

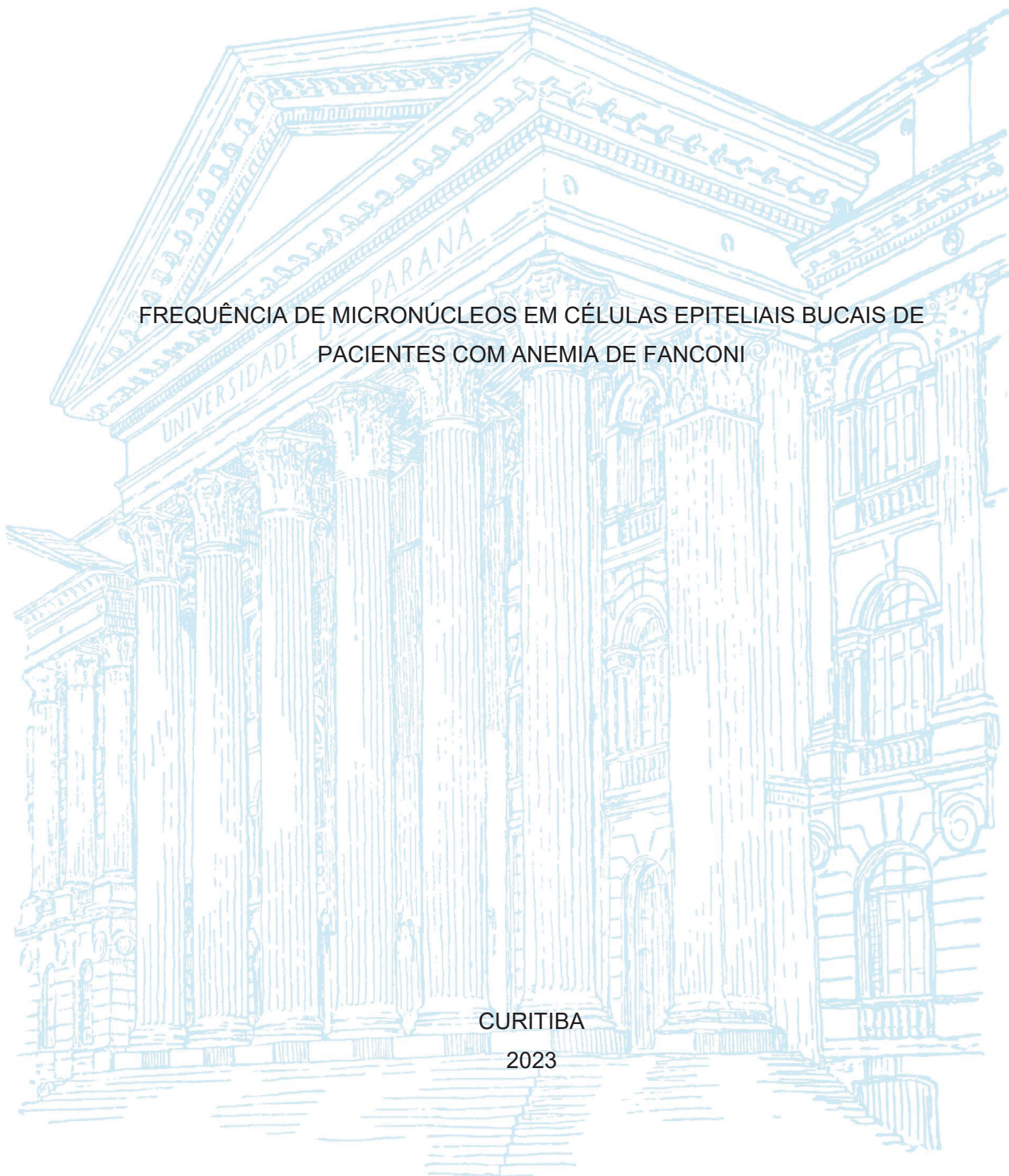
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA SOLDATELLI BALLARDIN

FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS DE
PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

CURITIBA

2023



BÁRBARA SOLDATELLI BALLARDIN

TESTE DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS DE PACIENTES
COM ANEMIA DE FANCONI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira

CURITIBA

2023

Ballardin, Bárbara Soldatelli

Frequência de micronúcleos em células epiteliais bucais de pacientes com Anemia de Fanconi [recurso eletrônico] / Bárbara Soldatelli Ballardin – Curitiba, 2023.
1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira

1. Anemia de Fanconi. 2. Neoplasias bucais. 3. Células epiteliais. 4. Carcinoma de células escamosas. I. Torres-Pereira, Cassius Carvalho. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.152



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -
40001016065P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BÁRBARA SOLDATELLI BALLARDIN** intitulada: **Frequência de micronúcleos em células epiteliais bucais de pacientes com Anemia de Fanconi**, sob orientação do Prof. Dr. CASSIUS CARVALHO TORRES PEREIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica

