

Danos cromossômicos e alterações nucleares em células esfoliadas do epitélio gengival de indivíduos com periodontite crônica moderada

Chromosomal damage and nuclear alterations in exfoliated cells of the gingival epithelium of individuals with chronic moderate periodontitis

Ronaldo Carvalho da Silva¹, Murilo de Araújo Neris², Maiza Alves Lopes³, Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira⁴, José Roberto Cardoso Meireles^{5*}

¹ Mestre em Genética e Biologia Molecular. Professor. UFRB; ² Mestre em Odontologia. Cirurgião Dentista do Centro de Especialidades Odontológicas de Senhor do Bonfim, BA; ³ Doutora em Genética e Biologia Molecular. Bióloga. UEFS; ⁴ Doutora em Biologia/Genética. Professora. UEFS; ⁵ Doutor em Biotecnologia. Professor. UEFS.

Resumo

Introdução: a periodontite é uma doença multifatorial que resulta primariamente da ação de bactérias nos tecidos que compõem o periodonto. O processo inflamatório que se desenvolve em consequência está associado ao aumento da proliferação celular que propicia a ocorrência de danos no material genético. **Objetivo:** avaliar, com uso do teste de micronúcleo, a ocorrência de danos genéticos e alterações nucleares em indivíduos com periodontite crônica moderada. **Metodologia:** a amostra incluiu dez indivíduos portadores de periodontite crônica moderada em início do tratamento no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) de Senhor do Bonfim/BA. Os participantes responderam a um questionário e células esfoliadas da mucosa gengival de regiões sem alterações e com periodontite crônica moderada foram coletadas. Este material foi transferido para lâmina de vidro, fixado com metanol/ácido acético (3:1), corado com reativo de Schiff e *fast green* e analisado sob microscopia óptica. A análise estatística foi feita com o teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros. **Resultados:** a ocorrência de micronúcleos, alterações nucleares degenerativas (cariorréxis, cariólise, cromatina condensada, picnose) e vacúolos nucleares foi significativamente maior em células da lesão. A ocorrência de *broken eggs* não diferiu estatisticamente. **Conclusões:** a periodontite crônica moderada é uma doença na qual há comprometimento da integridade genética das células do epitélio gengival. A maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose na área da periodontite crônica aponta para a resposta biológica do organismo ao insulto genotóxico ao qual as células nesta lesão estão submetidas.

Palavras-chave: Periodontite. Genotoxicidade. Apoptose.

Abstract

Introduction: periodontitis is a multifactorial disease that results primarily from the action of bacteria in the tissues that compose the periodontium. The inflammatory process that develops as a consequence is associated with increased cell proliferation which facilitates the occurrence of genetic damage. **Objective:** to evaluate, using the micronucleus test, the occurrence of genetic damage and nuclear alterations in individuals with chronic moderate periodontitis. **Methodology:** the sample included ten individuals with chronic moderate periodontitis beginning the treatment in the Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) located in Senhor do Bonfim/BA. Participants answered a questionnaire and exfoliated cells of the gingival mucosal regions without alterations and with chronic moderate periodontitis were collected. This material was transferred to slide, fixed with metanol/acetic acid (3:1), stained with Schiff reactive and fast green and analyzed using optical microscope. The statistical analysis was done using the conditional test to compare proportions in a rare events situation. **Results:** the occurrence of micronuclei, degenerative nuclear alterations (karyorrhexis, karyolysis, condensed chromatin, pyknosis) and nuclear vacuoles was significantly higher in cells of the lesion. The occurrence of broken eggs did not differ statistically. **Conclusions:** the chronic moderate periodontitis is a disease that compromises the genetic integrity of the gingival epithelium cells. The higher occurrence of nuclear apoptotic cells in the area of chronic periodontitis is indicative of the biological response to genotoxic insult. **Keywords:** Periodontitis. Genotoxicity. Apoptosis.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma inflamação dos tecidos periodontais em resposta ao dano tecidual ocasionado por bactérias que afeta os tecidos da gengiva, dos ligamentos periodontais, do cimento, do osso alveolar, vascular e

nervoso (LIVINGSTON; PARSELL; POLLACK, 2009). Diversos fatores têm sido apontados como de risco para seu desenvolvimento a exemplo do hábito de fumar, doenças sistêmicas como diabetes e osteoporose, idade avançada e fatores genéticos.

