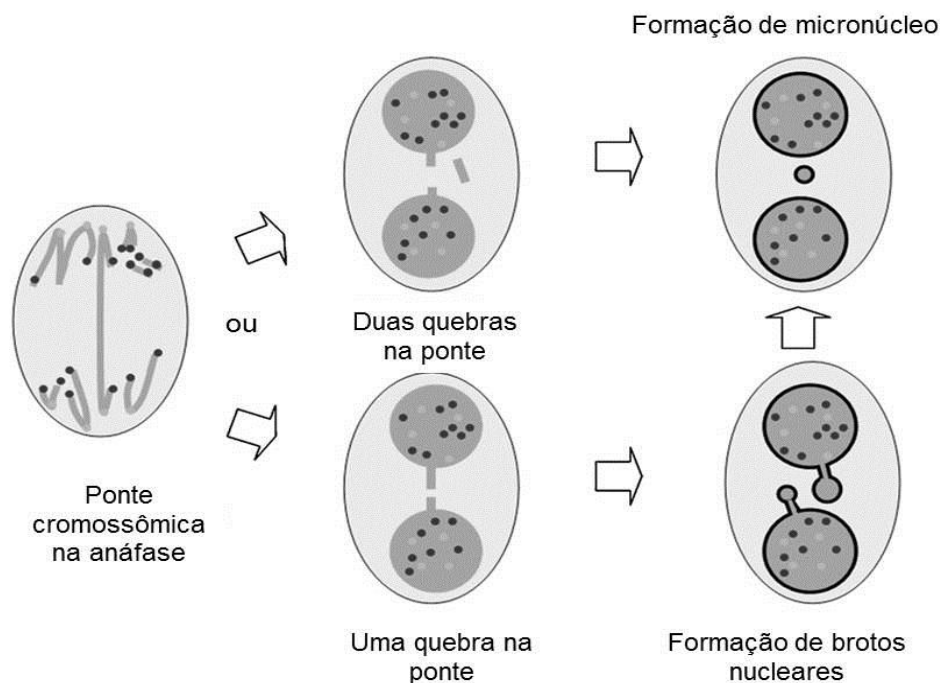


Figura 10: Formação do micronúcleo e de brotos nucleares a partir de rupturas nas pontes nucleoplasmáticas. Fonte: Lindberg et al., 2007.

1.6 Hipótese

De acordo com os dados que apontam a existência de níveis elevados de homocisteína e estresse oxidativo nos pacientes renais crônicos que realizam tratamento por hemodiálise, este trabalho testou por meio do ensaio do micronúcleo, a hipótese de que a suplementação vitamínica (ácido fólico, vitaminas B12, C e E) seja capaz de reduzir a frequência de danos genômicos nesses pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a contribuição da suplementação vitamínica por ácido fólico e vitaminas B12, C e E para a redução de danos genômicos, em pacientes submetidos à hemodiálise.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a frequência de brotos, pontes nucleoplasmáticas, micronúcleos e o índice de divisão nuclear, em linfócitos de pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise, antes e após a suplementação vitamínica por ácido fólico e vitaminas E, C e B12, por meio do teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese;
- Analisar a frequência de células binucleadas e as mononucleadas com micronúcleo, *broken egg*, em apoptose e cariólise ocorridos em pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise, antes e após a suplementação vitamínica por ácido fólico e vitaminas E, C e B12, por meio do teste de micronúcleos em células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal;
- Comparar os resultados obtidos, quanto à redução dos danos ao DNA, nos dois diferentes períodos de suplementação vitamínica (um mês e dois meses);
- Correlacionar os resultados obtidos nos dois ensaios utilizados;
- Avaliar a possível relação entre o gênero dos pacientes e a resposta à suplementação vitamínica, quanto à redução dos danos genômicos.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações Éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Centro de Ciências da Saúde da UFES, sob número de protocolo 058/11, assim como do Comitê de Ética do Vitoria Apart Hospital (COMEP/VAH) protocolo 2.02.001/2010.

Os participantes aderiram de forma voluntária ao projeto e suas identidades e dados foram mantidos em anonimato.

3.2 Procedimento experimental

Foram utilizadas um total de 48 amostras de sangue, e 48 amostras de células bucais em todo experimento, referente a 1 amostra de cada paciente para compor o T0 (16 amostras após um mês sem receber qualquer tipo de suplementação vitamínica) e para T1 e T2 (32 amostras) referentes a 2 coletas de cada indivíduo com um e dois meses de suplementação respectivamente, para cada ensaio.

As vitaminas foram manipuladas segundo as concentrações das disponibilizadas pelo SUS, e recomendação da nefrologista. Elas foram fornecidas aos pacientes por dois meses, sendo que as doses diárias utilizadas foram: 500 mg de Vitamina C, 120 mg de Vitamina E, 5 mg de Ácido Fólico e 5 µg de vitamina B12. Orientamos para que fossem ingeridas na parte da manhã, e nos dias de hemodiálise somente após o procedimento.

3.3 Seleção dos Voluntários

Foi feito um esclarecimento do objetivo e proposta do projeto para todos os pacientes e somente após consentimento formal, foi aplicado o questionário de saúde pessoal (APÊNDICE A), conforme protocolo publicado pela Comissão Internacional para Proteção Ambiental a Mutágenos e Carcinógenos (1988). A partir deste, foram obtidas informações quanto à exposição ocupacional, hábitos e dieta para inclusão como voluntário da pesquisa.

Após assinatura do Termo de Consentimento livre e Esclarecido (APÊNDICE B) pelos indivíduos e/ou responsáveis e preenchimento do questionário de saúde pessoal, deu-se início ao procedimento experimental.

O grupo experimental foi composto por 16 voluntários, de ambos os gêneros, os quais possuem diagnóstico de insuficiência renal crônica e que são atendidos pelo Instituto Capixaba do Rim, localizado no Vitória Apart Hospital, Serra – Espírito Santo, Brasil. Os pacientes renais crônicos estavam em um programa de hemodiálise de 3 vezes por semana com duração de 4 horas (12h semanais), e efetuavam a diálise conforme a sua prescrição individual. Todos os pacientes da amostra não estiveram com qualquer processo infeccioso ou inflamatório, e não foram expostos nos últimos seis meses à radiações.

A identidade dos voluntários foi mantida em sigilo, de forma que a cada coleta os voluntários recebiam de forma aleatória códigos para identificação do material e não associação com o paciente.

3.4 Coleta das amostras biológicas

Todo material utilizado para coleta das amostras era descartável, seguindo diretrizes de biossegurança.

De cada paciente foram coletados 2 tipos de materiais biológicos: sangue periférico e células epiteliais da mucosa bucal. Os materiais foram coletados no mesmo dia, antes do início da hemodiálise, no Vitória Apart Hospital.

A amostra sanguínea foi retirada, pela equipe de enfermagem que os assistem, por meio das fístulas, sem que houvesse necessidade de uma perfuração adicional. O volume da amostra foi de 5 mL, coletado em seringas contendo o anticoagulante heparina. As células epiteliais bucais foram coletadas, esfoliadas, pelo autor do trabalho.

Realizou-se 3 coletas por voluntário, sendo uma após um mês sem qualquer suplementação vitamínica, e as demais após início do tratamento vitamínico precisamente na 4^a e 8^a semanas.

As amostras foram transportadas acondicionadas para o Laboratório de Genética Toxicológica e Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.5 Células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal

Antes da esfoliação, cada voluntário realizou um bochecho com água para remoção de resíduos da cavidade oral. Os tubos falcon foram previamente codificados e preenchidos com 5 mL de solução salina (0,9% de NaCl). A coleta foi realizada com auxílio de um Swab descartável que foi umedecido na solução salina e passado em cada sítio de coleta com movimentos circulares. Os sítios de coleta das amostras celulares estavam livres de alterações tais como ulcerações ou outras lesões.

O método utilizado foi segundo Tolbert et al. (1992) com modificações.

Primeiramente o material foi centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado deixando 0,5 mL no tubo, obtendo-se dessa forma um precipitado com alta concentração de células esfoliadas. Adicionou-se 2 mL de solução salina e ressuspendeu-se o material, que foi centrifugado repetindo o

procedimento anterior 2 vezes e deixando um volume de 0,5 mL no tubo para confecção das lâminas.

As lâminas limpas com álcool 70% e identificadas foram pré-aquecidas no bico de bunsen. O ressuspenso foi gotejado sobre as lâminas para a realização do esfregaço e posteriormente, as lâminas secaram em temperatura ambiente. O material foi fixado em metanol P.A. por 20 min no freezer. Após fixação e secagem das lâminas por no mínimo 2h, elas foram coradas com Leishman puro durante 2 minutos e sequencialmente por 15 minutos com diluição de 1:10 em água destilada.

3.6 Cultura de Células com Bloqueio da Citocinese - CBMN

O ensaio do micronúcleo em linfócitos humanos cultivados foi conduzido segundo metodologia de Fenech e Morley (1985), com modificações, conforme se segue:

Foram adicionados aos frascos de cultura estéreis 5,0 mL de meio RPMI 1640 suplementado com o antibiótico gentamicina (50 mg/L), 1,0 mL de soro bovino fetal, 0,2 mL de fitohemaglutinina, 10 μ L de L-glutamina, 1,0 mL de sangue (30 gotas). Os frascos, devidamente identificados, foram vedados e acondicionados em banho-maria por 72 horas, à temperatura de 37°C. Após 44 horas de cultura, adicionou-se citocalasina-B (6 μ g/mL de meio de cultura) a cada frasco para bloqueio da citocinese, garantindo apenas uma divisão nuclear. Os frascos retornaram para a incubadora até completar 72 horas.

O material foi transferido para tubos falcon identificados e centrifugado (800 rpm, 5 min). Posteriormente foi descartado o sobrenadante deixando 2 mL de material nos tubos. Adicionou-se 5 mL de solução hipotônica (citrato de sódio 1%) ressuspenso e deixando em temperatura ambiente por 5 minutos. Sequencialmente foi adicionada uma gota de formol para que a hipotonização fosse interrompida. O material foi centrifugado e descartado o sobrenadante. A fixação foi realizada com solução Carnoy (metanol:ácido acético; 3:1) durante 30 minutos na geladeira. Após fixação, foi realizada centrifugação, descarte e adição de solução

fixadora até limpeza do material e que ficasse transparente no tubo para confecção das lâminas. As lâminas foram previamente lavadas e imersas em água destilada gelada. O material foi gotejado nas lâminas as quais secaram overnight, para coloração. Esta, foi realizada durante 10 minutos com Giemsa diluído em tampão Sorensen pH 6,8, na proporção 1:30.

3.7 Análise citológica e microscópica

De cada paciente foram retiradas 3 amostras para cada ensaio. De cada amostra de sangue foram realizadas 2 culturas e delas foram elaboradas 6 lâminas por paciente. Das amostras bucais, de cada sítio de coleta (bochecha), foram confeccionadas 2 lâminas, num total de 4 lâminas/paciente/amostra.

De cada amostra/paciente foram contabilizadas 2000 células em ambos ensaios, portadoras ou não de micronúcleos e demais alterações nucleares, com citoplasma bem preservado.

Desta forma foi computado um total de 192.000 células para os dois ensaios, para cada técnica 32.000 para o grupo T0, e 64.000 células para T1 e T2.

No ensaio CBMN foram avaliados índice de divisão nuclear e células binucleadas portadoras de pontes nucleoplasmáticas, brotos (protusões nucleares) e micronúcleos. A análise foi realizada segundo a descrição de Fenech (2000). Como na metodologia do ensaio se faz a utilização de solução hipotônica, parâmetros como apoptose e necrose, em linfócitos, não foram considerados, neste estudo.