03/07/2023 20:34:39.0

CASSIUS CARVALHO TORRES PEREIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/07/2023 22:48:37.0

VINICIUS COELHO CARRARD
Avaliador Externo (UNIVER. FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL)

Assinatura Eletrônica

03/07/2023 11:23:52.0

JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/07/2023 11:07:30.0

MELISSA RODRIGUES DE ARAUJO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) pelo privilégio de cursar o mestrado e fazer parte da história de uma das melhores universidades públicas do Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira, o qual considero exemplo de comprometimento com os pacientes e com a ciência, pelo incentivo, compreensão e oportunidades que me foram dadas desde o início do meu vínculo com a instituição.

Agradeço aos demais docentes do PPGO pelo conhecimento transpassado. Agradeço, em especial, aos profs. Dra. Juliana Lucena Schussel, Dr. José Miguel Amenábar e Dra. Melissa Ribeiro de Araújo. À Profa. Juliana, por toda a paciência e dedicação com minha iniciação laboratorial, estimulando o aprendizado e possibilitando a elaboração deste estudo. Ao prof. José Miguel por, ainda nos primeiros meses de residência e imersão no universo da odontologia hospitalar, ter me incentivado a ingressar no mestrado, o que foi essencial para que seguisse esse caminho. À profa. Melissa pelas oportunidades oferecidas e pela dedicação em ensinar e compartilhar sua vasta experiência profissional.

Agradeço aos meus colegas de turma do PPGO que, apesar das interrupções no convívio social devido a pandemia do Covid19, tornaram a pós-graduação mais leve e prazerosa.

Agradeço ao Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR, aos preceptores da Odontologia e a todos os profissionais da instituição por abrirem as portas para a coleta de dados e por tão bem me receberem. Agradeço também às residentes do programa de residência em Atenção Hospitalar da instituição que compartilharam comigo o ambulatório de todas as terças-feiras pela manhã, e à aluna de iniciação científica Pâmela Olívia de Moura, que participou ativa e dedicadamente de todas as etapas da pesquisa. É gratificante ver colegas e futuros colegas tão interessados nessa especialidade que tem um lugar especial em minha vida.

Às técnicas do Laboratório de Patologia do curso de Odontologia, Bruna e Karla, por toda a ajuda e paciência. Vocês foram essenciais para a conclusão deste ciclo de aprendizado e evolução pessoal e profissional.

Aos pacientes diagnosticados com Anemia de Fanconi por aceitarem participar deste estudo e por me ensinarem tanto, inclusive, sobre a vida.

Aos meus amigos e amigas, os quais sou grata por compartilhar a vida.

E por fim, agradeço fortemente a minha família, em especial meus pais Nara e Fernando e minha irmã Daniele (e sua família). Agradeço por tudo que sempre fizeram e ainda fazem por mim. Apesar dos mais de 500 km que nos separam fisicamente, sempre se fizeram presentes e o acolhimento e apoio de vocês foi fundamental para a finalização de mais esse ciclo da minha vida acadêmica e profissional. Obrigada sempre. Amo vocês!

“Nada hay absoluto. Todo cambia, todo se mueve, todo revoluciona, todo vuela y va.”
(Frida Kahlo)

RESUMO

Pacientes diagnosticados com Anemia de Fanconi (AF) têm risco 700 vezes maior para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular (CEC) oral do que a população geral. Por esse motivo, medidas de rastreamento e diagnóstico precoce de distúrbios orais potencialmente malignos (DOPM) e CEC nesse grupo de pacientes precisam ser elaboradas. Citologia esfoliativa associada ao teste de micronúcleos (MN) como um biomarcador celular pode ser uma alternativa já que esse está associado com instabilidade cromossômica e genotoxicidade. O objetivo deste estudo é avaliar a frequência relativa de micronúcleos (FRMN) em células epiteliais bucais de pacientes com AF. Foram incluídos no estudo 46 pacientes com AF que realizaram o Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) ou não com ou sem DOPM. Foram coletados esfregaços celulares por meio da técnica de citologia esfoliativa convencional da mucosa jugal e bordo lingual bilateral dos participantes, além de todas as DOPM identificadas na amostra. As células coletadas foram coradas pela reação de Feulgen. A FRMN foi calculada a cada 1000 células. Participaram da pesquisa 27 mulheres e 19 homens, com faixa etária de 4 a 42 anos de idade, sendo que 32 destes já haviam realizado TCTH. Os participantes foram divididos em 3 grupos, sendo o grupo 1 de pacientes com AF não transplantados e sem DOPM, o grupo 2 de pacientes pós TCTH e sem DOPM e o grupo 3 pós TCTH com DOPM. A maior parte dos participantes (28) apresentou FRMN maior que o limite superior considerado normal na população geral. A média da FRMN total nos pacientes dos grupos 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 1,57, 2,16 e 4,49. Apesar disso, os testes estatísticos não demonstraram diferença significativa na FRMN total entre os grupos. Quando comparada a FRMN em mucosa íntegra e mucosa com DOPM dos participantes do grupo 3, foi possível identificar diferença estatisticamente significativa, onde os pacientes apresentaram maior FRMN em mucosas com DOPM. Além disso, identificou-se que a idade dos pacientes (principalmente na faixa etária de 26 a 30 anos) e o tempo pós TCTH de 16 a 20 anos influenciam no aumento da FRMN. Conclui-se que o teste de FRMN pode ser um método complementar para mensurar a predisposição de pacientes diagnosticados com AF para o desenvolvimento de CEC oral, favorecendo o diagnóstico precoce e possibilitando melhor prognóstico e sobrevida.

