

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

ANGÉLICA DE SOUZA BATISTA

**MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES
EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE PORTADORES DE
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

BOTUCATU/SP

2013

ANGÉLICA DE SOUZA BATISTA

Micronúcleos e outras alterações nucleares em células esfoliadas da mucosa oral de portadores de esclerose múltipla

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas - Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daisy Maria Fávero Salvadori

Co-orientadora: Ms.^a Luciana Maria Feliciano

Supervisor: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Botucatu/SP

2013

Batista, Angélica de Souza.

Micronúcleos e outras alterações nucleares em células esfoliadas da mucosa oral de portadores de esclerose múltipla / Angélica de Souza Batista. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Daisy Maria Favero Salvadori

Coorientador: Luciana Maria Feliciano

Capes: 20206003

1. Esclerose múltipla. 2. Testes para micronúcleos. 3. Medicina nuclear. 4. Boca - Anomalias.

Palavras-chave: Anormalidades nucleares; Esclerose múltipla; Esfoliado bucal; Micronúcleo; Mucosa bucal.

A todos portadores de esclerose múltipla.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes.”

Isaac Newton

**MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES EM CÉLULAS
ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE PORTADORES DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

Batista, AS¹; Feliciano, LM²; Salvadori, DMF².

¹ Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP – Univ. Estadual Paulista

² Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ. Estadual Paulista

Abstract

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the Central Nervous System (CNS), with unknown etiology. The identification of biomarkers for neurodegenerative and autoimmune diseases has gain importance, once they may help early diagnosis and prognosis. The aim of this study was to evaluate the frequency of micronucleus and other nuclear abnormalities (binucleated and chromatin condensed cells, nuclear buds, karyolysis, karyorrhexis and pyknosis) in exfoliated buccal mucosa cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), the most common form of the disease. A total of 30 RRMS male and female patients, aged 22-56 years, and 30 healthy volunteers matched by gender and age (20-65 years) were recruited. The results showed increased amount of micronucleated and death cells, and also proliferative changes in buccal mucosa of the patients. In conclusion, data showed increased amount of cytogenetic damage in EMRR patients.

Keywords: buccal exfoliated cells; micronucleus; multiple sclerosis; nuclear abnormalities.

Resumo

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória do Sistema Nervoso Central (SNC), de etiologia desconhecida e com maior prevalência em adultos jovens, de difícil prognóstico e evolução de forma variada e individual. A identificação de biomarcadores para doenças neurodegenerativas e autoimunes tem recebido especial atenção, com o intuito de poder contribuir para o diagnóstico precoce e prognóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar a incidência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares (células binucleadas e com cromatina condensada, brotos nucleares, cariólise, cariorréxe e picnose) em células esfoliadas de mucosa bucal de portadores de Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente (EMRR), a forma mais comum da doença. Participaram do estudo, 30 portadores de EMRR, de ambos os sexos e com idade entre 22 e 56 anos. Como grupo controle, foram recrutados 30 indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade (20-65 anos). Os resultados mostraram aumento de células micronucleadas (MNC), de morte celular e alterações proliferativas no epitélio da mucosa bucal no grupo de portadores de EMRR. Concluindo, os dados evidenciaram aumento de danos genéticos e citológicos em portadores de EMRR.

Palavras-chave: anormalidades nucleares, esclerose múltipla, esfoliado bucal, micronúcleo.

1. Introdução

A Esclerose Múltipla (EM), que foi descrita pela primeira vez em 1868 pelo neurologista francês Jean Charcot, é uma doença caracterizada pela presença de eventos inflamatórios no Sistema Nervoso Central (SNC), cuja etiologia permanece ainda desconhecida (PEARCE, 2005; HAUSER & OKSENBERG, 2006; CHAUDHURI, 2013). Acredita-se, que eventos multifatoriais, genéticos e ambientais, estejam relacionados à EM. Alguns estudos mostram como exemplos da multifatorialidade da EM o local e sazonalidade do nascimento, a distância do equador, infecções na infância, deficiência de vitamina D e infecções virais (MILO & KAHANA, 2010; ASCHERIO, 2012; HO et al., 2012). A incidência da doença é predominante em adultos jovens, atingindo mais mulheres do que homens. Seu início pode ocorrer na adolescência, porém há um pico de incidência em indivíduos com cerca de 30 anos. Ainda que raro, a EM pode se manifestar em pessoas com mais de 50 anos, ou até mesmo em crianças (COMPSTON et al., 2006; MILO & KAHANA, 2010).