O índice de divisão nuclear é um parâmetro para avaliação da citotoxicidade em linfócitos pelo teste CBMN. O cálculo foi realizado segundo Eastmond e Tucker (1989), em que MI – MIV representa o número de linfócitos com 1 a 4 núcleos e N é o número total de células viáveis (neste caso 500 células):

$$\text{IDN} = \frac{\text{MI} + 2 (\text{MII}) + 3 (\text{MIII}) + 4(\text{MIV})}{\text{N}}$$

Já na técnica de micronúcleo em células da mucosa bucal foram avaliados micronúcleos, apoptose (cariorrexe, picnose e cromatina condensada), cariólise, broken eggs e células binucleadas. Os micronúcleos foram analisados conforme os critérios estabelecidos por Sarto et al. (1987) como um parâmetro de genotoxicidade. Para a análise das alterações broken eggs, buds, picnose, cariorréxe e cariólise foram utilizados os critérios descritos por Tolbert et al. (1992).

A análise das células para ambos ensaios foi realizada por microscopia de luz em teste cego, utilizando objetivas de 40x para as células da mucosa bucal e de 100x para análise dos linfócitos.

3.8 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software ASSISTAT 7,6 e teste não paramétrico Mann-Whitney, considerando um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

A investigação dos efeitos da suplementação com Vitaminas C, E, B12 e ácido fólico foi realizada por meio do ensaio do micronúcleo em dois diferentes tipos celulares, linfócitos e células da mucosa bucal. Os voluntários da pesquisa, pacientes renais crônicos que realizavam hemodiálise, forneceram amostras biológicas antes da suplementação vitamínica e ao completarem um mês e dois meses de tratamento.

Foi um total de 16 participantes sendo 7 homens e 9 mulheres, sendo a idade média do grupo foi $51,93 \pm 13,4$ anos. A metade deles tinha como doença de base a Nefropatia Diabética e os outros 50% Nefroesclerose Hipertensiva.

4.1 Cultura de Células com Bloqueio da Citocinese

No ensaio com linfócitos foram contabilizadas células binucleadas portadoras de pontes nucleoplasmáticas, micronúcleos e brotos. Além disso, foi calculado o Índice de divisão nuclear (IDN), para avaliação da citotoxicidade analisando células mono, bi, tri e tetranucleadas em 500 linfócitos viáveis.

O resultado desse cálculo (Figura 11) nos linfócitos dos pacientes (homens+mulheres) demonstra que a proporção celular aumentou durante o tratamento com suplementação vitamínica, ou seja, houve redução da citotoxicidade existente antes da suplementação.

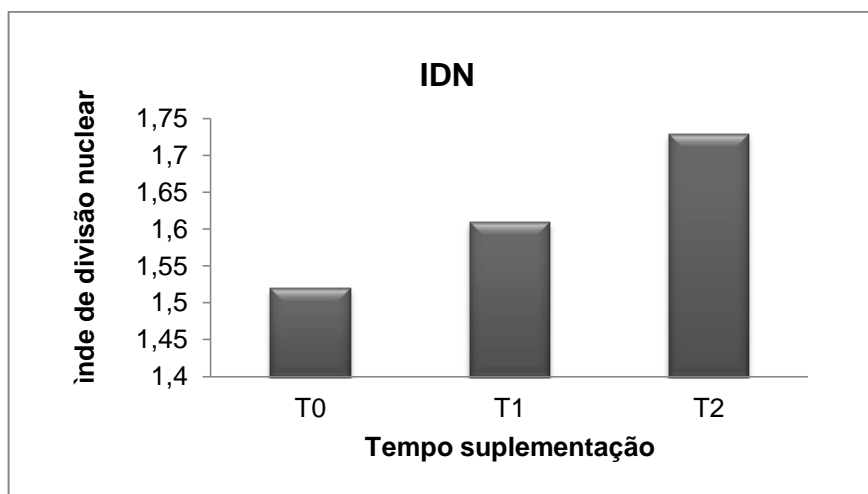


Figura 11: Média dos pacientes como único grupo quanto à citotoxicidade durante o tratamento vitamínico nos tempos distintos: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação).

A análise da frequência de pontes nucleoplasmáticas (figura 12), combinando-se os gêneros, não apresentou diferença significativa entre o período anterior à suplementação e os períodos durante o tratamento vitamínico, no entanto, foi observada uma tendência de redução da alteração nuclear avaliada.

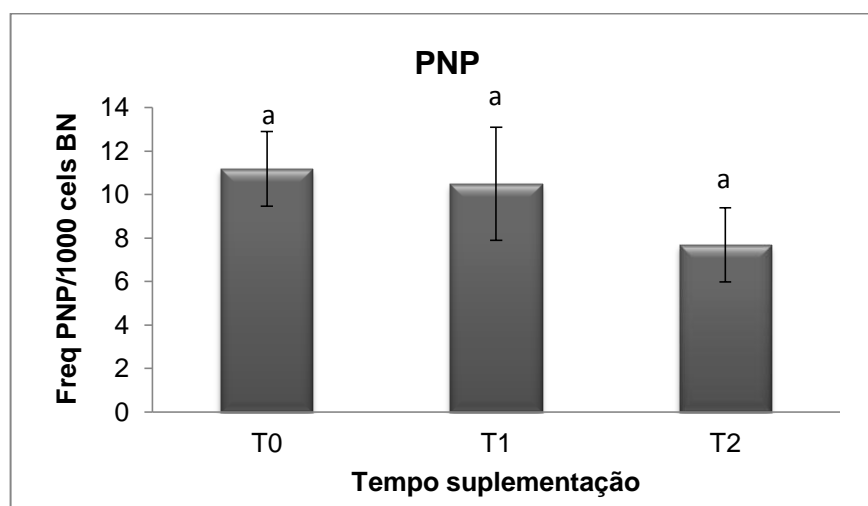


Figura 12: Frequência de ponte nucleoplasmática em 1000 linfócitos binucleados (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Houve, na análise de micronúcleos (Figura 13) uma redução gradual de sua frequência durante os meses de utilização vitamínica. A comparação entre os tempos T0 e T1, antes e um mês de suplementação respectivamente, apresentou diferença estatística, assim como, entre T0 e T2 (após dois meses). Porém

comparando-se as frequências de MN em T1 e T2, a redução não foi significativa ($P < 0,05$).

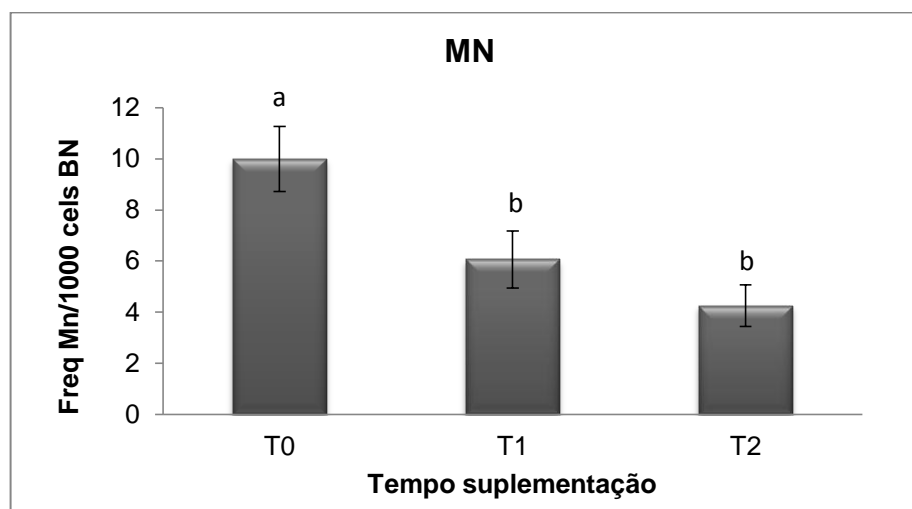


Figura 13: Frequência de micronúcleos em 1000 linfócitos binucleados (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Os pacientes, quando analisados como um único grupo, não apresentaram diferença estatística na frequência de brotos em linfócitos binucleados (Figura 14), entre os distintos tempos de tratamento (T1 e T2) e deles em relação ao período anterior a suplementação (T0).

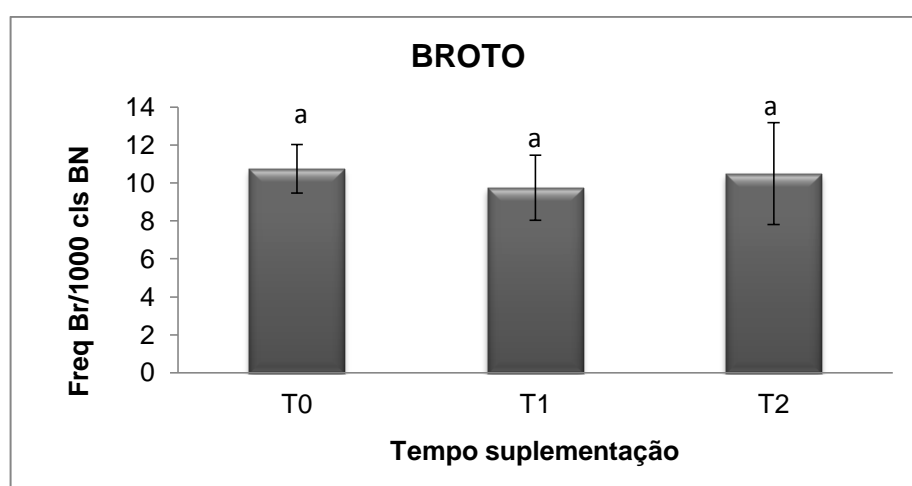


Figura 14: Frequência de brotos em 1000 linfócitos binucleados (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Quando o IDN foi analisado, considerando-se os sexos separadamente (Figura 15), foi observado que o aumento desse índice foi mais evidente no grupo formado por mulheres, apesar de ambos demonstrarem redução de citotoxicidade nos linfócitos nos pacientes.

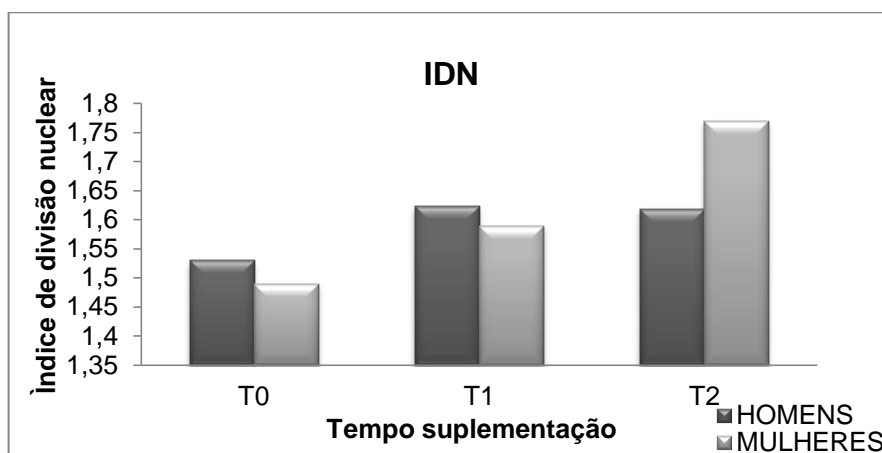


Figura 15: Comportamento de cada gênero quanto à citotoxicidade durante o tratamento vitamínico nos tempos distintos. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); $P > 0,05$.

A Figura 16 mostra a resposta de cada gênero ao tratamento, na análise de pontes nucleoplasmática. Não houveram diferenças significativas em ambos os grupos, porém observou-se uma tendência de redução na frequência dessa alteração no grupo dos homens e das mulheres em T2.