Palavra-chave: anemia de Fanconi; teste para micronúcleos; câncer bucal; citologia esfoliativa.

ABSTRACT

Patients diagnosed with Fanconi Anemia (FA) are 700 times more likely to develop oral squamous cell carcinoma (SCC) than the general population. For this reason, screening measures and early diagnosis of oral potentially malignant oral disorders (OPMD) and SCC in this group of patients need to be developed. Exfoliative cytology associated with the micronucleus test (MN) as a cellular biomarker can be an alternative since this is associated with chromosomal instability and genotoxicity. The aim of this study is to evaluate the relative frequency of micronuclei (FRMN) in oral epithelial cells from patients with FA. Forty-six patients with FA who underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) or not with or without OPMD were included in the study. Cell smears were collected using the conventional exfoliative cytology technique from the buccal mucosa and bilateral lingual border of the participants, in addition to all OPMD identified in the sample. The collected cells were stained by the Feulgen reaction. FRMN was calculated every 1000 cells. The participants were 27 women and 19 men, aged between 4 and 42 years old, 32 of whom had already undergone HSCT. Participants were divided into 3 groups: group 1 of patients with non-transplanted FA and without OPMD, group 2 of post-HSCT patients without OPMD and group 3 of post-HSCT with OPMD. Most participants (28) had FRMN greater than the upper limit considered normal in the general population. The mean total FRMN in patients in groups 1, 2 and 3 were, respectively, 1.57, 2.16 and 4.49. Despite this, statistical tests did not demonstrate a significant difference in total FRMN between groups. When comparing the FRMN in intact mucosa and the mucosa with OPMD of the participants in group 3, it was possible to identify a statistically significant difference, where patients had greater FRMN in mucous membranes with OPMD. In addition, it was identified that the age of the patients (mainly in the age group of 26 to 30 years) and the post-HSCT time of 16 to 20 years influence the increase in FRMN. It is concluded that the FRMN test can be a complementary method to measure the predisposition of patients diagnosed with FA to the development of oral SCC, favoring early diagnosis and enabling better prognosis and survival.

Keyword: Fanconi Anemia; micronucleus test; oral câncer; exfoliative cytology.

ABREVIATURAS

Ordem alfabética

AF: Anemia de Fanconi

CEC: Carcinoma espinocelular

CHC: Complexo Hospital de Clínicas

DECH: Doença do enxerto-contrá-hospedeiro

DOPM: Desordens orais potencialmente malignas

FRMN: Frequência relativa de micronúcleos

LLOST: Lesões liquenóides orais sem tratamento

MN: Micronúcleos

STMO: Serviço de transplante de medula óssea

TALE: Termo de assentimento livre esclarecido

TCLE: Termo de consentimento livre esclarecido

TCTH: Transplante de células-tronco hematopoiéticas

UFPR: Universidade Federal do Paraná

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Brasil dividido por estados e regiões, demonstrando a quantidade de participantes em cada uma delas.

Figura 2: Célula com coloração e formato normal. Coloração de Feulgen (400x).

Figura 3: MN indicado pela seta. Coloração de Feulgen (400x).

Figura 4: MN indicado pela seta. Coloração de Feulgen (400x).

Figura 5. Gráfico de barras ordenadas demonstrando a variação da FRMN totais em todos os participantes.

Figura 6. Gráfico de dispersão de pontos demonstrando a variabilidade da FRMN totais de todos os participantes.

Figura 7. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN total entre os três grupos avaliados.

Figura 8. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em mucosa íntegra entre os três grupos avaliados.

Figura 9. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em mucosa íntegra e mucosa com DOPM entre os pacientes do grupo 3.

Figura 10. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em MJD e MJE de todos os participantes.

Figura 11. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em BLD e BLE de todos os participantes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos dados clínicos por separação de grupos.

Tabela 2: Descrição dos dados clínicos de TCTH dos pacientes incluídos nos grupos 2 e 3.