De acordo com Nunn (2003), o aparecimento e a progressão da periodontite também estão relacionados com fatores individuais como a anatomia dental, que pode favorecer o surgimento de placa bacteriana, composição do biofilme e resposta imune. Dyke e Dave (2005) acrescentam que fatores psíquicos, como o estresse,

Correspondente/Corresponding: – José Roberto Cardoso Meireles – Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas – End: Av. Transnordestina, S/N. Novo Horizonte – Feira de Santana/BA. CEP: 44.036-900 – Tel: (75)3161 – 8285 – E-mail: jrmeireles@gmail.com

podem contribuir para o surgimento desta inflamação por debilitarem o sistema imune tornando o indivíduo vulnerável a ação de bactérias patogênicas. Moreira, Vianna e Cangussu (2007) sugerem que indivíduos com menor poder aquisitivo e baixo nível de escolaridade, fatores que propiciam a falta de informações e de acesso ao atendimento odontológico, são mais susceptíveis ao surgimento de doenças periodontais.

O processo inflamatório por induzir a proliferação celular aumenta a chance de ocorrência de danos cromossômicos que estimulam a morte celular por apoptose (MUKHERJEE et al., 2012; SANCAR et al., 2004). A apoptose é, portanto, um mecanismo de proteção ao tecido por eliminar células geneticamente danificadas. Desse modo, alterações em genes relacionados às vias apoptóticas estão envolvidas no processo de transformação maligna que resulta também de alterações em genes associados ao controle da proliferação celular (proto-oncogenes e supressores de tumor) e ao reparo do DNA.

Assim, a identificação de alterações genéticas é possivelmente a principal medida de prevenção do câncer, uma vez que estas alterações ocorrem antes dos sintomas clínicos da doença. Este nível de prevenção tem importância econômica devido ao alto custo financeiro que representa o tratamento do câncer, além evidentemente de evitar o sofrimento de muitas pessoas.

Atualmente estão sendo utilizados vários marcadores biológicos para detectar a ocorrência de danos genéticos, incluindo entre eles o micronúcleo. Micronúcleos são corpúsculos formados por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos inteiros que se perdem na divisão celular, permanecendo no citoplasma das células filhas. Revelam, portanto, a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos. Em células esfoliadas da mucosa oral o teste de micronúcleo é considerado um excelente procedimento na avaliação de efeitos genotóxicos (HOLLAND et al., 2008).

Em 1991, Tolbert, Shy e Allen sugeriram que em preparações citológicas para análise de micronúcleo fossem também computadas alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose e necrose (cariorréxis, cromatina condensada, picnose e cariólise). Este procedimento aumenta a sensibilidade do teste sendo particularmente importante na prevenção do câncer, uma vez que a apoptose ao eliminar células geneticamente defeituosas tem papel relevante no controle da proliferação que, quando não regulada, resultará em um tumor (WEINBERG, 2000).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar, com o uso do teste de micronúcleo, a ocorrência de danos cromossômicos e alterações nucleares em células esfoliadas do epitélio gengival de indivíduos com periodontite crônica moderada.

METODOLOGIA

Amostra

O grupo amostral incluiu dez indivíduos portadores de periodontite crônica moderada diagnosticados no

Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) de Senhor do Bonfim/BA, onde iniciaram o tratamento. Os critérios utilizados para classificação das lesões como periodontite crônica moderada foram os recomendados pela *American Academy of Periodontology* (AAP, 1999) e tem sido também adotados em diversos outros estudos (ARANTES et al., 2008; BORGES et al., 2007; CARRIJO et al., 2009). De acordo com estes critérios a periodontite crônica é classificada como localizada (< 30% dos sítios envolvidos) ou generalizada (> 30% dos sítios envolvidos). A perda de inserção clínica inferida pela profundidade de sondagem (PS) determina o grau de severidade: leve (1-2 mm PS), moderada (3-4 mm PS) ou severa (> 5 mm PS).

A amostra foi caracterizada com aplicação de questionário contendo indagações acerca de idade, sexo, hábitos de fumar e ingerir bebidas alcoólicas, exposição à radiação e a produtos genotóxicos.

O exame odontológico para avaliação da condição oral foi realizado por cirurgião dentista especialista em periodontia. Dois parâmetros foram avaliados: higiene bucal (satisfatória ou insatisfatória) e presença de periodontite crônica moderada. Os indivíduos apresentando placa bacteriana, cálculo dental e saburra bucal tiveram a higiene bucal classificada como insatisfatória.