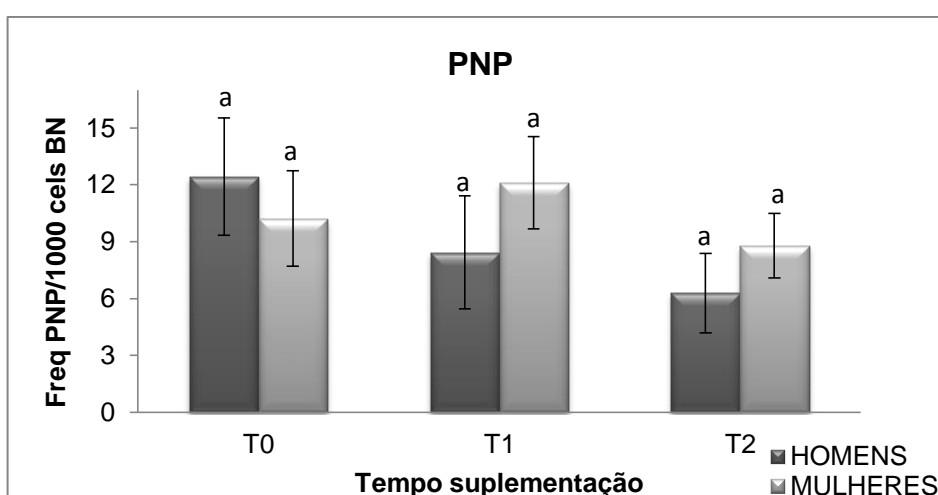


Figura 16: Frequência de ponte nucleoplasmática em 1000 linfócitos binucleados (média \pm EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Na análise de micronúcleo pareando o comportamento dos gêneros em resposta à suplementação (Figura17), os homens tiveram redução significativa entre a frequência basal e o primeiro e segundo meses de suplementação. Porém não houve diferença estatística entre os meses de utilização das vitaminas. Já o grupo composto por mulheres, em todas as comparações, não apresentou diferença estatística apesar de demonstrar tendência à redução na frequência de células micronucleadas.

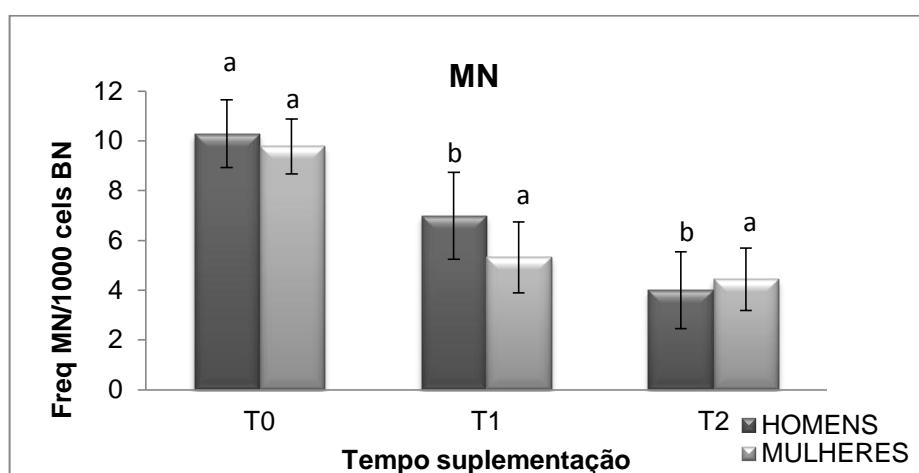


Figura 17: Frequência de micronúcleo em 1000 linfócitos binucleados (média ± EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

A frequência de células binucleadas portadoras de broto (Figura 18) no grupo dos homens apresentou uma diminuição não significativa no primeiro mês, porém com diferença estatística entre o período anterior à suplementação e após dois meses de tratamento. O mesmo não foi observado entre as mulheres. Neste grupo houve uma tendência, mesmo que sutil, de aumento na frequência de brotos, sem diferença estatística.

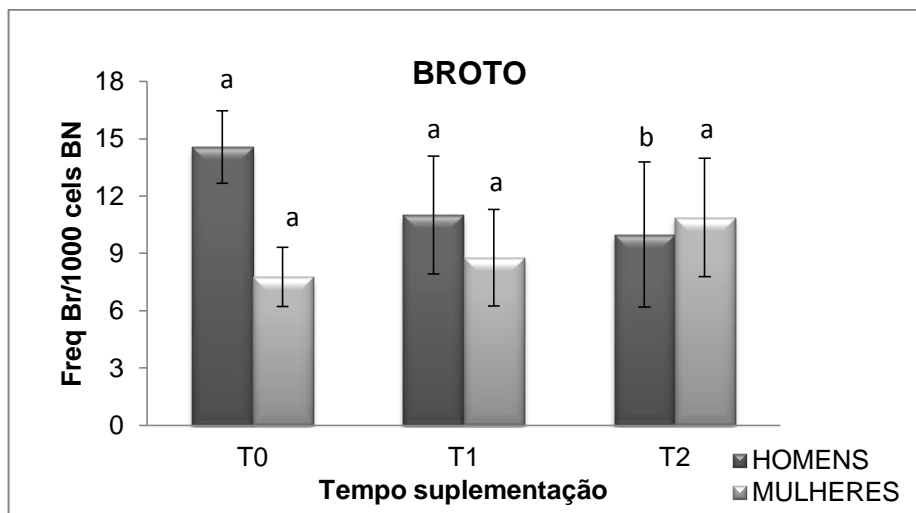


Figura 18: Frequência de brotos em 1000 linfócitos binucleados (média \pm EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Tabela 1 – Resultado da Análise de linfócitos.

Linfócitos	Homens+mulheres			Homens			Mulheres		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
IDN	-	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	↑
PNP	-	=	↓	-	↓	↓	-	↑	↓
MN	-	↓*	↓*	-	↓*	↓*	-	↓	↓
BROTO	-	=	=	-	↓	↓*	-	=	↑

* significância estatística $P > 0,05$. = sem variação. ↑ aumento. ↓ redução.
 IDN – Índice de Divisão Nuclear. PNP – Pontes nucleoplasmáticas. MN – micronúcleo.

4.2 Células epiteliais da mucosa bucal

Nas células esfoliadas da mucosa bucal foram analisadas células binucleadas e as mononucleadas portadoras de *broken egg*, micronúcleo, apoptose (somatório de picnose, cromatina condensada e cariorrexe) e cariólise.

A frequência de células binucleadas foi reduzida (Figura 19) de maneira significativa do período anterior ao tratamento vitamínico em relação ao primeiro mês (T1), e este não diferiu do segundo mês, mas houve manutenção da redução, com diferença estatística, de T2 em relação à T0.

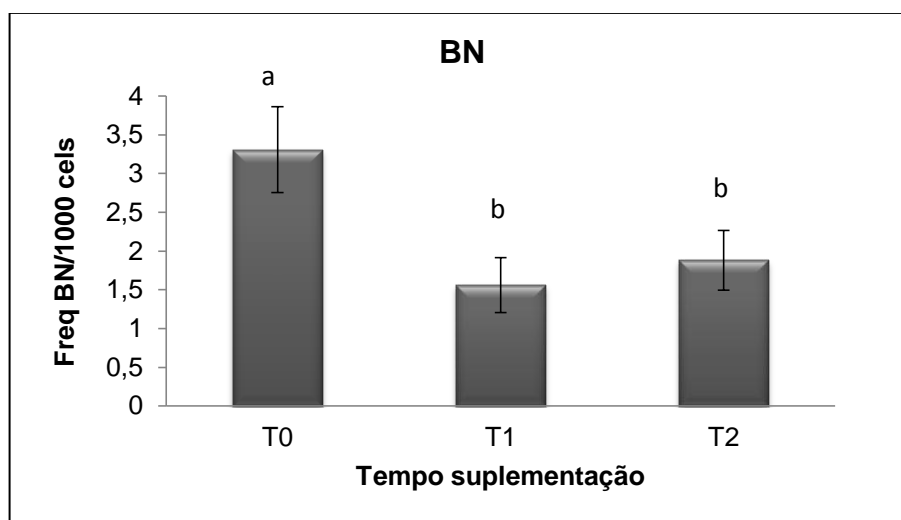


Figura 19: Frequência de células binucleadas em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

O resultado da comparação de *broken egg* (Figura 20) entre os períodos demonstra que, apesar de haver uma tendência de redução dessa alteração metanuclear, não houve significância estatística.

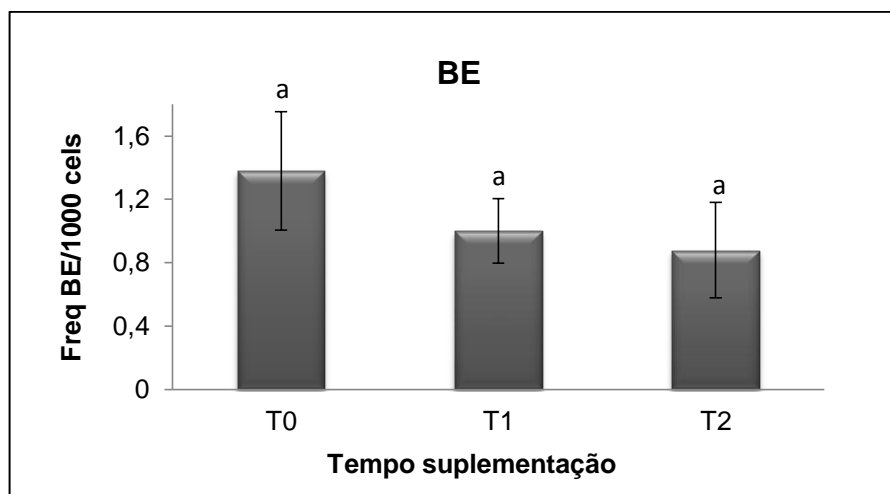


Figura 20: Frequência de *broken egg* em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

A frequência de células micronucleadas na mucosa bucal (Figura 21) também diminuiu após início da suplementação vitamínica, sem diferença estatística quando os pacientes foram analisados como um único grupo.

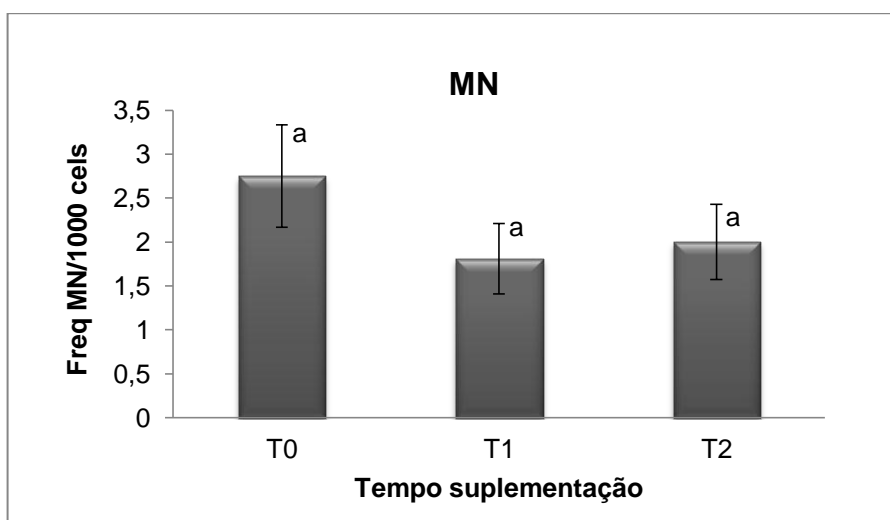


Figura 21: Frequência de micronúcleo em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Ao comparar o comportamento do grupo quanto à frequência de apoptose nas células bucais (Figura 22), observou-se uma redução significativa após o primeiro mês de suplementação, mantendo-se estatisticamente diferente com o resultado encontrado após dois meses de tratamento.