Tabela 3: Descrição dos dados clínicos de DOPM dos pacientes incluídos no grupo 3.

Tabela 4. FRMN em ordem decrescente dos participantes do grupo 1.

Tabela 5. FRMN em ordem decrescente dos participantes do grupo 2.

Tabela 6. FRMN em ordem decrescente dos participantes do grupo 3.

Tabela 7. Média, mediana e desvio padrão da FRMN total nos três grupos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Desordens orais potencialmente malignas	15
3.2	Citologia esfoliativa.....	15
3.3	Micronúcleos	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Tipo de pesquisa	19
4.2	Seleção do material bibliográfico	19
4.3	Local da pesquisa.....	19
4.4	Amostra	19
4.4.1	Critérios de inclusão e exclusão	19
4.5	Aspectos éticos.....	20
4.5.1	Riscos e benefícios.....	21
4.6	Procedimentos metodológicos.....	21
4.6.1	Etapa clínica	22
4.6.2	Etapa laboratorial.....	23
4.6.3	Análise estatística.....	26
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSSÃO	42
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO A – TCLE ADULTO	52
	ANEXO B – TCLE RESPONSÁVEL	55
	ANEXO C – TALE	58
	ANEXO D - FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA	60
	ANEXO E - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE FEULGEN	63
	ANEXO F - FICHA DE AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS	67
	ANEXO G – PARECE CONSUBSTANCIADO CEP CHC-UFPR	69

1. INTRODUÇÃO

Pacientes diagnosticados com Anemia de Fanconi (AF) - uma doença genética autossômica recessiva rara - apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de câncer de boca, especificamente, o subtipo mais comum: carcinoma espinocelular (CEC) (KUTLER, PATEL, AUERBACH *et. al.*, 2016; FURQUIM, PIVOVAR, AMENÁBAR *et. al.*, 2018). Uma das consequências da doença é a aplasia medular, e para essa, o único tratamento é o Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) (KUTLER, PATEL, AUERBACH *et al.*, 2016; AMENÁBAR, TORRES-PEREIRA, TANG, *et. al.*, 2019). O TCTH é um tratamento conhecido e bem fundamentado para diversas doenças hematológicas e onco-hematológicas (RIEZZO, PASCALE, LA RUSSA *et. al.*, 2017). Porém, apesar do TCTH corrigir a falha da medula óssea, sabe-se que nos pacientes com AF esse tratamento torna-os ainda mais susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias malignas (FURQUIM, PIVOVAR, AMENABAR *et. al.*, 2018; VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

Nos últimos anos têm ressurgido o interesse pela citologia esfoliativa como estratégia para monitorar desordens orais potencialmente malignas (DOPM). Essa técnica, além de fácil realização e baixo custo, auxilia os Cirurgiões-Dentistas a acompanhar pacientes com maior predisposição para desenvolvimento de câncer de boca, evitando a realização de múltiplas biópsias em pessoas que apresentam maior risco de sangramento e susceptibilidade a infecções oportunistas frente a procedimentos cirúrgicos, como é o caso de pacientes oncológicos e onco-hematológicos (VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

Como aperfeiçoamento da técnica de citologia esfoliativa e para avaliação do potencial de malignização das lesões orais, biomarcadores celulares podem ser associados. O teste de micronúcleos é um exemplo bastante utilizado (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et. al.*, 2007).

Micronúcleos (MN) são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que são deixados para trás em anáfase durante a divisão celular mitótica e aparecem no citoplasma das células divididas como pequenos núcleos adicionais (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et. al.*, 2007). A frequência de MN nesses tecidos pode ser utilizada para identificar a fragilidade e a perda cromossômica, tornando

possível mensurar o potencial para transformações malignas da lesão (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et. al.*, 2007; VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

Dessa forma, a utilização de MN como um biomarcador possibilita a identificação de lesões com potencial de transformação maligna ou CEC oral muito mais cedo do que as manifestações de características clínicas (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et. al.*, 2007; VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020). Essa pode ser uma estratégia a ser explorada para rastreamento de populações de alto risco para CEC oral, como é o caso dos pacientes com AF.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é identificar e mensurar o potencial de transformação maligna de células da mucosa oral de pacientes com AF e desordens orais potencialmente malignas (DOPM) ou lesões sugestivas de malignidade clinicamente desses pacientes por meio do uso de MN como um biomarcador celular.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de MN nas células descamadas da mucosa oral íntegra de pacientes com AF pré e pós TCTH;
- Avaliar a frequência de MN nas células descamadas de DOPM de pacientes com AF pós TCTH;
- Utilizar o teste de MN como uma ferramenta para mensurar o potencial de malignização de células epiteliais bucais de pacientes com AF.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Desordens orais potencialmente malignas