Uma vez que o objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência de danos genéticos especificamente em indivíduos apresentando periodontite crônica moderada foram excluídos da amostra aqueles apresentando periodonto sem alterações e aqueles com qualquer outro tipo de lesão periodontal. Foram excluídos também os que referiram hábito de fumar, exposição à radiação e a produtos genotóxicos.

Teste de micronúcleo

Células esfoliadas da mucosa gengival de regiões sem alterações e com periodontite crônica moderada foram coletadas pelo cirurgião dentista com uso de escova endocervical e cureta, respectivamente.

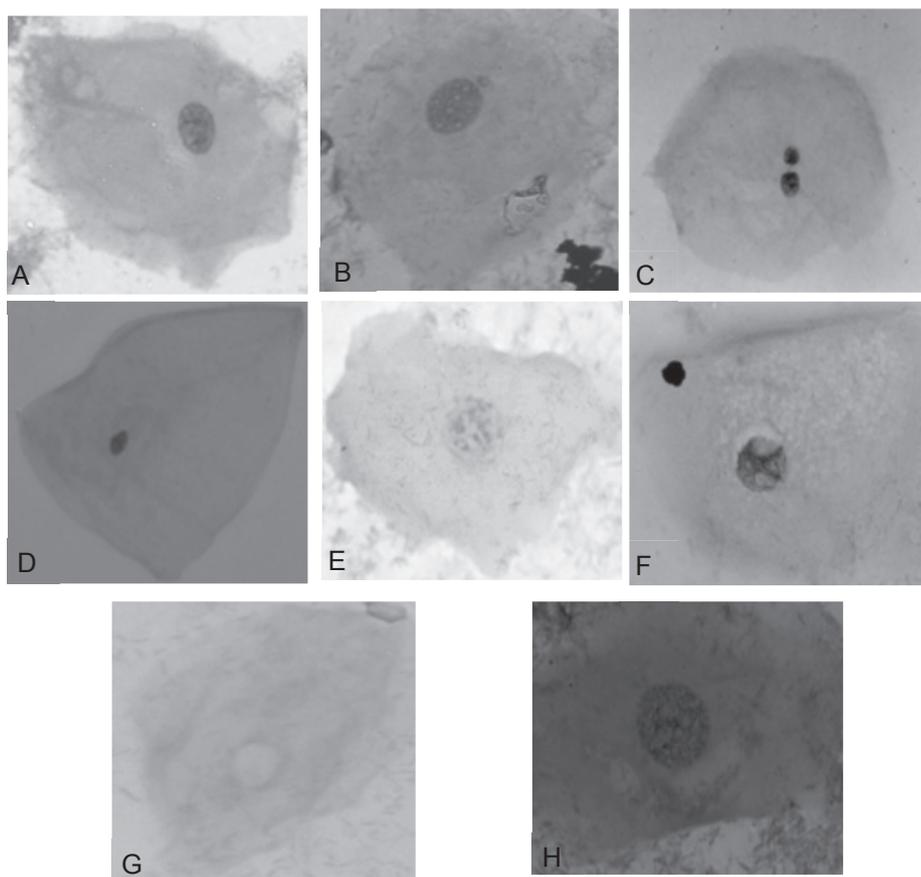
O material coletado foi transferido por esfregaço para lâmina de microscopia contendo duas gotas de soro fisiológico (NaCl 0,9%). Após secagem à temperatura ambiente as preparações foram submersas por dez minutos em solução de metanol/ácido acético (3:1) para fixação. Vinte e quatro horas depois o material foi corado com reativo de Shift (90 min) e contra-corado com *fast green* a 1% em etanol absoluto por 3s.

A análise microscópica foi realizada em teste cego com relação aos dados do questionário e quando possível um total de quatro mil células por indivíduo foi analisado: duas mil da região da lesão e igual número da região sem alteração. Os critérios de identificação de micronúcleo adotados foram os descritos por Sarto et al. (1987). Foram considerados micronúcleos estruturas com distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) a do núcleo, visualizadas no mesmo plano deste, com limites definidos e semelhantes aos nucleares e tamanho até 1/3 do nú-

cleo. Seguindo a sugestão de Tolbert, Shy e Allen (1991) e Holland et al. (2008), células apresentando alterações nucleares degenerativas (cariólise, cariorréxis, picnose,

chromatina condensada) e *broken eggs* também foram incluídas na análise, além de vacúolos nucleares (Figura 1).