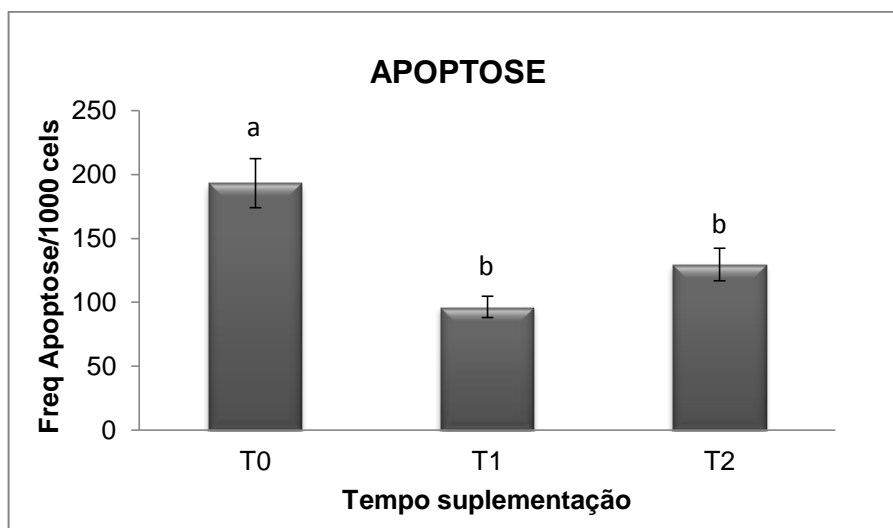


Figura 22: Frequência de apoptose em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Houve uma pequena redução na frequência de cariólise não apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) nas três comparações (T0-T1, T0-T2 e T1-T2) (Figura 23).

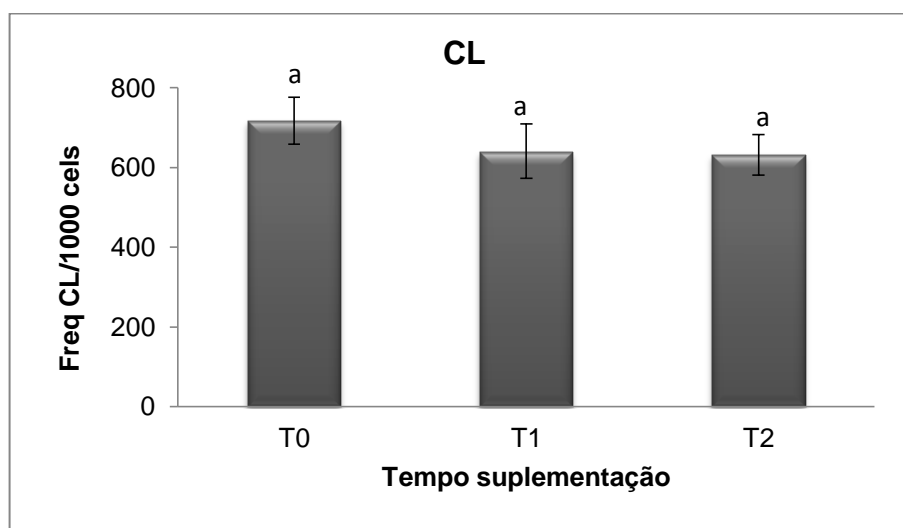


Figura 23: Frequência de cariólise em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comportamento do grupo de pacientes ao tratamento vitamínico nos tempos distintos: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Na análise de células binucleadas com a separação dos pacientes pelo gênero (Figura 24) observou-se que, no grupo dos homens, houve uma redução estatisticamente significativa após o primeiro mês (T1) de suplementação a qual foi mantida também após o segundo mês. Nas mulheres a redução não foi significativa.

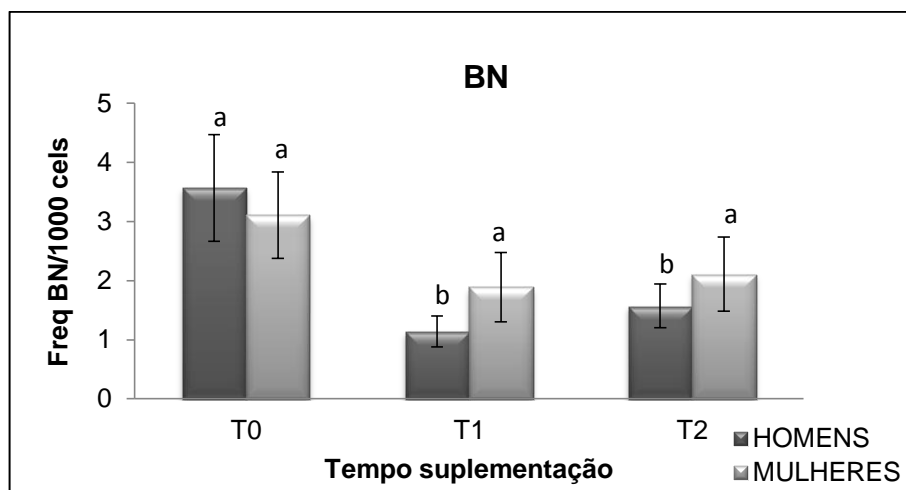


Figura 24: Frequência de células binucleadas em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

O comportamento do grupo composto por mulheres (Figura 25), durante o tratamento com as vitaminas, foi de pequena tendência à redução na frequência de BE, sem apresentar diferença significativa. Já nos homens, a frequência dessa alteração foi reduzida tanto no primeiro como no segundo mês de suplementação de modo significativo. A redução se manteve significativa, ao comparar T2 em relação à T1.

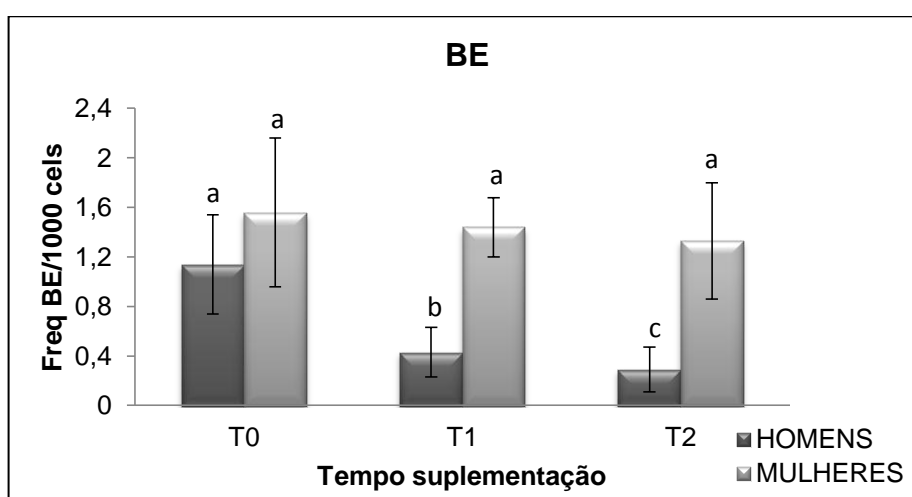


Figura 25: Frequência de *broken egg* em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

A frequência de micronúcleos foi reduzida em ambos os gêneros (Figura 26), com maior proporção no primeiro mês, e durante o segundo mês verificou-se uma elevação dessa frequência. Não houve significância estatística em todas análises, tanto nos homens e quanto nas mulheres.

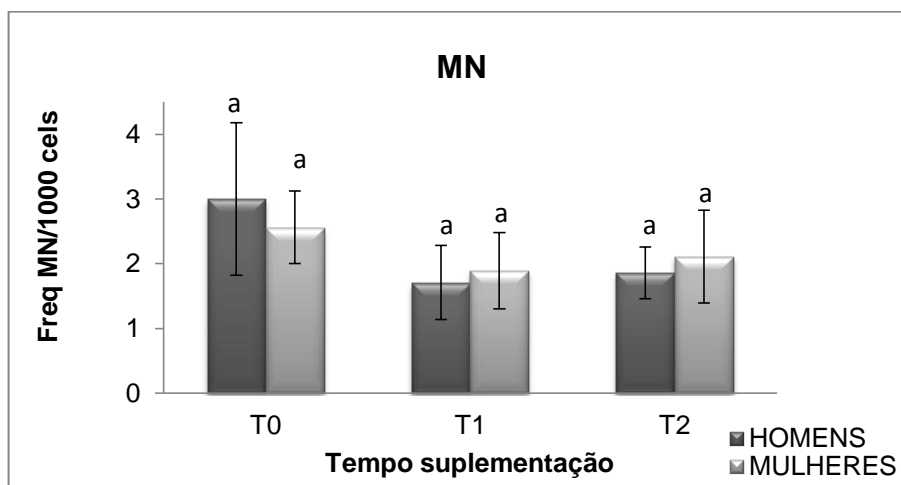


Figura 26: Frequência de Micronúcleo em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

O resultado da análise de apoptose (Figura 27) demonstra uma diminuição significativa após um mês de suplementação no grupo composto por homens, e essa se manteve no segundo mês, não diferindo entre os meses T1 e T2, porém mantendo menor que o T0. Já no grupo das mulheres, a redução em T1 foi estatisticamente significativa, porém em relação a T2 este não diferiu nem de T0 nem de T1.

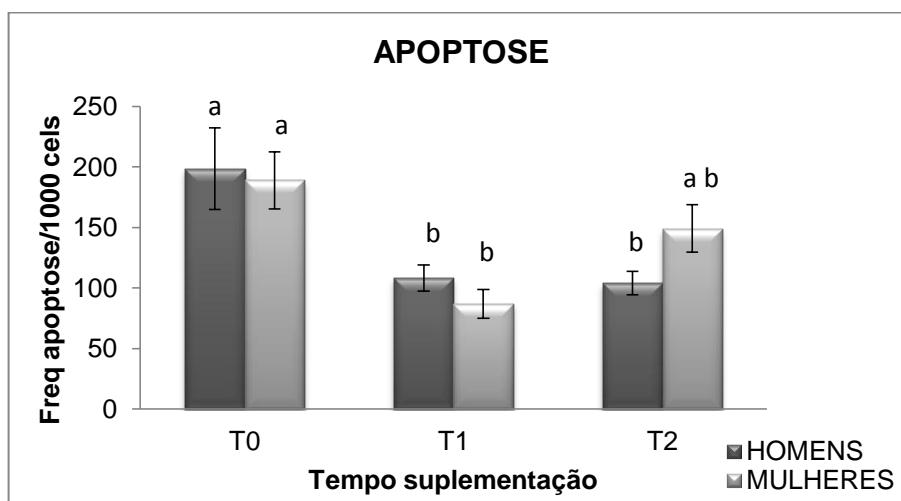


Figura 27: Frequência de apoptose em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico: T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

A cariólise, quando analisada em cada gênero (Figura 28), foi reduzida nos homens no primeiro mês e as mulheres não tiveram uma redução em relação à T1, mas sim em relação à T2. Ambas as observações não tiveram significância estatística.

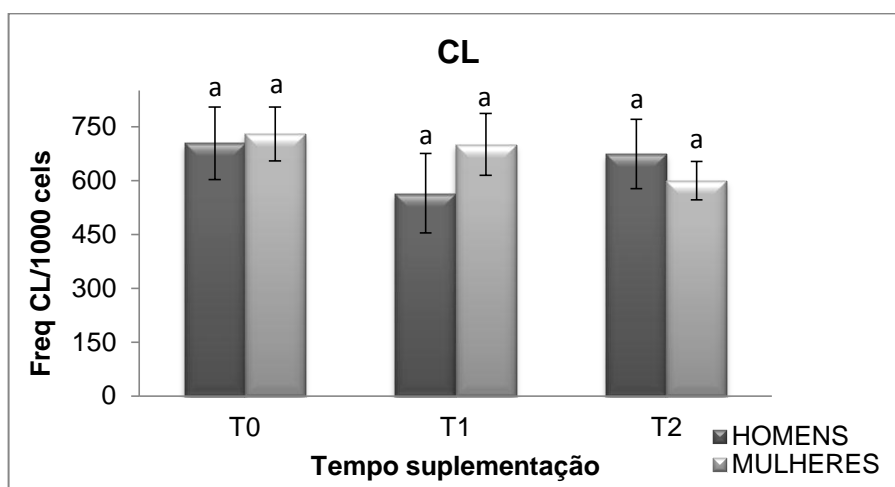


Figura 28: Frequência de Cariólise em 1000 células esfoliadas da mucosa bucal (média \pm EP). Comparação da resposta de cada sexo ao tratamento vitamínico. T0 (antes da suplementação); T1 (um mês de suplementação); T2 (dois meses de suplementação); Letras iguais representam semelhança estatística $P > 0,05$.