Desordens orais potencialmente malignas (DOPM) é a nomenclatura mais adequada para um grupo de lesões ou distúrbios da mucosa que podem preceder câncer de lábio ou intraoral (WARNAKULASURIYA, KUJAN, MOLES *et. al.*, 2020; LOCCA, SOLLECITO, ALAWI *et. al.*, 2019; SPEIGHT, KHURRAM, KUJAN, 2017). As DOPM necessitam de acompanhamento e rastreamento por serem lesões com curso imprevisível: podem permanecer estáticas e sem alterações clínicas por longos anos, mas podem também progredir ou regredir. Apesar de alguns estudos mostrarem que uma minoria das DOPM apresenta transformação maligna, é conhecido também que pacientes que apresentam essas desordens são também mais susceptíveis a desenvolver CEC em outros locais da boca, uma vez que uma mucosa clinicamente normal pode ser molecularmente e/ou histologicamente

anormal (WARNAKULASURIYA, KUJAN, MOLES *et. al.*, 2020; LOCCA, SOLLECITO, ALAWI *et. al.*, 2019; SPEIGHT, KHURRAM, KUJAN, 2017). Além disso, são consideradas também um fator que pode intensificar o risco de desenvolvimento de CEC oral. As lesões bucais de pacientes com AF são consideradas DOPM (WARNAKULASURIYA, KUJAN, MOLES *et. al.*, 2020; LOCCA, SOLLECITO, ALAWI *et. al.*, 2019; SPEIGHT, KHURRAM, KUJAN, 2017). Dessa forma, medidas para acompanhamento mais próximo e rastreamento se fazem necessárias nesse grupo de pacientes.

3.2 Citologia esfoliativa

As DOPM geralmente apresentam displasia epitelial que são mais fidedignamente identificadas histopatologicamente após coleta do tecido por meio de biópsia incisional. A biópsia é considerada padrão ouro para análise e diagnóstico definitivo, porém, trata-se de um procedimento invasivo, que necessita de preparo e tempo para realização. Além disso, por envolver anestesia e possibilidade de sintomatologia dolorosa pós-operatória, pode ser motivo de estresse e/ou ansiedade ao paciente (NANAYAKKARA, DISSANAYAKA, NANAYAKKARA *et. al.*, 2016). Pacientes diagnosticados com doenças hematológicas ou onco-hematológicas ainda apresentam o agravante de ter maior predisposição para infecções oportunistas pós-operatórias e sangramento trans e/ou pós-operatório, devido à presença de pancitopenia ou plaquetopenia (VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

A citologia consiste no estudo morfológico e morfométrico de células descamadas de uma mucosa. A técnica é bastante utilizada na ginecologia com o objetivo de diagnosticar precocemente câncer de útero ou lesões potencialmente malignas da mucosa uterina (NANAYAKKARA, DISSANAYAKA, NANAYAKKARA *et. al.*, 2016). Essa abordagem foi sugerida por Papanicolau e Traut em 1943 (TRAUT, PAPANICOLAU, 1943). Após divulgação do estudo de Papanicolau, a aplicabilidade da citologia esfoliativa foi expandida também para esôfago, estômago, brônquios e cavidade oral (NANAYAKKARA, DISSANAYAKA, NANAYAKKARA *et. al.*, 2016).

A utilização de citologia oral iniciou-se em 1963, porém, seu uso foi limitado devido à baixa sensibilidade e especificidade para detecção de displasia e malignidade. Com o passar dos anos, houve melhorias na técnica de citologia esfoliativa e a mesma passou a ser considerada promissora para triagem de

pacientes e também avaliação/acompanhamento de DOPM (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et. al.*, 2007; ALSARRAF, KUJAN, FARAH, 2018).

O uso de citologia esfoliativa como técnica para análise de células descamadas da mucosa oral de pacientes com maior susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de boca vem sendo estudado a anos, com o objetivo de auxiliar no diagnóstico precoce de malignidades orais (ACHA, RUESGA, RODRÍGUEZ *et. al.*, 2005). Baixo custo, facilidade de realização, ausência de sintomatologia dolorosa e segurança do procedimento são motivos pelos quais a técnica vem sendo aperfeiçoada para melhora da confiabilidade de seus resultados quando realizada em cavidade oral (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et. al.*, 2007).