Figura 1 – Fotomicrografia de células esfoliadas da mucosa oral corada pelo método Felguen/Fast grenn apresentando morfologia nuclear normal (A), micronúcleo (B), *broken eggs* (C), picnose (D), cariorréxis (E), cromatina condensada (F), cariólise (G) e vacúolos nucleares (H). Aumento: 1.000X. Microscópio Zeiss Axioscop



Fonte: Fotomicrografias capturadas pelos autores em microscópio Zeiss Axioscop no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991).

Aspectos éticos

A pesquisa teve início após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (CAAE 0093.0.059.000-09). Todas as pessoas da amostra foram esclarecidas a respeito da pesquisa e tiveram liberdade para não participar ou desistir de acordo com sua conveniência sem prejuízo quanto ao seu atendimento no Centro de Especialidade Odontológica (CEO) de Senhor do Bonfim. Aquelas que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

RESULTADOS

A média de idade dos indivíduos (quatro homens e seis mulheres) foi de $40,4 \pm 13,26$. Consumo de bebida alcoólica (1,8 litro de cerveja por semana em média) foi informado por sete participantes.

Na avaliação odontológica foi identificado que três indivíduos faziam uso de prótese dentária parcial removível, dos quais um fazia uso da prótese com ajuste inadequado. Todos os participantes apresentaram higiene oral insatisfatória e periodontite crônica moderada com comprometimento de mais de 30% dos sítios.

Um total de 37.509 células foi analisado: 17.509 da região com lesão (CL) e 20.000 da região sem lesão (SL). A análise estatística revelou que a ocorrência de dano cromossômico (micronúcleo) e alterações nucleares (picnose, cromatina condensada, cariorréxis, cariólise e vacúolos

nucleares) foi significativamente maior em células obtidas das regiões com lesão. A ocorrência de *broken eggs* não diferiu estatisticamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Ocorrência de micronúcleos, alterações nucleares e *broken eggs* na mucosa oral com lesão e sem lesão de indivíduos portadores de periodontite crônica moderada em início de tratamento odontológico no CEO/Senhor do Bonfim

Marcador citogenético	Mucosa com lesão		Mucosa sem lesão		Parâmetros estatísticos	
	OBS	ESP	OBS	ESP	χ^2	p*
Micronúcleo	30	17,74	08	20,26	15,19	p<0,05
Picnose	68	38,74	15	44,26	41,43	p<0,001
C. condensada	284	191,85	127	219,15	83,00	p<0,001
Cariorréxis	2.746	2.112,71	1.780	2.413,29	356,01	p<0,0001
Cariólise	48	31,27	19	35,72	16,77	p<0,05
Vacúolos nucleares	96	51,81	15	59,18	70,67	p<0,001
Broken eggs	04	7,47	12	8,53	3,02	p>0,050

C. condensada = Cromatina condensada. OBS = observado; ESP = esperado; *Grau de liberdade = 1

Fonte: Elaborada pelos autores a partir das análises microscópicas e estatística.

DISCUSSÃO

As lesões e inflamações crônicas podem aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias devido ao estímulo à proliferação celular que ocorre como resposta do organismo para reposição celular e consequente homeostase tecidual. Por outro lado, em consequência do aumento da proliferação há maior probabilidade de que ocorram erros na replicação do DNA que podem originar mutações gênicas e alterações cromossômicas favorecendo a carcinogênese (PEREZ; RAIMONDI; ITOIZ, 2005).

As lesões crônicas são estímulos para resposta inflamatória que resulta na presença de linfócitos que medeiam sinais de apoptose no local do trauma (BASCONES-ILUNDAIN et al., 2006). Durante este processo são liberadas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que interagem com o DNA podendo causar lesão nesta molécula (FERGUSON, 2010). Íons de nitrogênio, por exemplo, reagem com o oxigênio originando o peróxido de nitrito responsável pelo surgimento de sítios apurínicos. Espécies reativas de oxigênio podem gerar 8-oxodG e ocasionar transverso G-T (CHAIYARIT et al., 2005; YERMILOV; RUBIO; OHSHIMA, 1995).

Estes dados apontam para o potencial mutagênico do processo inflamatório como sugerido por Yermilov, Rubio e Ohshima (1995), Chaiyarit et al. (2005) e Ferguson (2010). Assim, a maior frequência de micronúcleo nas células da área da lesão observada neste estudo muito provavelmente é decorrente deste processo.