Tabela 2 – Resultado da Análise de células da mucosa bucal.

Mucosa	Homens+mulheres			Homens			Mulheres		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
BN	-	↓*	↓*	-	↓*	↓*	-	↓	↓
BE	-	=	=	-	↓*	↓**	-	=	=
MN	-	↓	↓	-	↓	↓	-	↓	↓
Apoptose	-	↓*	↓*	-	↓*	↓*	-	↓*	↑
CL	-	=	=	-	=	=	-	=	=

* significância estatística $P > 0,05$. = sem variação. ↑ aumento. ↓ redução.
 BN – Binucleadas. BE – Broken-egg. MN – micronúcleo. CL – cariólise.

5 DISCUSSÃO

A suplementação vitamínica foi realizada levando-se em consideração informações quanto à contribuição de diferentes vitaminas na prevenção aos danos genômicos, sendo utilizados o ácido fólico e as vitaminas B12, C e E. Os voluntários da pesquisa, pacientes renais crônicos que realizavam hemodiálise, forneceram amostras biológicas, sangue e células da mucosa bucal, em três períodos distintos: antes da suplementação vitamínica (T0), e ao completarem um (T1) e dois meses de tratamento (T2).

O ácido fólico (folato) tem papel crucial na prevenção de danos tais como quebras e hipometilação do DNA (WANG; FENECH, 2003). Já a vitamina B12 interage intimamente com o folato, ambos sendo cofatores no metabolismo da homocisteína e DNA (FERRAZ; STELUTI; MARCHIONI, 2010). As vitaminas C e E, com propriedades antioxidantes, atuam na inibição e diminuição das lesões causadas pela ação dos radicais livres, muito presentes em situações de estresse oxidativo, comum em pacientes renais crônicos em hemodiálise (THABET; CHAN, 2006; STAYNOVA et al., 2010).

Segundo Fenech (2007), o sucesso atribuído ao ensaio do MN deve-se à sua grande aplicabilidade em investigações sobre a ação de agentes genotóxicos, estilo de vida, perfil genético de quimioprevenção, e ensaios com suplementação, no câncer e na ocorrência de outras doenças. A avaliação de micronúcleos é realizada em diferentes tipos de tecidos podendo apresentar uma frequência distinta, mesmo quando os diferentes testes são aplicados em um mesmo organismo.

A análise da frequência de MN em linfócitos é extensivamente usada na avaliação epidemiológica molecular ou citogenética, quando da investigação de presença ou extensão dos danos cromossômicos em populações humanas, expostas a agentes genotóxicos ou que apresentam condições suscetíveis (FENECH et al., 1999; BONASSI et al., 2005, 2006). Este ensaio é também bem sucedido quando aplicado na identificação de fatores genéticos ou de dieta que tenham um impacto

significativo sobre a estabilidade genômica (BONASSI et al., 2006) . No ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese, os parâmetros analisados são as pontes nucleoplasmáticas, os brotos e os micronúcleos e o índice de divisão nuclear.

A análise de PNP foi validada como biomarcador de dano de DNA no estudo de Umegaki e Fenech (2000) e fornece evidências diretas dos danos no genoma resultantes de defeitos no sistema de reparo de quebras nas cadeias de DNA (LADEIRA, 2009). Os resultados da frequência de PNP observados neste estudo, tanto na condição de único grupo quanto na análise por sexo separado, indicam uma redução dessa alteração nuclear, sendo essa tendência mais evidente no sexo masculino, demonstrando que os diferentes sexos responderam distintamente à suplementação vitamínica. Wang e Fenech (2003) apresentam resultados que indicam a mesma tendência de queda, utilizando-se de suplementação apenas com ácido fólico ou 5-metiltetrahidrofolato, em cultura de células.

Em relação aos brotos, os pacientes, quando analisados sem distinção de sexo, não apresentaram diferenças da frequência deste parâmetro, nos linfócitos binucleados. No entanto, quando a análise considerou os sexos separados, observou-se, novamente, que somente os homens apresentaram diminuição significativa dessa alteração, a qual ocorreu no segundo mês de suplementação.

Consideramos que se o tempo de suplementação dos pacientes fosse maior, os resultados seriam mais significativos em relação à redução dos brotos e pontes nucleoplasmáticas. Stopper et al. (2008) constataram uma redução significativa de danos genômicos, em pacientes renais crônicos, após doze semanas de suplementação, utilizando uma combinação de Vitamina B12 e ácido fólico.

Os resultados obtidos na análise das pontes e brotos são de importância para a correlação aos danos genômicos e à origem de MN. Hoffelder et al. (2004) relata que em cerca de 40% dos casos de ocorrência de micronúcleos, dois ou mais deles são formados a partir de uma única PNP, decorrentes de rupturas dessas estruturas. Assim como as pontes, os brotos podem originar MN, no caso de ocorrer a sua desintegração (tese formol). Dessa forma a diminuição da frequência de pontes e de brotos pode refletir na redução da frequência de MN e apesar de nos resultados ora

apresentados não haver diferenças significativas, a tendência à redução desses parâmetros pode estar relacionada a uma queda no número de MN.

A análise da frequência de micronúcleos dos pacientes, como único grupo, demonstrou uma redução gradual e significativa, durante os meses de suplementação vitamínica, indicando com isso que a mesma auxiliou na redução de danos ao DNA.

O resultado da análise de MN, pareando o comportamento dos gêneros em resposta à suplementação, aponta que os homens tiveram redução significativa entre a frequência basal e o primeiro e segundo meses de suplementação. Já o grupo composto por mulheres, em todas as comparações, não apresentou diferença estatística apesar de demonstrar tendência à redução na frequência de células micronucleadas. Neste aspecto, mais uma vez os resultados do sexo masculino foram mais significativos indicando a influência do sexo do indivíduo em sua resposta ao tratamento com vitaminas.

O sexo tem sido relatado como um fator a ser considerado nos estudos de mutagênese. Fenech, Neville e Rinaldi (1994), em um estudo de investigação da frequência espontânea (basal) de micronúcleos, observaram que há uma influência considerável do sexo na produção de MN, sendo as mulheres mais predispostas à formação espontânea dessas estruturas.

Em 1998, Fenech além de corroborar a diferença entre os gêneros quanto à frequência de MN, percebeu que o sexo masculino apresentava uma correlação significativa com as taxas plasmáticas de vitamina B12, apesar de não ter a mesma resposta em relação às outras vitaminas testadas (vitamina E e folato). Já as mulheres respondiam de forma bastante distinta, pois não apresentaram tal correlação, exceto quando houve a combinação dos dados relativos às concentrações de vitamina B12 e ácido fólico. Esses resultados corroboram os aqui discutidos, no que se referem às pontes, brotos e micronúcleos.

Além das alterações nucleares, o índice de divisão nuclear (IDN) foi estabelecido no sentido de avaliar a citotoxicidade nos pacientes. Este índice informa sobre o estado da proliferação celular de células viáveis. O menor valor para esse índice é 1.0,

sendo encontrado se todas as células computadas forem mononucleadas, se o valor do IDN for igual a 2.0, indica que as células completaram um ciclo de divisão e quando superior a esse valor, indica que uma grande proporção de células completou mais de um ciclo celular (CANO, 2011). Em linfócitos, os nossos resultados para esse parâmetro demonstram que a proporção celular foi aumentada durante o tratamento com suplementação vitamínica, o que reflete redução da citotoxicidade.

Na análise do IDN, separando-se os sexos, o aumento desse índice foi mais evidente nas mulheres, apesar de ambos os sexos demonstrarem redução da citotoxicidade, reforçando a proposição de um comportamento distinto entre homens e mulheres.

Pelo fato de os pacientes portadores de insuficiência renal crônica apresentarem uma predisposição ao câncer oral (SCHUPP et al., 2008), o ensaio de micronúcleos com células da mucosa bucal foi a ferramenta usada na investigação de alterações nucleares e metanucleares locais. Nesta análise foram consideradas as células binucleadas e as mononucleadas portadoras de *broken egg* e micronúcleo, aquelas em apoptose e a cariólise.

A presença de células binucleadas, no esfregaço obtido da mucosa, pode estar relacionada ao atraso na divisão celular e não indica necessariamente uma alteração nuclear (CARRARD et al., 2007). Gonçalves et al (2010) observaram aumento significativo na frequência de células binucleadas na mucosa bucal, em análises de exposição de indivíduos aos raios X, mesmo em experimentos de curta exposição, o que indica relação do aumento de número de células binucleadas aos danos sofridos por elas, frente a ação de um mutágeno. Outros estudos apontam um aumento da frequência de células binucleadas quando da ação de mutágenos ou em situações que favoreçam a ocorrência de danos nessas células (SILVA et al., 2007).

Em relação a esse marcador, os resultados da análise conjunta dos indivíduos avaliados no presente estudo indicaram uma redução significativa, quando comparados os tempos de suplementação (T1 e T2) com o controle (T0). Na avaliação com a separação por gênero, observou-se que no grupo dos homens houve uma redução significativa após o primeiro mês (T1) de suplementação, a qual

foi mantida também no segundo mês. Nas mulheres, a redução não foi significativa, corroborando a ideia de distinção de comportamento entre os sexos. Segundo Silva et al. (2007) os hormônios femininos provocam alterações em células epiteliais da mucosa oral de mulheres, o que pode justificar essas diferenças.

O significado dos *broken eggs*, ainda que pouco esclarecido, demonstra que essa alteração esta relacionada com amplificação gênica, instabilidade cromossômica e, também, como precursoras de micronúcleos (RAMIREZ 2000; BOHRER, 2003). Em nossos resultados não foram observadas diferenças significativas em relação às células portadoras de *broken eggs*, apesar de apontar tendência à redução.

Esta condição, no entanto, pode indicar que a suplementação de alguma forma protegeu as células da mucosa oral de danos genômicos. Estudos como os de Antonio (2010) corroboram essa afirmação, pois indicam haver um aumento significativo dessa alteração, quando indivíduos são expostos à radiação, um fator reconhecidamente mutagênico. Também nesse parâmetro, na análise separada por sexo, os homens tiveram a frequência de *broken eggs* reduzida, de modo significativo, em relação ao primeiro e segundo meses de suplementação.

A morte celular por apoptose pode ocorrer devido à grande quantidade de lesões causadas ao seu DNA, tornando-a funcionalmente inviável, sendo um indício de citotoxicidade (MEIRELES et al. 2006). Os nossos resultados demonstraram uma redução na frequência de apoptose das células bucais, após o primeiro e segundo meses de suplementação, ou seja, diminuição dos níveis de citotoxicidade, o que sugere a interferência da suplementação para melhoria das condições dos pacientes.

Em ambos os gêneros, esses resultados também apresentaram diminuição significativa, sendo que somente nos homens a redução foi mantida até o segundo mês. No caso da cariólise, que representa a dissolução do núcleo, sendo uma das etapas de morte celular por necrose, não foram observadas diferenças significativas para as avaliações tanto em conjunto, quanto nos gêneros em separado. Apesar disso, vários estudos com radiação constataram aumento singnificativos na frequência de cariólise, o que evidencia que atua como um indicador de alterações

nucleares (CERQUEIRA et al. 2004; SILVA et al., 2007; ANGELIERI et al., 2007, 2010).