A técnica de citologia consiste em coletar células descamadas de uma mucosa ou tecido com o auxílio de um instrumento. As amostras podem ser coletadas com espátulas plásticas, de madeira ou metálicas e também com um instrumento confeccionado para esse fim, o qual recebe o nome de citobrush ou escova endocervical (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et al.*, 2007). Dessa forma, raspa-se suavemente a superfície coletando algumas células do órgão ou tecido a ser estudado (NANAYAKKARA, DISSANAYAKA, NANAYAKKARA *et. al.*, 2016)

Um estudo de Nanayakkara *et. al.*, conduzido em 2016, avaliou a diferença no diagnóstico citológico comparando as técnicas de coleta das células descamadas de lesões pré-malignas orais por meio de espátulas de metal ou com o uso de escova endocervical. A análise foi realizada por meio da técnica de citologia esfoliativa convencional. Após a citologia, realizou-se biópsia incisional da mesma lesão para confirmação diagnóstica. O estudo concluiu que a coleta de células descamadas com o uso de escova endocervical é mais preciso e apresenta maior fidelidade para o diagnóstico de DOPM orais quando comparados a técnica da espátula, apresentando um esfregaço mais uniforme. Dessa forma, a citologia esfoliativa como complemento ao exame oral poderia possibilitar melhor acompanhamento/rastreamento de pacientes com maior predisposição para o desenvolvimento de CEC bucal, e, além disso, proporcionar diagnóstico precoce e diminuir a taxa de mortalidade associada ao mesmo.

A citologia esfoliativa oral para análise e diagnóstico de CEC oral ou DOPM é questionada pelo fato de que, em estágios iniciais, as células malignas podem não atingir o epitélio, sendo necessária uma amostragem de camadas mais profundas da

mucosa oral e esse fato poderia ocasionar resultados falsos negativos (NANAYAKKARA, DISSANAYAKA, NANAYAKKARA *et. al.*, 2016).

Por esse motivo, o uso de biomarcadores celulares pode ser implementado para a avaliação celular, aperfeiçoando a técnica e melhorando sua acurácia. A frequência de MN é um dos testes que pode ser utilizado com esse objetivo (JUNEJA, KATYAL, RATHORE, *et. al.*, 2019; RAMÍREZ, MINGUILLÓN, LOVELESS *et. al.*, 2020).

3.3 Micronúcleos

Micronúcleo (MN) é um núcleo adicional de uma célula separado do núcleo principal. Esse pode ser formado por cromossomos inteiros ou fragmentos de cromossomos que se perdem durante a mitose e aparecem no citoplasma das células divididas como pequenos núcleos adicionais (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et. al.*, 2007; UCHÔA, MAGALHÃES, 2019). A formação de MN pode ocorrer devido a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais. Os danos cromossômicos causados por fatores ambientais são em decorrência dos efeitos genotóxicos de substâncias como, por exemplo, álcool e tabaco (UCHÔA, MAGALHÃES, 2019). Em pacientes com AF, sua presença pode estar associada com a instabilidade cromossômica e falha no reparo do DNA, que já são características da doença (FURQUIM, PIVOVAR, AMENABAR *et. al.*, 2018; VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

O teste de micronúcleos consiste na avaliação de células com o objetivo de encontrar possíveis alterações cromossômicas. Lesões malignas são decorrência de várias alterações genéticas, e as mudanças morfológicas das células podem ser monitoradas por meio desse teste (UCHÔA, MAGALHÃES, 2019).

A frequência de MN é comumente utilizada para biomonitoramento e acompanhamento de pacientes expostos a fatores genotóxicos, que apresentem DOPM ou são diagnosticados com doenças que predispõem o desenvolvimento de CEC oral (UCHÔA, MAGALHÃES, 2019). A avaliação da frequência de MN de células descamadas da mucosa bucal pode ser utilizada para identificar a fragilidade e a perda cromossômica, tornando possível mensurar o potencial para

transformações malignas das células estudadas (JUNEJA, KATYAL, RATHORE, *et al.*, 2019; RAMÍREZ, MINGUILLÓN, LOVELESS *et al.*, 2020).

O teste de MN pode ser realizado após técnica de citologia esfoliativa convencional, de base líquida e também cultura de células. Sendo as duas primeiras mais utilizadas pelo custo e praticidade (UCHÔA, MAGALHÃES, 2019). A identificação de MN pode ser realizada por meio de diversas colorações, porém, a mais utilizada é a técnica de Feulgen, pelo fato de ser específica para o DNA, que é corado em rosa. A utilização dessa técnica auxilia na quantificação de DNA, além de análise de ploidia e fração proliferativa (CARRARD, COSTA, FERREIRA, *et al.*, 2007; UCHÔA, MAGALHÃES, 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de pesquisa

O seguinte trabalho trata-se de um estudo observacional transversal prospectivo.

4.2 Seleção do material bibliográfico

Os artigos científicos para o referencial teórico foram consultados nas bases de dados Scielo (<http://www.scielo.br/>), Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Portal de Periódicos Capes/Mec (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>) e na Biblioteca Virtual em Saúde (<http://bvsa.org/>).

4.3 Local de pesquisa

O estudo foi realizado no Ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) e no Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná.