Os danos identificados no SNC de portadores de EM são mediados por linfócitos e macrófagos, que cruzam a barreira hematoencefálica causando danos à bainha de mielina axonal, depleção de oligodendrócitos, proliferação astrocitária (HAUSER & GOODKIN, 2001; HAUSER & OKSENBERG, 2006). Há três tipos clínicos de EM segundo os critérios de McDonald: o tipo remitente-recorrente (EMRR), com períodos de surtos inflamatórios e de remissão, que pode deixar sequelas totais ou parciais; o tipo primariamente progressivo (EMPP), caracterizado por progressão gradual das incapacidades, acúmulo de danos no SNC, sem surtos inflamatórios e, o tipo secundariamente progressivo (EMSP), com ou sem surtos inflamatórios (NOSERWORTHY et al., 2000; CHAVES et al., 2008; BRASIL, 2010; POLMAN et al., 2011). O tipo mais comum de EM é o EMRR, sendo 85% dos pacientes portadores desta forma clínica (HAUSER & OKSENBERG, 2006).

Atualmente, muitos estudos voltados para as doenças neurodegenerativas e/ou autoimunes buscam a identificação de biomarcadores que possam contribuir para diagnósticos mais precoces, prognósticos melhores definidos e para a definição de protocolos terapêuticos (RACHAKONDA et al., 2004; MIGLIORE et al., 2005). Biomarcadores citogenéticos, como micronúcleos e outras anormalidades nucleares de células esfoliadas da mucosa bucal, vêm sendo utilizados em pesquisas com doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, ou autoimunes como Diabetes Mellitus e Doença de Behçet (HAMURCU et al., 2005; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2007; MIGLIORE et al., 2011). Os micronúcleos (MN) são

fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que, por falha na anáfase, não foram incluídos no núcleo principal das células-filhas durante a mitose, podendo ser utilizados, portanto, como marcadores de quebra cromossômica (clastogênese) ou de perda cromossômica (aneugênese) durante a divisão celular (FENECH, 2000; BOLOGNESI et al., 2004). Da mesma forma, alterações nucleares como brotos (amplificação gênica), cariólise (necrose), cariorréxe e picnose (fases finais e iniciais de apoptose), cromatina condensada (indução a apoptose) e a presença de dois núcleos (falha na citocinese), juntamente com a proporção de células basais e diferenciadas normais, podem ser consideradas marcadores biológicos da cinética da divisão celular (HOLLAND et al., 2008).

O fato de o epitélio oral possuir a mesma origem embriológica do tecido cerebral (o ectoderma) pode ser visto como uma oportunidade menos invasiva para a avaliação de alterações citogenéticas, as quais, em tese, poderiam também ocorrer em consequência do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (MIGLIORE et al., 2011). Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a frequência de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares em células esfoliadas da mucosa bucal de portadores de esclerose múltipla remitente-recorrente.

2. Materiais e Métodos

2.1 Questões éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sob o protocolo nº CEP – 4072-2011. Todos os sujeitos da pesquisa assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 Casuística

Os portadores de EMRR foram recrutados no Ambulatório de Neuroimunologia do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Foram excluídos do estudo mulheres grávidas e pacientes que faziam uso contínuo de medicações comprovadamente mutagênicas (azatioprina, mitoxantrone, ciclofosfamida). As características demográficas, hábitos de vida e história médica e familiar foram obtidas por meio de questionário. Como grupo controle, foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos (20-65 anos), sem a presença de doenças crônicas, neurológicas, imunológicas ou virais. A caracterização das populações está apresentada na Tabela 1.

Tabela1. Características da população do estudo.

Variáveis	Controle	EMRR
	n=30	n=30
Sexo		
Feminino	26	19
Masculino	4	11
Cor da pele		
Branços	29	25
Não-brancos	1	5
Hábito de fumar		
Sim	2	5
Não	28	25
Ingestão alcoólica		
Sim	17	16
Não	13	14
Faixa etária	20-65	22-56
Média idade±DP	36,74±12,75	36,26±10,12

EMRR: Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente.

DP: Desvio-padrão

2.3 Coleta e processamento das células da mucosa bucal

Para a obtenção das amostras, células da camada intermediária da mucosa bucal foram coletadas com abaixador de língua de madeira umedecido em soro fisiológico. Após a fixação com metanol e ácido acético na proporção de 3:1, a suspensão celular foi gotejada em lâminas limpas, previamente lavadas. Após 24 horas, as células foram coradas por método de Feugen/Fast Green (HCl 5 M, por 30 minutos, Reativo de Schiff, por 90 minutos, e contracoloração do citoplasma com Fast Green).