Bloching et al. (2008) observaram maior frequência de micronúcleo em indivíduos que tinham higiene bucal inadequada, principalmente quando faziam uso de bebidas alcoólicas e tabaco. No presente estudo, a ocorrência de micronúcleo observada em células obtidas da lesão periodontal pode refletir o efeito de dois fatores: má higiene bucal e periodontite. O efeito exclusivo da higiene oral insatisfatória na promoção de micronúcleo, entretanto, não pode ser avaliado, uma vez que todos os participantes apresentavam esta condição.

Segundo Andrade et al. (2005), o micronúcleo representa um importante marcador da ocorrência de danos no DNA. Estes danos podem comprometer a integridade de genes envolvidos na regulação da proliferação celular (proto-oncogenes e supressores de tumor), no reparo do material genético (genes mutadores), na diferenciação e no mecanismo genético de eliminação de células danificadas (apoptose). Assim, estes autores salientam a importância do uso deste biomarcador para avaliação do risco de câncer.

Alterações nucleares indicativas de apoptose, como sugerido por Tolbert, Shy e Allen (1991), foram também computadas neste estudo. A apoptose é uma forma geneticamente programada de morte celular que funciona principalmente para manter a homeostase tecidual e para eliminar células com alterações no DNA que poderiam iniciar a transformação maligna (NIKITAKIS; SAUK; PAPANICOLAOU, 2004; SCHULTE-HERMANN; GRASL-KRAUPP; BURSCH, 2000). Assim, a maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose observada neste estudo indica a “tentativa” do organismo em eliminar células danificadas pelo processo inflamatório periodontal.

Birchall et al. (1995) avaliaram os índices de apoptose em mucosa oral normal, com leucoplasia e com carcinoma de células escamosas e observaram aumento significativo no índice de apoptose da mucosa normal (0,12% +/- 0,07) para a mucosa com leucoplasia (0,58% +/- 0,13) e redução significativa deste na mucosa com carcinoma (0,14% +/- 0,14). O aumento na apoptose parece assim ocorrer desde o processo inflamatório, tal como observado no presente estudo, sua redução ocorrendo após instalado o processo de transformação maligna.

A ocorrência de cariólise, alteração nuclear que segundo Tolbert, Shy e Allen (1991) e Holland et al. (2008) é indicativa de necrose e está relacionada com a morte celular por eventos citotóxicos, também foi estatisticamente maior nas células das áreas da periodontite. Segundo Nikitakis, Sauk e Papanicolaou (2004), a necrose é um tipo de morte celular frequente em processos inflamatórios.

A frequência de vacúolos nucleares foi também significativamente maior nas células da região de lesão quando comparada com células da região de mucosa normal, sugerindo associação entre estas alterações e o processo inflamatório. Miranda (2006) identificou que indivíduos com câncer oral apresentam maior ocorrência destes vacúolos e sugere que o computo destas estruturas seja utilizado no monitoramento de indivíduos com risco de desenvolvimento de câncer oral.

Vacúolos nucleares foram descritos em células germinativas masculinas por Carizza e Franco Júnior (2008). Segundo estes autores são indicativos de danos ao DNA que, no caso dos espermatozoides, comprometem a fertilidade. Evidentemente esta consequência não se aplica a células somáticas, mas podem indicar do mesmo modo danos genéticos.

Diferentemente das demais alterações, a frequência de *broken eggs* não diferiu estatisticamente entre as células das áreas com lesão e normal. Este resultado sugere que esta estrutura não está relacionada à genotoxicidade. A ausência de associação positiva entre *broken eggs* e insulto genotóxico também foi relatada por diversos autores (BOHRER et al., 2005; CERQUEIRA et al., 2008; HOLLAND et al., 2008; TORRES-BUGARÍN et al., 2003). Segundo Holland et al. (2008) *broken eggs* está relacionado com amplificação gênica e não representa danos ao DNA. Torres-Bugarín et al. (2003) e Bohrer et al. (2005) corroboram esta hipótese e salientam que estas estruturas estão associadas ao processo normal de diferenciação celular.

Dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a periodontite crônica moderada é uma lesão na qual há comprometimento da integridade genética das células do epitélio gengival. A maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose na área da periodontite crônica moderada aponta para a resposta biológica do organismo ao insulto genotóxico ao qual as células nesta lesão estão submetidas.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.*, Chicago, v. 4, p. 1-6, 1999.
- ANDRADE, M. G. S. et al. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Rev. odonto ciênc.*, Rio Grande do Sul, v. 20, n. 48, p. 137-141, 2005.
- ARANTES, J. C. et al. Cortisol levels in patients presenting generalized chronic periodontitis and diabetes mellitus. *Rev. odonto. ciênc.*, Rio Grande do Sul, v. 23, n. 4, p. 384-387, 2008.
- BASCONES-ILUNDAIN, C. et al. Importance of apoptotic mechanisms in inflammatory infiltrate of oral lichen planus lesions. *Anticancer Res.*, Athens, v. 26, n. 1A, p. 357-362, 2006.
- BIRCHALL, M. A. et al. Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity: a preliminary study. *Eur. J. Cancer. parte B, Oral Oncol.*, London, v. 31B, n. 6, p. 380-383, 1995.
- BLOCHING, M. et al. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncol.*, Oxford, v. 44, n. 3, p. 220-226, 2008.
- BOHRER, P. L. et al. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol.*, Baltimore, v. 49, n. 3, p. 265-272, 2005.
- BORGES, P. K. O. et al. Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 657-668, 2007.
- BRAGANÇA-PEREIRA, C. A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. A. R.; MONTELEONE NETO, R. *Mutagenese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p. 113-21.
- CARIZZA, C.; FRANCO-JÚNIOR, J. G. ICSI amplificada ou convencional. *Boletim da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Boletim da SBRH*, São Paulo, ano 6, n. 1, p.1-16, 2008.
- CARRIJO, J. E. et al. Blood cortisol levels after periodontal treatment in patients with chronic or aggressive periodontitis: a pilot study. *Rev. odonto ciênc.*, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 59-63, 2009.
- CERQUEIRA, E. M. M. et al. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofac. Radiol.*, Tokyo, v. 37, n. 7, p. 398-403, 2008.
- CHAIYARIT, P. et al. Nitrate and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer Sci.*, Tokyo, v. 96, n. 9, p. 553-559, 2005.
- DYKE, T. E. V.; DAVE, S. Risk factors for periodontitis. *J. Int. Acad. Periodontol.*, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 3-7, 2005.
- FERGUSON, L. R. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 690, n. 1-2, p. 3-11, 2010.
- 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 gaps. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 659, n. 1-2, p. 93-108, 2008.
- LIVINGSTON, M.; PARSELL, D.; POLLACK, S. Periodontal disease: systemic risk factors. *J. Correct Health Care*, Chicago, v. 9, n. 3, p. 247-255, 2009.
- MIRANDA, M. A. S. P. *Micronúcleos e outras alterações nucleares: um teste de predição para o câncer bucal*. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- MOREIRA, A. L.; VIANNA, M. I.; CANGUSSU, M. C. T. Condições periodontais associadas aos fatores socioeconômicos na população adulta em Salvador (BA), 2005. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, Salvador, v. 6, n. 1, p. 39-46, 2007.
- MUKHERJEE, D. et al. The in vivo expression of radiation-induced chromosomal instability has an inflammatory mechanism. *Radiat. Res.*, New York, v. 177, n. 1, p. 18-24, 2012.
- NIKITAKIS, N. G.; SAUK, J. J.; PAPANICOLAOU, S. The role of apoptosis in oral disease: Mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v. 97, n. 4, p. 476-490, 2004.
- NUNN, M. E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol.* 2000, Copenhagen, v. 32, p.11-23, 2003.
- PEREZ, M. A.; RAIMONDI, A. R.; ITOIZ, M. E. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 34, n. 1, p. 17 – 22, 2005.
- SANCAR, A. et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 73, p. 39-85, 2004.
- SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*, Oxford, v. 2, n. 1, p. 11-17, 1987.
- SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W. Dose-response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 464, n. 1, p. 13-18, 2000.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol**, Baltimore. v. 134, n. 8, p. 840-850, 1991.

TORRES-BUGARÍN, O. et al. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin +5FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 539, n. 1-2, p. 177-186, 2003.

WEINBERG, R. A. **Uma célula renegada**: como o câncer começa. Rio de Janeiro: Ciência Atual Rocco, 2000. p. 147.

YERMILOV, V.; RUBIO, J.; OHSHIMA, H. Formation of 8-nitroguanine in

DNA treated with peroxydinitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 376, n. 3, p. 207-210, 1995.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Submetido em: 02/09/2016

Aceito em: 12/12/2016