Segundo Ceppi e colaboradores (2010), a quantidade de estudos que consideram a interação da dieta e estilo de vida com os danos genômicos avaliados pelo teste de micronúcleo abrangem 19% do total de trabalhos, na área de mutagênese. Além disso, poucos avaliam os vários parâmetros que o teste permite analisar, sendo enfatizado principalmente a frequência de micronúcleos, sejam eles em linfócitos ou em mucosa bucal.

Diler e Celik (2011) consideram os micronúcleos, tanto em linfócitos quanto em células epiteliais, bons bioindicadores de danos citogenéticos a serem usados em estudos de biomonitoramento. O teste de avaliação do MN em mucosa, apesar de ser utilizado com menor frequência do que os estudos com linfócitos, apresenta potencial similar para demonstrar os efeitos da genotoxicidade. Ceppi et al. (2010), em um compilado de 19 estudos, com medidas de MN tanto em linfócitos quanto em mucosa, apontaram uma alta correlação entre os dois ensaios.

A avaliação da frequência de micronúcleo, nos pacientes como único grupo, apresentou tendência à redução também observada na análise separada por sexo, com maior proporção no primeiro mês. Casartelli et al. (2000) sugerem que a sua avaliação não deve ser utilizada isoladamente como marcador de alterações pré-malignas pelo fato de haver uma variação individual grande na frequência de MN. Outros estudos (CERQUEIRA et al. 2004; SILVA et al., 2007; ANGELIERI et al., 2007) de maneira semelhante, não encontraram diferenças estatísticas na avaliação de MN nas células da mucosa bucal antes e após exposição à radiação, somente na avaliação das alterações metanucleares.

Reforçando essa ideia, Thomas et al. (2011) demonstram em seu trabalho de revisão que vitaminas antioxidantes, quando utilizadas isoladamente não tiveram ação sobre a frequência MN, porém quando associadas chegaram a promover uma redução significativa de até 49%. Já para as vitaminas B12 e ácido fólico, a diminuição dos danos foi de 59%, também em células de linfócitos, evidenciando que essas vitaminas possuem ação eficiente na prevenção ou reparo de danos no material genético. Essa mesma revisão traz que os MN em mucosa bucal são

reduzidos até em 73% com uso do folato e o ácido ascórbico promoveria uma redução de 64% dos danos.

Nepomuceno (2005) também considera que algumas vitaminas, dentre elas as vitaminas C e E, atuam como agentes protetores contra o câncer, assim como outros estudos citados no mesmo trabalho, apontam que a deficiência de micronutrientes (ácido fólico, vitaminas B12, E e C, ferro e zinco) é considerada como a mais provável causa de alguns tipos de câncer. Ferraz, Steluti e Marchioni (2010) concluem que quanto maior o dano ao DNA maior o risco de desenvolvimento de neoplasias e que este estado é influenciado pela condição nutricional do indivíduo e concentração plasmática de nutrientes.

Neste mesmo sentido, Stopper et al. (2008) utilizaram a suplementação vitamínica em pacientes em hemodiálise e observaram que a administração associada de ácido fólico e vitamina B12 promoveu redução na frequência de MN, sendo significativa somente após 4 meses de tratamento, acompanhada da redução significativa dos níveis plasmáticos de homocisteína.

Tais evidências, somadas aos nossos resultados, enfatizam que a utilização da suplementação vitamínica é útil e necessária para minimizar os efeitos genotóxicos e citotóxicos, sejam eles induzidos por agentes externos, como o procedimento de hemodiálise, ou internos, como os elevados níveis de estresse oxidativo, condições presentes nos pacientes renais crônicos.

A alta reprodutibilidade do teste do MN e o seu baixo custo favorecem a realização de mais estudos que certamente auxiliarão para elucidar os efeitos da dieta nesse grupo de indivíduos, já que a insuficiência renal crônica é um problema de saúde pública e de elevada morbimortalidade, o que torna mister proporcionar melhores condições de vida para esses pacientes.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, o teste de micronúcleo aplicado em diferentes tipos celulares (linfócitos e mucosa) mostrou resposta positiva referente ao tratamento vitamínico proposto, sendo que ambos foram eficientes para a avaliação almejada. Na maioria dos parâmetros de danos genômicos ou alterações celulares, percebemos uma redução na frequência desses, sendo que por vezes foi apresentada sem significância estatística. Isso pode ser devido ao fato de que a suplementação vitamínica foi realizada por um período pequeno e sem uma concentração vitamínica previamente definida e adequada aos pacientes renais crônicos, já que foi utilizada de acordo com o fornecimento feito à população geral. Sugerimos que mais estudos sejam realizados a fim de estabelecer concentrações e posologias específicas aos portadores de IRC, assim como de acordo com o gênero do paciente, já que relatamos a diferença de comportamento entre homens e mulheres quanto aos resultados da utilização das vitaminas. Este trabalho fornece fortes evidências para associação entre a suplementação vitamínica e a redução de alterações nucleares, quer seja em nível de linfócitos ou de células da mucosa bucal, o que poderá contribuir para uma melhoria da saúde dos pacientes e para a prevenção de possíveis doenças de morbimortalidade que acometem os indivíduos renais crônicos submetidos à hemodiálise.

7 REFERÊNCIAS

AMES, B. N. DNA damage from micronutrients deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **Mutat. Res.**, v. 18, n. 1-2, p. 7-20, 2001.

AMORIM, F.G. et al., Bioquímica clínica da aterosclerose provocada por hiperhomocisteinemia. **Rev. Eletrônica Farm.** v. 8, n.1, p. 36 - 59, 2011.

ANGELIERI, F. et al. DNA damage and cellular death in oral mucosa cells of children who have undergone panoramic dental radiography. **Pediatr. Radiol.**, v. 37, p. 561–565, 2007.

ANGELIERI, F. et al. Mutagenicity and cytotoxicity assessment in patients undergoing orthodontic radiographs. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 39, p. 437-440, 2010.

ANTONIO, E.L. **Genotoxicidade e citotoxicidade dos raios x no epitélio da mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica.** 2010. Dissertação (mestrado em odontologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

ARAUJO, I.C. et al. Nutritional parameters and mortality in incident hemodialysis patients. **J. Ren. Nutr.**, v. 16, p. 27-35, 2006.

AYYAD, S.B. et al. Evaluation of Papanicolaou Stain for Studying Micronuclei in Buccal Cells under Field Conditions. **Acta Cytol.**, v. 50, n. 4, p. 398-402, 2006.

BAILEY, L. B. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C → T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. **J. Nutr.**, v. 133, n. 11, p. 3748-3753, 2003.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BASTOS, M.G. et al. Doença renal crônica: problemas e soluções. **J. Bras. Nefrol.**, v. 26, n. 4, p. 202-215, 2004.

BASTOS, M.G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G.M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 2, p. 248-253, 2010.

BATISTA, L.K.C. et al.. Manuseio da Doença Renal Crônica em Pacientes com Hipertensão e Diabetes. **Jorn. Bras. Nefrol.**, v. 27, n.1, p. 8-14, 2005.

BIANCHI, P.D. et al. Efeito da hemodiálise sobre o estresse oxidativo de pacientes renais crônicos. **J. Bras. Nefrol.**, v. 31, n. 3, p.175-182, 2009.

BIANCHI, P.D. **Efeito da vitamina E sobre marcadores periféricos de estresse oxidativo em pacientes renais crônicos em hemodiálise.** 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) Universidade Federal Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

BOHRER, P. L. **Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa bucal clinicamente normal exposta a carcinógenos.** 2003. Dissertação (Mestrado em odontologia na área de Patologia bucal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-31, 2006.

BONASSI, S. et al. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 45, n. 2–3, p. 258–270, 2005.

BULL, C.; FENECH, M. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or ‘nutriomes’ for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. **Proceedings of the Nutrition Society** v. 67, p.146–156, 2008.

CANO, B.Y.S. **Evaluación del efecto genotóxico de la Radiación Ionizante en médicos ortopedistas expuestos laboralmente, en cuatro instituciones de salud en Bogotá, Colombia.** Dissertação (mestrado) Universidad Nacional de Colombia 2011.

CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat. Res.**, v. 204, n. 3, p. 379-406, 1988.

CARRARD, V. C. et al. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal **Rev. Fac. Odontol.**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.

CARVALHO, M.B. et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 48, n. 4, p. 317-322, 2002.

CASARTELLI, G. et al. Micronucleus Frequencies in Exfoliated Buccal Cells in Normal Mucosa, Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinoma. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 22, n. 6, p. 486-492, 2000.

CASSINI, A.V. et al. Avaliação dos principais fatores etiológicos em indivíduos portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise **Conscientiae Saúde**, v. 9, n. 3, p. 462-468, 2010.

CATTAL, G.B.P. et al. Qualidade de vida em pacientes com insuficiência renal crônica. **Ciênc. Cuid. Saúde**. v. 6, n. 2, p. 460-467, 2007.

CELIK, A.; ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**. v. 18, p. 417-421, 2003.

CEPPI, M. et al. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. **Mutat. Res.** v. 705, p. 11–19, 2010.

CERQUEIRA, E.M.M. et al. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies, **Mutat. Res.**, v. 562, p. 111–117, 2004.

CHEN, C. et al. Cytogenetic Damage in Buccal Epithelia and Peripheral Lymphocytes of Young Healthy Individuals Exposed to Ozone. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 131-137, 2006.

DAHLIN, A. M. et al. Plasma vitamin B12 concentrations and the risk of colorectal cancer: a nested case-referent study. **Int. J. Cancer**, v. 122, n. 9, p. 2057-2061, 2008.

DAMASCENO, M.M.C.; LOUREIRO, M.F.F.; SILVA, L.M. Ser diabético e nefropata em tratamento de hemodiálise: a compreensão. **Rev. Baiana Enferm.**, v.14, n. 1, p. 27-38, 2001.

DIAS, P.M.T et al. Homocysteine: A vascular disease disease Risk Factor. **Rev. Cient. AMECS**, v. 10, n.1, 53 – 58, 2001.

DILER, S.B; CELIK, A. Cytogenetic Biomonitoring of carpet Fabric workers using micronucleus frequency, nuclear changes, and the calculation of risk assessment by repair index in exfoliated mucosa cells. **DNA Cell. Biol.**, v. 30, n. 10, p. 821-827, 2011.

EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Env. Mol. Mutagen.**, v. 13, n. 1, p. 34–43, 1989.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181-182, p. 411-416, 2002.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 1128-1137, 2002.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.**, v. 2, n.5, p. 1084–1104, 2007.

FENECH, M. et al. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 5, p. 991-999, 2005.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v. 534, n.1/2, p.65-75, 2003.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat. Res.**, v. 404, p. 155 – 165, 1998.

FENECH, M. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. **Mutat. Res.**, v. 428, p. 299-304, 1999.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 11-18. 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.** v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutat. Res.**, v. 475, p. 57-67, 2001.

FENECH, M.; DREOSTI, I. E.; RINALDI, J. R. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 7, p. 1329-1336, 1997.

FENECH, M.; FERGUSON, L. R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutat. Res.**, v. 18, n. 1-2, p. 1-6, 2001.

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

FENECH, M.; NEVILLE, S.; RINALDI, J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 313, p. 203-207, 1994.

FERMI, M.R.V. **Manual de diálise para enfermagem**. Rio de Janeiro: Medsi; 2003.

FERRAZ, C.M.; STELUTI, J.; MARCHIONI, D.M.L. As vitaminas e minerais relacionados à estabilidade genômica e à proteção ao câncer. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutri.**, v. 35, n. 2, p. 181-199, 2010.

FREITAS, V.S. et al. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Rev. Baiana Saúde Pública.**, v. 29, p.189-199, 2005.

GALLI, F. et al. Accumulation of vitamin E metabolites in the blood of renal failure patients. **Clin. Nutr.**, v. 23, p. 205 – 212, 2004.