2.4 Análises citogenéticas

Para avaliar a frequência de células micronucleadas e de brotos nucleares, foram analisadas 2000 células diferenciadas; para identificar alterações nucleares como cariólise, cariorréxe, picnose, células binucleadas e cromatina condensada, e estimar a proporção de células basais e diferenciadas, foram analisadas 1000 células (Thomas et al., 2009). As análises microscópicas foram realizadas em aumento de 400 X, em teste duplo cego. A Figura

1 apresenta os tipos celulares e as alterações nucleares identificadas em células da mucosa bucal.

2.5 Análises estatísticas

Para comparação dos diferentes parâmetros entre os dois grupos de estudo foram realizadas análise estatística com base na distribuição de Poisson. Para significância foi adotado $p < 0,05$.

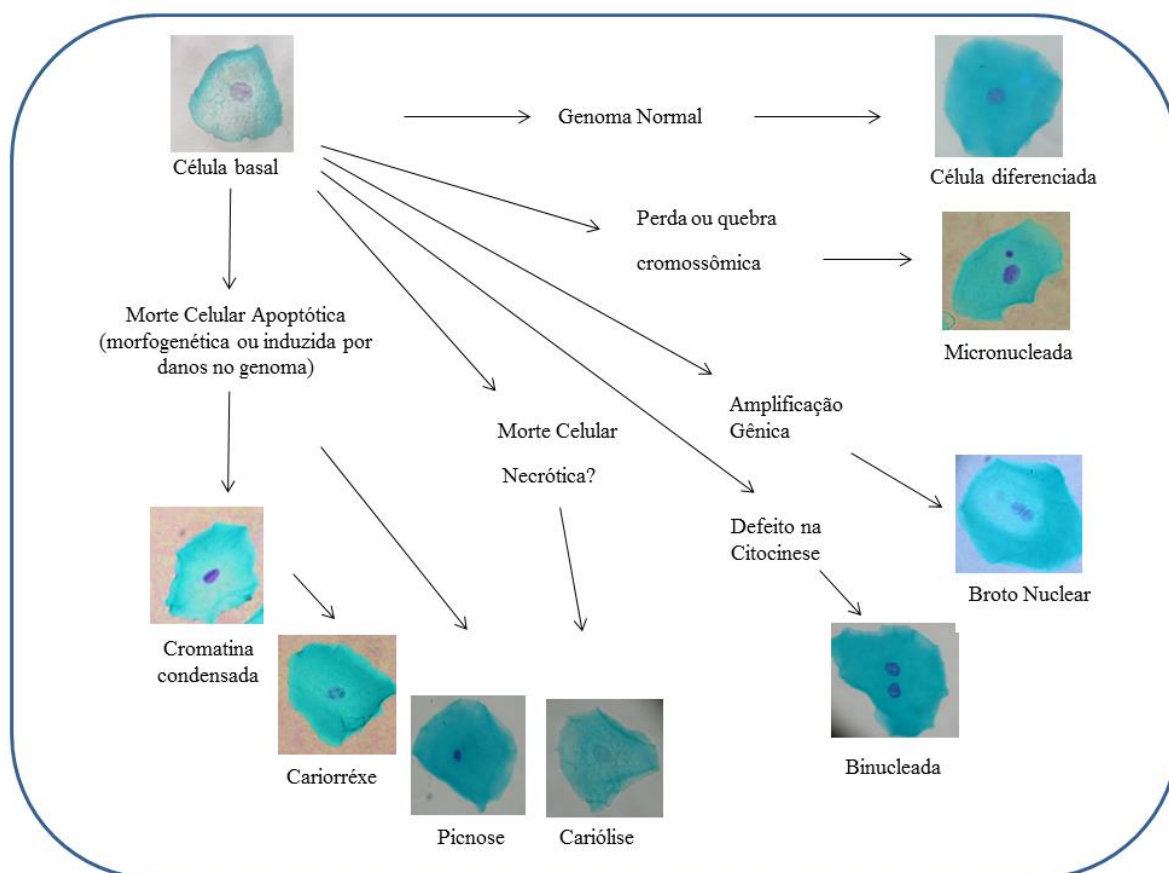


Figura1. Tipos celulares e alterações nucleares identificados na mucosa bucal. Esquema adaptado de Thomas et al.(2009).