4.4 Amostra

A amostra foi composta por conveniência incluindo um total de 51 pacientes. A amostra final somou 46 pacientes diagnosticados com AF em qualquer período da vida que realizam acompanhamento no CHC-UFPR, de ambos os sexos, pré e pós-TCTH e com idades variadas entre 4 e 42 anos. Os pacientes foram recrutados no ambulatório de AF da equipe de Odontologia do STMO que acontece nas terças-feiras pela manhã.

4.4.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos na pesquisa pacientes diagnosticados com AF, com mucosa íntegra ou que apresentassem DOPM, de ambos os sexos, sendo já transplantados ou pré TCTH, sem faixa etária pré-determinada, incluindo crianças, adolescentes, adultos jovens e adultos.

Pacientes com hábito de tabagismo ou etilismo foram incluídos na amostra pois os hábitos nocivos são considerados fatores cumulativos para o aumento dessa predisposição.

Foram considerados inaptos a participar do estudo os pacientes que se recusaram a assinar os termos de consentimento da pesquisa ou que tinham alguma alteração física/sistêmica/cognitiva que poderia impedir o exame físico bucal e/ou a coleta das células descamadas da mucosa oral.

Cinco pacientes foram excluídos da amostra, uma vez que esses apresentavam histórico CEC oral prévio já tratado ou lesões bucais com aspecto sugestivo de malignidade clinicamente em processo de investigação e confirmação diagnóstica.

4.5 Aspectos éticos

O presente projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humano (CEP) do Complexo Hospital De Clínicas da UFPR, e o recrutamento de pacientes só foi iniciado após a aprovação, sob o número CAAE: 53235921.3.0000.0096 (anexo G).

Os coordenadores responsáveis pelo ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) e pelo ambulatório de Odontologia foram informados sobre o projeto de pesquisa e autorizaram a execução do mesmo.

Para assegurar a privacidade dos pacientes participantes, os dados coletados foram e continuam protegidos e confidenciais, não sendo divulgada nenhuma informação que possa comprometer a identidade dos mesmos, apenas as específicas, que são necessárias para a construção deste trabalho.

Os participantes da pesquisa assinaram o Termo De Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), o qual foi escrito de forma simples para que os pacientes e seus responsáveis pudessem compreender os procedimentos a quais foram submetidos. Dois termos diferentes foram escritos, um TCLE para adultos e um TLCE para responsáveis (participantes com menos de 12 anos de idade) (Anexos A e B, respectivamente). Para os participantes com menos de 18 anos de idade e mais de 12 anos de idade ou legalmente incapazes, foi fornecido o Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE) (Anexo C).

4.5.1 Riscos e Benefícios

A coleta das células descamadas da mucosa oral é um procedimento rápido, seguro e de fácil realização. Porém, em casos de lesões orais com sintomatologia dolorosa, a coleta das células pode causar leve desconforto. Em casos onde as mucosas bucais apresentem-se ressecadas, pode, além de leve desconforto, ocorrer lesões associadas a fricção e sangramento leve.

Os pacientes são beneficiados de forma direta com o acompanhamento odontológico realizado no ambulatório e com estratégias para prevenção do câncer de boca.

4.6 Procedimentos metodológicos

Os procedimentos metodológicos ocorreram em duas etapas: clínica e laboratorial. A história clínica do paciente, como demais diagnósticos, histórico de TCTH, doador e informações demográficas e epidemiológicas foram coletadas no banco de dados eletrônicos da equipe de odontologia, em prontuários físicos e

confirmadas com os pacientes/responsáveis. Essas informações foram anotadas na ficha clínica confeccionada especificamente para a pesquisa, que pode ser visualizada no anexo D.

Os pacientes foram divididos em 3 grupos:

- 1) Pacientes diagnosticados com AF sem TCTH sem DOPM;
- 2) Pacientes diagnosticados com AF pós TCTH sem DOPM;
- 3) Pacientes diagnosticados com AF pós TCTH com DOPM.

A examinadora foi calibrada para identificação e diagnóstico de DOPM em pacientes com AF. E também foi calibrada para realização da técnica de citologia esfoliativa convencional e teste de MN, desde a coleta das células descamadas da mucosa oral, coloração e montagem das lâminas, até a identificação e contagem de MN.

4.6.1 Etapa clínica

A etapa clínica foi realizada no ambulatório de AF do STMO do CHC-UFPR.

Essa foi constituída de exame clínico, busca de informações sobre a história clínica do paciente em prontuários, fotografias de lesões apresentadas de forma que não possibilite a identificação do paciente e coleta de células descamadas da mucosa bucal. Informações como a realização ou não de TCTH, doador e tempo pós transplante, hábitos nocivos (como uso de tabaco e álcool), histórico de Doença do Enxerto contra Hospedeiro (DECH) e presença ou ausência de DOPM foram investigadas e anotadas em ficha específica para avaliação clínica (anexo D).