GARCIA, N. Mais R\$ 73,3 milhões para ampliar hemodiálise no SUS. 2011. **Portal da Saúde: SUS**. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3815/162/mais-r\\$-733-milhoes-para-ampliar-hemodialise-no-sus.html](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3815/162/mais-r$-733-milhoes-para-ampliar-hemodialise-no-sus.html)>. Acesso em: 3 jan 2012.

GARCIA, T.P.R.; ROMERO, M.P.; POLETTE, N.A.A. Principais motivos de internação do paciente com insuficiência renal aguda na unidade de terapia intensiva. **Arq Ciênc Saúde.**, v. 12, n.3, p.146-50, 2005.

GIOVANNUCCI, E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. **J. Nutr.**, v. 132, p. 2350-2355, 2002.

GODOY, M.R.; NETO, G.B.; RIBEIRO, E.P. Estimando as perdas de rendimento devido à doença renal crônica no Brasil. **Divulg. Saúde Debate**, v. 38, p. 68-85, 2007.

GONÇALVES, A. et al. **Micronúcleo e anormalidades nucleares de células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos idosos expostos aos raios-x durante a radiografia panorâmica**. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética • 14 a 17 de setembro de 2010.

HARNACK, L. et al. Relationship of folate vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. **Nutr. Cancer**, v. 43, n. 2, p. 152-158, 2002.

HOFFELDER, D. et al. Resolution of anaphase bridges in cancer cells, **Chromosoma**, v. 112, p. 389 – 397, 2004.

JENAB, M. et al. Plasma and dietary vitamin C levels and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPICURGAST). **Carcinogenesis**. v. 27, n. 11, p. 2250-2257, 2006.

JÚNIOR, J.E.D. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **J Bras. Nefrol.** v. 26, n. 3, p. 1-3, 2004.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica.** Editora Guanabara Koogan. 6ª. Edição. 1998

KIM, Y-I. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers**, v. 13, n. 4, p. 511-519, 2004.

KIRSH-VOLDERS, M. et al. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in Human Lymphocytes in vivo, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.15, n.5, p.1038-1042., 2006.

KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ, M. et al. Products of DNA, protein and lipid oxidative damage in relation to vitamin C plasma concentration. **Physiol. Res.**, v. 55, n. 2, p. 227-231, 2006.

KUSUMOTO, L. et al. Adultos e idosos em hemodiálise: avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde. **Acta Paul. Enferm.**, v. 21, 2008.

LADEIRA, C.A.F. **Biomarcadores genotóxicos e polimorfismos genéticos em trabalhadores expostos a formaldeído.** 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular Humana). Universidade de Lisboa. Lisboa.

LIANG, D. et al. Plasma vitamins E and A and risk of bladder cancer: a case-control analysis. **Cancer Causes Control**, v. 19, n. 9, p. 981-992, 2008.

LINDBERG, H.K. et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 617, p. 33-45, 2007.

MAISONNEUVE, P. et al. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. **Lancet.**, v. 354, p. 93–99, 1999.

MAJER, B.J. et al. Use of the Micronucleus Assay with Exfoliated Epithelial Cells as a Biomarker for Monitoring Individuals at Elevated Risk of Genetic Damage and in Chemoprevention Trials. **Mutat. Res.**, v. 489, n. 2-3, p. 147-172, 2001.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p. 1515- 1531, 2006.

MEIRELES, J.R.C. et al Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, n. 4, p. 337-343, 2006.

MIGLIORE, L. et al. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. **Mutagenesis** v. 26, n. 1, p. 85–92, 2011.

MILLER, B. et al. Evaluation of the in vitro micronucleus test (MNT) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: Position of the GUM working group in vitro MNT. **Mutat. Res.**, v. 410, p. 81-116, 1998.

MILLER, M.L. et al. Insights into UV-induced apoptosis: ultrastructure, trichrome stain and spectral imaging. **Micron.**, v. 33, p. 157-66, 2002.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev. Eletrônica Farm.** v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOURA, M.S.B.; MARTINS, M.C.C.; SOUZA FILHO, M.D. Hiperhomocisteinemia como fator de risco cardiovascular. **Conscientiae saúde**, v. 10, n.1, p. 181-185, 2011.

NEPOMUCENO, J.C. Dieta e câncer: vitaminas antioxidantes. **Biosci. J.**, v. 21, n. 1, p. 141-146, 2005.

NERBASS, F.B.; DRAIBE, S.A.; CUPPARI, L. Hiperhomocisteinemia na insuficiênciarenal crônica. **Rev. Nutr.**, v. 18, n. 2, p. 239-249, 2005.

NEVES; L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 40, n.5, p. 311-320, 2004.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R.L. O papel dos alimentos funcionais da prevenção e controle do câncer de mama. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 50, n. 3, p. 251-260, 2004.

PINTO W. J. et al., Homocisteína e risco cardiovascular. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 18, n 5/6, p. 259-268, 2009.

PIVATTO, D.R.; ABREU, I.S. Principais causas de hospitalização de pacientes em hemodiálise no município de Guarapuava, Paraná, Brasil. **Rev. Gaúcha Enferm.**, v. 31, n. 3, p. 515-520, 2010.

QUEIROZ, M.V.O. et al. **Tecnologia do cuidado ao paciente renal crônico: enfoque educativo-terapêutico a partir das necessidades dos sujeitos.** Texto contexto de enfermagem [online]. 2008, vol.17

RAMIREZ, A. **Análise de células metanucleadas de alcoólicos portadores de carcinomas orais.** 2000. Dissertação Instituto de Biociências Área de Concentração Biologia. Universidade de São Paulo.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. **Genet. Mol. Res.**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

ROMEU, M. et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. **BMC Res. Notes**, v. 3, p. 1-7, 2010.

ROY, M. et al. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. **Mutat. Res.** v. 9457, p. 1-9. 2003.

RYAN, T.P. et al. Chronic Kidney Disease Prevalence and Rate of Diagnosis. **Am. J. Med.**, v. 120, p. 981-986, 2007.

SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p. 11-17, 1987.

SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W. Dose-response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis, **Mutat Res.** v. 464, p. 13-8, 2000.

SCHUPP, N. et al. New Approaches for the Treatment of Genomic Damage in End-Stage Renal Disease. **J. Renal Nutr.**, v. 8, n.1, p 127–133, 2008.

SEGALL, L. et al. Nutritional status evaluation and survival in hemodialysis patients in one centre from românia. **Nephrol. Dial. Transplant.** v. 24, p. 2536-2540, 2009.

SESSO, R. et al., Relatório do censo brasileiro de diálise de 2010. **J. Bras. Nefrol.** n. 4, v. 33, p. 442-447, 2011.

SESSO, R. et al., Censo Brasileiro de Diálise, 2009. **J. Bras. Nefrol.** v. 32, n.4, p. 380-384, 2010.

SESSO, R; GORDAN, P. Dados Disponíveis Sobre a Doença Renal Crônica no Brasil. **J. Bras. Nefrol.** v. 29, n. 1, p. 9-12, 2007.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHANE, B. Folic acid, vitamin B12, and vitamin B6. In: STIPANUK, M. (Ed.). Biochemical and physiological aspects of human nutrition. **W.B. Saunders**; p. 483-518, 2000.

SILVA, A.E. et al. Nuclear changes in tongue epithelial cells following panoramic radiography. **Mutat. Res.**, v. 632, p.121–125, 2007.

SOUTO, R. et al. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativo de dano genético: aspectos citogenéticos. **Estudos**, v. 35, n. 1/2, p. 171-178, 2008.

SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.H.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA.** v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SQUIER, C.A.; FINKELSTEIN, M.W. **Oral Mucosa. In: Oral Histology: Development, Structure and Function.**, cap.. 16, p. 345-385, 1998.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defense: vitamins E, C and carotenoids. **Diabetes.** v. 46, n. 2, p.14-8, 1997.

STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z.; et al.. Vitamin E intake, alpha-tocopherol status, and pancreatic cancer in a cohort of male smokers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 89, n. 2, p. 584-591, 2009.

STOPPER, H. et al. Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 34, p. 433-437, 1999.

STOPPER, H. et al. Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic and vitamin B12 supplementation. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 23, n. 10, p. 3272-3279, 2008.

STOYANOVA, E. et al. Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. **Nephrol. Dial. Transplant.** v. 25, p. 879–885, 2010.

SUHAS, S. et al. Application of the Micronucleus Test to Exfoliated Epithelial Cells from the Oral Cavity of Beedi Smokers, a High-Risk Group for Oral Cancer. **Mutat. Res.**, v. 561, n. 1/2, p. 15- 21, 2004.

THABET, M.A.; CHAN, J.C.M. Vitamin E in renal therapeutic regimen. **Pediatr. Nephrol.** v. 21, p. 1790–17180, 2006.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, **Mutagenesis**, v. 18, p. 187– 194, 2003.

THOMAS, P. et al. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells; **Mutagenesis**, v. 26, n.1, p. 69–76, 2011.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.** v. 271, p. 69-77, 1992.

UMEGAKI, K.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils, **Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 261-269, 2000.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WANG, X.; FENECH, M. A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 81-86, 2003.

WEINSTEIN, T. et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease: randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 356, p.1213–1218, 2000.

ZHANG, S. M. et al. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, n. 5, p. 373-380, 2003.

ZIEGLER, R. G.; LIM, U. One-carbon metabolism, colorectal carcinogenesis, chemoprevention – with caution. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 99, n. 16, p. 1214-1215, 2007.

ANEXO A- Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - UFES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 06 de maio de 2011.

De: Prof. Dr. Adauto Emmerich Oliveira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. (a) Thatiane Lorena Miranda Batista
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Avaliação de danos genômicos em pacientes submetidos à hemodiálise, após a suplementação vitamínica por Ácido Fólico e Vitaminas E, C e B12”**.

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº. **058/11** intitulado: **“Avaliação de danos genômicos em pacientes submetidos à hemodiálise, após a suplementação vitamínica por Ácido Fólico e Vitaminas E, C e B12”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Extra Ordinária realizada em 04 de maio de 2011.

Lembramos que, cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,


Coordenador do
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/UFES

**ANEXO B – Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos –
Vitória Apart Hospital**




PARECER FINAL

Parecer Nº. 2.02.0001.10
Pesquisador (a) Responsável: Thatiane Lorena Miranda Batista
Instituição onde será desenvolvido: IDR – Nefrologia do Vitória Apart Hospital
Grupo: III
Área do Conhecimento: Biologia Geral
Situação do projeto: **APROVADO**

Atendidas as pendências no dia 02 de setembro de 2010, o projeto é, portanto aprovado e autorizado o início da pesquisa, já que esta em conformidade com os requisitos éticos apresentados na Resolução 196/96 do CNS/MS e suas complementares.

Solicita-se aos pesquisadores o envio a este CEP, de relatórios parciais sempre que houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final impresso e gravado em CD-ROM a cada 6 meses de pesquisa.

Serra, 02 de setembro de 2010.