3. Resultados

Não foram encontradas correlações entre a idade, sexo e as alterações nucleares, tampouco entre hábito tabagista e ingestão de bebida alcoólica. As frequências de células micronucleadas e das anormalidades nucleares estão apresentadas na Tabela 2. Foram

detectadas maiores frequências de células diferenciadas (somando-se as células normais e alteradas) e de células basais normais nos portadores de EMRR em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo de portadores de EMRR apresentou, também, aumento estatisticamente significativo de células micronucleadas (CMN) em relação aos controles ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos para frequência de brotos nucleares e para as alterações que correspondem a morte celular: cariorréxe (final do processo apoptótico) e cariólise (necrose). No entanto, foi observado aumento significativo ($p < 0,001$) de células com cromatina condensada, que é indicativo de morte apoptótica morfogenética ou induzida (processos iniciais de apoptose). Da mesma forma, as frequências de falhas na citocinese (células binucleadas) estavam aumentadas ($p < 0,05$) em portadores de EMRR quando comparados aos controles. Foi observada diferença na frequência de células picnóticas entre os dois grupos.

Tabela 2. Frequência (média e desvio padrão) de células micronucleadas e de outras alterações nucleares em esfoliado bucal de portadores de esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR).

Parâmetros	Tipo nuclear	Controle (n=30)	EMRR (n=30)
Células diferenciadas e basais (D+B)			
Total analisadas (D+B)		34500	35830
Células basais	Normal	40,47±20,79	46,60±22,96*
Células diferenciadas	Normal + anormal	1109,53±383	1131,27±347,87*
Morte celular	Cariorréxe	15,70±11,15	15,80±9,97
	Cariólise	31,70±25,69	34,00±20,51
	Picnóse	15,43±15,19	13,27±8,89**
	Cromatina Condensada	15,20±11,19	20,47±18,41**
Falha na citocinese	Células binucleadas	8,03±4,07	10,10±6,13*
Células diferenciadas analisadas (D)		69000	71300
Alterações cromossômicas	CMN	0,67±1,09	2,47±1,76**
	Broto nuclear	0,77±1,01	0,80±1,19

CMN - célula micronucleada; * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$ (em relação ao grupo controle; distribuição de Poisson).

4. Discussão

Nossos resultados mostraram aumento de alterações citogenéticas em células esfoliadas da mucosa bucal de portadores de EMRR. Há, na literatura, estudos demonstrando que medicamentos utilizados para reverter surtos inflamatórios, tal como a metilprednisolona e a mitoxantrona, podem causar danos ao sistema de reparo do DNA (RATH & OLIVEIRA-FRICK, 2009). Da mesma forma, foi descrito o efeito mutagênico da azatioprina, antineoplásico muitas vezes utilizado para o tratamento da EM. (RATH & OLIVEIRA-FRICK, 2009; LALLANA & FADUL, 2011). No entanto, levando-se em conta que os medicamentos de uso contínuo (betainterferonas 1a e 1b, acetato de glatirâmer, natalizumabe, metilprednisolona, azatioprina) pelos portadores de EM recrutados para este estudo não apresentam atividade mutagênica, pode-se supor que os aumentos observados de células micronucleadas, de picnose e de núcleos com cromatina condensada estariam ligados à doença. (YALDIZLI & PUTZKI, 2009; BRASIL, 2010; MILENKOVA et al., 2013).

O aumento de células micronucleadas (CMN) foi também encontrado em portadores de doenças autoimunes, como Diabetes Mellitus, e neurodegenerativas, como Doença de Behçet, Parkinson e doença de Huntington (SATHASIVAM et al., 2001; PETROZZI et al., 2001; HAMURCU et al., 2005; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2007). Da mesma forma, foi observado aumento significativo na frequência de quebras cromossômicas em portadores de Ataxia-Telangiectasia, doença neurodegenerativa que apresenta falhas na eliminação, por apoptose, de células que tiveram o DNA mutado durante desenvolvimento neural (LEE et al., 2001; LUDWIG et al., 2013). Por outro lado, a literatura reporta menor número de células com cromatina condensada, cariorréxe e de células basais em pacientes com Alzheimer. (THOMAS et al., 2007) Contrariamente, observamos em nosso estudo que os portadores de EMRR apresentavam aumento nas frequências de células basais e de diferenciadas, assim como de células com cromatina condensada.

Alguns pesquisadores associam doenças neurodegenerativas ao estresse oxidativo (elevada produção de radicais livres e queda na capacidade antioxidante), e acreditam que os danos oxidativos podem contribuir para a progressão dessas patologias e propagação de fenômenos celulares que conduzem à morte neuronal (MIGLIORE et al., 2005). De fato, foi observada em portadores da Doença de Parkinson uma redução nos níveis de glutathiona (GSH), antioxidante celular importante no combate a espécies reativas do oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio, com papel de destaque na degeneração da substância negra do

SNC (MARTIN & TEISMANN, 2009). O aumento significativo de 8OHdG (8-hidroxi-2-de-oxiguanosina), marcador de dano oxidativo no DNA, e baixos níveis de antioxidantes plasmáticos como retinol, α tocoferol, licopeno e α e β carotenos, já foram também relatados em portadores de Doença de Alzheimer (MECOCCI et al., 2002). Da mesma forma, mutações em genes que codificam enzimas antioxidantes como SOD1 (superóxido dismutase Cu/Zn), peroxidação lipídica, nitração protéica e danos oxidativos no DNA mitocondrial foram também associados à neurodegeneração em portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS) (ORRELL, 2000; CARRÍ et al., 2003).

A literatura mostra que há nítida relação entre doenças autoimunes, inflamação e estresse oxidativo. Na EM, fenômenos inflamatórios e produção de citocinas pró-inflamatórias estão envolvidos tanto com a origem das lesões desmielinizantes e morte axonal, como com a formação de radicais livres (ORTIZ et al., 2013). Foram observados danos oxidativos em proteínas, lipídeos e nucleotídeos de macrófagos e astrócitos, em lesões desmielinizantes de portadores de EM, além de altos níveis de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase 1 e 2, catalase e oxigenase heme1. Esse aumento de agentes antioxidantes reflete um mecanismo de defesa celular contra danos induzidos pelas EROS (VAN HORSSSEN et al., 2008). A produção excessiva de EROS induz lesões genotóxicas e mutagênicas com implicações nos processos de transcrição e replicação celular (DIANOV et al., 2000; DE BONT; VAN LAREBEKE, 2004). Além disso, danos oxidativos alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, favorecendo a liberação de fatores pró-apoptóticos como a ativação de caspases, com a finalidade de eliminar as células danificadas (CHANDRA et al., 2000). Portanto, os eventos inflamatórios da EM podem ter tido papel fundamental na indução das alterações citogenéticas encontradas nas células bucais dos participantes deste estudo.

O aumento na frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral, já foi também relatado em consumidores de álcool e em tabagistas (REIS et al., 2006; NADERI et al., 2012) e em linfócitos do sangue periférico de indivíduos acima de 40 anos (NEFIC & HANDZIC, 2013). No entanto, quando avaliamos a possível interferência dessas variáveis no aumento de células micronucleadas em portadores de EMRR, não detectamos nenhum efeito. Deve-se destacar que em nossa população de portadores de EMRR (n=30) havia apenas cinco indivíduos fumantes e que a média de idade era de 36,26 anos.

Concluindo, nossos resultados mostraram que portadores de EM apresentam aumento de alterações citogenéticas em células esfoliadas da mucosa bucal, e que variáveis como

hábito tabagista e idade não influenciaram tal achado. Portanto, diante dessas informações pode-se sugerir que os processos inflamatórios que ocorrem na EM teriam contribuído para o aumento de células micronucleadas e de outras alterações nucleares observadas nas células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal.

5. Agradecimentos

Agradecemos às equipes do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, do Ambulatório de Neuroimunologia do Hospital das Clínicas de Botucatu e do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Este estudo teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. Referências

ASCHERIO, A.; MUGER, K.L.; LÜNEMANN, J.D. The initiation and prevention of multiple sclerosis. **Nat. Ver. Neurol.**, v8, p.602-12, 2012.

BOLOGNESI, C. et al. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Sci. Total. Environ.**, v.333, p.127-36, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Consulta Pública n.º 21, de 23 de abril de 2010. Imprensa Oficial: **Diário Oficial da União** de 27/04/10 – seção 1 - p.57, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_esclerose_multipla.pdf>. Acesso em: 10set.2013.

CARRÍ, M.T. et al. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. **Brain Res. Bull.**, v.61, p.365-74, 2003.

CHANDRA, J.; SAMALI, A; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v.29, p.323-33, 2000.

CHAUDHURI, A. Multiple sclerosis is primarily a neurodegenerative disease. **J Neural Transm.**, v.120, p.1463-6, 2013.

CHAVES, M.L.F; FINKESZTEJN A.; STEFANI M.A. **Rotinas em neurologia e neurocirurgia**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

COMPSTON, A. et al. **McAlpine's multiple sclerosis**. 4.ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006.