Vinícius Gomes da Silveira
Coordenador do CEP-VAH

CEP VAH
Centro de Estudo e
Pesquisa do
Vitória Apart Hospital

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

(Adaptado do modelo recomendado por International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens; Mutation Research, 204:379-406, 1988)

HISTÓRIO PESSOAL

1. Nome: _____

2. Data hoje __/__/__

3. Idade (anos): _____ Sexo: F () M ()

4. Estado civil:

Solteiro () Casado () Divorciado () Viúvo ()

HIISTÓRICO OCUPACIONAL

5. Local de trabalho e que tipo de serviço exerce: (atual ou ultimo, no caso de estar desempregado ou aposentado)

6. Há quanto tempo esta neste trabalho _____

7. Qual sua carga horária semanal _____

HISTÓRICO DE EXPOSIÇÃO

8. É fumante : Sim () Não ()

9. Há quanto tempo fuma e qual a frequência: _____

10. Que tipo de fumo utiliza: _____

11. foi ou é exposto a algum agente químico ou físico (gases tóxicos, chumbo, fármacos, agrotóxicos, radiação): Sim () Não ()

12. Se sim, que agente: _____

13. Utiliza algum tipo de proteção contra o agente _____

14. Faz uso de quais medicamentos (receitados ou não pelo médico)

15. Tomou vitaminas nos últimos 6 meses. Se sim quais

16. Que doenças possui ou já teve:

Câncer ()

Hepatite ()

Mononucleose ()

Herpes ()

AIDS ()

Meningite ()

Infecção bacteriana/viral ()

Diabetes ()

Hipertensão arterial ()

Doença renal crônica ()

17. Que tipo de tratamento faz para a DRC _____

18. Duração (horas) _____ vezes por semana _____

19. Tipo de dialisador e esterilizante: _____

20. Nível de creatinina: _____

21. Doença de base: _____

22. Passou por alguma cirurgia recentemente (até uma no). Se sim razão:

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I - Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal**

Nome do Voluntário

Documento de identidade: _____ Órgão expedidor _____

Sexo: M___ F___ Data de Nascimento: ____/____/____

Telefone: _____ Cel. _____ Trab. _____

Endereço para contato:

Responsável Legal (Se necessário)

Documento de identidade: _____ Órgão expedidor _____

Parentesco:

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título do projeto de pesquisa: Avaliação de danos genômicos em pacientes submetidos à hemodiálise, após a suplementação vitamínica.

Pesquisadores responsáveis:

Thatiane Lorena Miranda Batista

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

Mestranda em Biotecnologia do CCS da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Prof^a. Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Cargo/função: Professor Adjunto III do Departamento de Ciências Biológicas, CCHN, Universidade Federal do Espírito Santo e Colaboradora do PPG em Biotecnologia da UFES.

Descrição e objetivo da pesquisa:

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar as possíveis ações da suplementação vitamínica, quando associada à hemodiálise, sobre o material genético humano. A suplementação vitamínica é indicada, nestes pacientes para sua reposição, já que parte delas é perdida durante o procedimento de diálise. Com este estudo poderemos obter informações importantes, por exemplo, se há uma melhora quanto risco à saúde humana, associado à hemodiálise e suplementação vitamínica em pacientes renais crônicos. Através da análise de células sanguíneas e células da mucosa bucal de pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise com ou sem suplementação vitamínica

poderemos observar se há redução da frequência de algum dano celular e/ou genético decorrente da exposição ao tratamento.

Para participar desse projeto de pesquisa, basta ceder uma amostra de 5,0 mL (mililitros) de sangue periférico que será utilizado para cultivo de linfócitos. Após 72 horas de cultivo, os linfócitos serão extraídos da cultura para preparação das lâminas e posterior análise da frequência de micronúcleos por microscópio de luz. As células da mucosa bucal serão obtidas por esfoliação utilizando uma escova Swab e serão montadas as lâminas para análise das células. Com os resultados obtidos poderá ser realizada a comparação entre os momentos antes e pós suplementação a fim de se observar se houve diminuição da frequência de micronúcleo (resultantes de efeitos citotóxicos e/ou genotóxicos sobre as células humanas).

III - Riscos e Benefícios Esperados

Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado.

A coleta de sangue dos pacientes renais crônicos, será realizada pela fístula, sem necessidade de nova perfuração. As células da mucosa bucal serão obtidas por escamação, utilizando um swab, causando o mínimo possível de desconforto para o voluntário.

Benefícios: os testes de toxicidade em células humanas (cultura de linfócitos de sangue periférico humano e da mucosa bucal) são importantes para verificar se há possibilidade de reduzir a toxicidade observada nas células (evidenciadas como lesões no material genético, ou morte celular). Como essas lesões/agressões ao material genético podem levar ao aparecimento de cânceres é de suma importância a descoberta de substâncias que podem reduzir a frequência com que essa doença se apresenta.

IV- Esclarecimentos dados pelo Pesquisador sobre Garantias do Sujeito da Pesquisa Consignado

- Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- O Sr(a) tem plena liberdade de não autorizar a utilização da coleta do seu sangue ou células da boca, para ser usado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material biológico para essa pesquisa só será feito após a leitura, entendimento e consentimento das informações contidas nesse termo de consentimento.
- Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento de participar do estudo.
- Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Para manter sua privacidade, será fornecido um número de registro à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido no mais absoluto sigilo e não será divulgado em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.
- Os resultados obtidos que estiverem associados à sua identificação não serão de forma nenhuma divulgados a terceiros.
- Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
- Os voluntários, que concordarem em participar do projeto, deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O não consentimento não acarreterá na falta de atendimento em qualquer instância da UFES ou de qualquer outra instituição participante/colaboradora desse projeto.

V - Informações de Nomes, Endereços e Telefone dos Responsáveis pelo Acompanhamento da Pesquisa para Contato

Prof. Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Endereço: Laboratório de Genética Vegetal e Produtos Naturais, Departamento de Ciências Biológicas / CCHN – UFES.

Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES

CEP: 29040-090

Telefone: (27) 3335-7495

VI - Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

() Desejo conhecer os resultados dessa pesquisa

() Não desejo conhecer os resultados dessa pesquisa

Local e data

Assinatura do sujeito da pesquisa

Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci ou Pesquisador responsável

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do pelo telefone 33357504 ou pelo e-mail cep@ccs.ufes.br;

APÊNDICE C – Células analisadas (fotomicrografias)

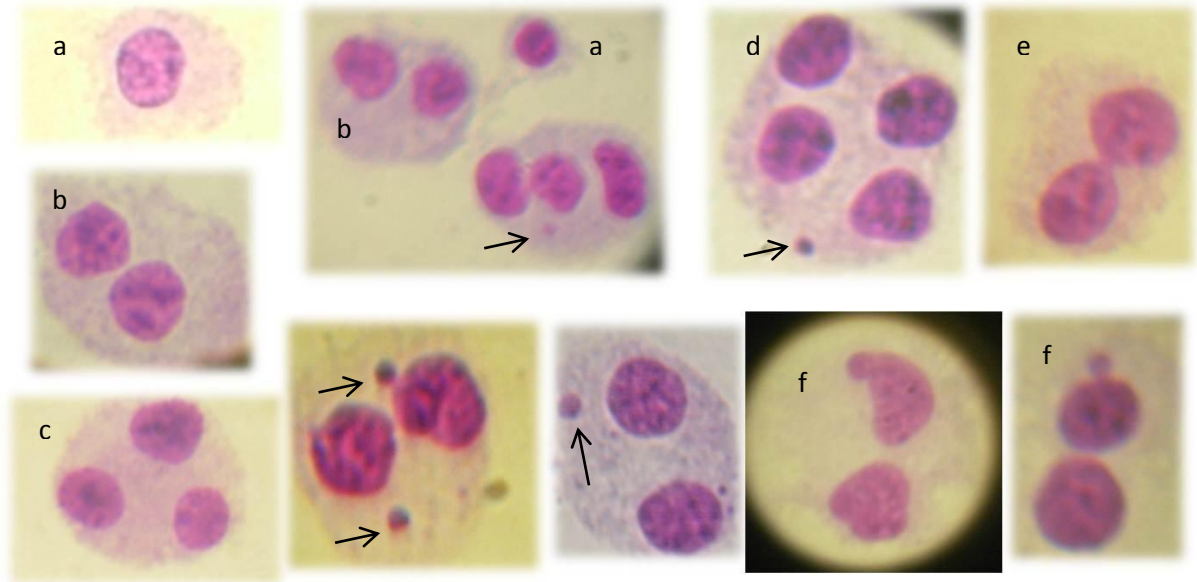


Figura 29 – Linfócitos analisados com objetiva de 100X. a- célula mononucleada. b- célula binucleada. c- célula trinucleada; d- tetranucleada com MN. e- BN com ponte nucleoplasmática. f- BN com broto. seta – micronúcleo.

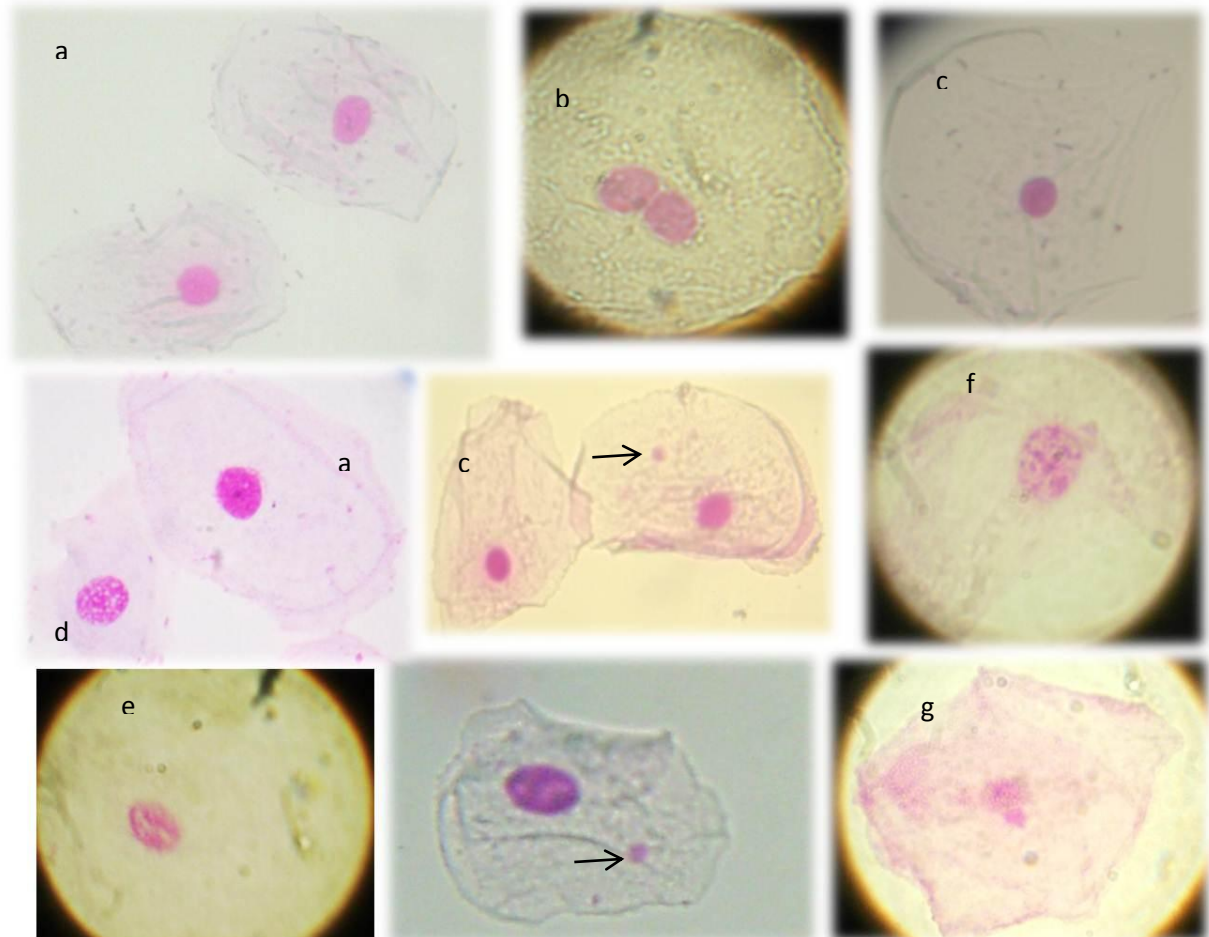


Figura 30- Células da mucosa bucal analisadas com objetiva de 40X. a- células normais. b- binucleada. c- picnose. d- apoptose. e- cromatina condensada. f- cariorrexe. g- broken-egg. seta – micronúcleo.