DE BONT, R., VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis.**, v.19, p.169-85, 2004.

DIANOV, G.L. et al. Single nucleotide patch base excision repair is the major pathway for removal of thymine glycol from DNA in human cell extracts. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p.11809-13, 2000.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v.55,p.81-95, 2000.

HAMURCU, Z. et al. Micronucleus frequency in the oral mucosa and lymphocytes of patients with Behçet's disease. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.30, p.565-9, 2005.

HAUSER, S.L.; GOODKIN, D.E. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al (Eds.). **Harrison's principles of internal medicine**.15.ed. New York: McGraw Hill, 2001.

HAUSER, S.L., OKSENBERG, J.R. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. **Neuron.**, v. 52, p.61-76, 2006.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gap. **Mutat. Res.**, v.659, p.93-108, 2008.

HO, S.L.; ALAPPAT, L.; AWAD, A.B. Vitamin D and multiple sclerosis. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.52, p.980-7, 2012.

LALLANA, E.C.; FADUL, C.E. Toxicities of immunosuppressive treatment of autoimmune neurologic diseases. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 9, p.468-77, 2011.

LEE, Y.; CHONG, M.J.; MCKINNON, P.J. Ataxia telangiectasia mutated-dependent apoptosis after genotoxic stress in the developing nervous system is determined by cellular differentiation status. **J. Neurosci.**, v. 21, p.6687-93, 2001.

LUDWIG, L.B. et al. Chromosome instability and oxidative stress markers in patients with ataxia telangiectasia and their parents. **Biomed. Res. Int.**, v.2013, p.1-7,2013.

MARTIN, H.L.; TEISMANN, P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. **FASEB J.**, v 23, p.3263-72, 2009.

MECOCCI, P. et al. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. **Arch. Neurol.**, v.59, p.794-8, 2002.

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

MIGLIORE, L. et al. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. **Neurobiol. Aging.**, v.26, p.587-95, 2005.

MILENKOVA, M. et al. Chromosomal radiosensitivity in patients with multiple sclerosis. **Mutat. Res.**, v.749, p.3-8, 2013.

MILO, R.; KAHANA, E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. **Autoimmun. Rev.**, v. 9, p.A387-94, 2010.

NADERI, N.J.; FARHADI, S.; SARSHAR,S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v.55, p.433-8, 2012.

NEFIC, H.; HANDZIC, I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. **Mutat. Res.**, v. 753, p.1-11, 2013.

NOSEWORTHY, J.H. et al. Multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.**, v.343, p.938-52, 2000.

ORRELL, R.W. Amyotrophic lateral sclerosis: copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene mutations. **Neuromuscul. Disord.**, v.10, p.63-8, 2000.

- ORTIZ, G.G. et al. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. **Clin. Dev. Immunol.**, v.2013, p.1-14, 2013.
- PEARCE, J.M. Historical descriptions of multiple sclerosis. **Eur. Neurol.**, v.54, p.49-53, 2005.
- PETROZZI, L. et al. Cytogenetic analysis oxidative damage in lymphocytes of Parkinson's disease patients. **Neurol. Sci.**, v.22, p.83-4, 2001.
- POLMAN, C.H. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Ann. Neurol.**, v. 69, p.292-302, 2011.
- RACHAKONDA, V.; PAN, T.H.; LE, W.D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they? **Cell Res.**, v.14, p.347-58, 2004.
- RATH, T.; OLIVEIRA-FRICK, V. Mutagenicity of immunosuppressive medications among renal transplant recipients. **Am. J. Nephrol.**, v.30, p.514-20, 2009.
- REIS, S.R. et al. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. **Braz. Oral Res.**, v.20, p.97-102, 2006.
- SATHASIVAM, K. et al. Centrosome disorganization in fibroblast cultures derived from R6/2 Huntington's disease (HD) transgenic mice and HD patients. **Hum. Mol. Genet.**, v.10, p.2425-35, 2001.
- THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.**, v.4, p.825-37, 2009.
- THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. **Mutagenesis.**, v.22, p.371-9, 2007.
- VAN HORSSSEN, J. et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. **Free Radic. Biol. Med.**, v.45, p.1729-37, 2008.
- YALDIZLI, O.; PUTZKI, N. Natalizumab in the treatment of multiple sclerosis. **Ther. Adv. Neurol. Disord.**, v.2, p.115-28, 2009.
- ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G.M. et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. **Mutat. Res.**, v.634, p.126-34, 2007