O exame clínico foi realizado no consultório Odontológico do STMO com boa iluminação e auxílio de gaze e espátulas de madeira, para que as mucosas pudessem ser devidamente afastadas para avaliação e busca de lesões bucais.

Após o exame físico e anteriormente às coletas, foram realizadas fotografias das lesões orais apresentadas pelos pacientes. As fotografias das DOPM identificadas foram realizadas para que as características clínicas das lesões apresentadas pudessem ser mais detalhadamente observadas e comparadas com a frequência relativa de MN (FRMN) identificada posteriormente. Critérios como homogeneidade, textura, extensão e localização da lesão são importantes para

mensuração do potencial de malignização clínico. A associação das características clínicas das DOPM com a FRMN pode ser útil para definir critérios de rastreamento e monitoramento dos participantes do estudo.

Foram coletadas células epiteliais descamadas de pacientes que apresentavam DOPM e também em mucosa íntegra, para posterior análise por meio de citologia esfoliativa convencional. A coleta de células foi realizada em borda lateral de língua e mucosa jugal, bilateralmente, de todos os pacientes participantes do estudo, sendo elas íntegras ou com DOPM, identificando na ficha clínica a situação da mucosa oral de onde as células descamadas foram coletadas (íntegra ou com DOPM), além de todas as mucosas com DOPM identificadas na amostra (anexo D). Dessa forma, foram realizadas, no mínimo, 4 coletas de células descamadas da mucosa oral por paciente para posterior análise microscópica, além das amostras de mucosas com DOPM. O máximo de amostras extras coletadas por paciente foi de 3. Em pacientes que apresentavam DOPM generalizadas, utilizou-se os critérios clínicos para seleção do local de coleta de células, como por exemplo, a homogeneidade, extensão, textura, sintomatologia, tempo de aparecimento e localização da lesão.

As DOPM identificadas foram classificadas de acordo com as características e diagnóstico clínico em: leucoplasia, leucoeritroplasia, eritroplasia, queilite actínica e lesões liquenóides orais sem tratamento (LLOST). Não foram realizadas biópsias incisionais para confirmação diagnóstica.

Para facilitar a coleta, as mucosas foram levemente afastadas com gaze, evitando o reflexo do paciente e melhorando a visualização do local. As células epiteliais descamadas foram coletadas com o auxílio de escova endocervical (*cytobrush*), em movimentos rotatórios e o esfregaço foi posteriormente disposto sobre uma lâmina de vidro, em sentido único e movimentos rotatórios, com objetivo de transpassar todas as células coletadas sem sobreposição. Além disso, foi realizado o transpasse de uma lâmina de vidro sobre a outra, proporcionando o melhor espalhamento dessas células e amostra duplicada de cada coleta de cada paciente. Posteriormente a essa etapa, as lâminas contendo as células coletadas e já identificadas com o local de coleta e número do participante, foram fixadas e armazenadas em imersão em álcool absoluto em frascos plásticos com suporte para lâminas devidamente identificados. As identificações das coletas foram realizadas

tanto nas próprias lâminas, em lápis, na parte fosca da lâmina de vidro, possibilitando o processamento e coloração sem esmaecer, como com etiquetas adesivas nos frascos porta lâminas. Todas as amostras foram coradas após o tempo mínimo de 2 horas de fixação em imersão em álcool absoluto.

4.6.2 Etapa laboratorial

A etapa laboratorial foi realizada no Laboratório de Patologia do Curso de Odontologia da UFPR, no campus Jardim Botânico.

Para coloração das lâminas foi utilizada a Reação de Feulgen, sendo essa específica para DNA, corando o núcleo e MN em rosa. Não foram utilizadas contra-colorações ou colorações adicionais.

O protocolo com o passo a passo seguido para a coloração e montagem das lâminas pode ser visualizado no anexo E, onde descreve detalhadamente cada solução utilizada e o tempo de imersão em cada uma delas. É importante ressaltar que o processamento foi realizado por imersão, com exceção das etapas de lavagem com água destilada. Além disso, o Reativo de Schiff teve sua filtração realizada previamente a cada uso e precisou ser preparado 3 vezes ao longo dos meses da pesquisa, por perder sua transparência e capacidade máxima de coloração. Mas, todas as novas preparações foram realizadas utilizando as mesmas dosagens e critérios estabelecidos e descritos no anexo E.

Após a coloração e montagem das lâminas, as mesmas foram armazenadas em caixas porta laminas separadas pelo grupo o qual o paciente participante estava agrupado.

A avaliação das lâminas e identificação/contagem dos MN foi realizada apenas pela pesquisadora principal e seguiu os seguintes passos:

- 1) Limpeza das sujidades da lâmina de vidro;
- 2) Foco micro e macroscópico e análise geral da lâmina e das células em menor aumento (5x);
- 3) Contagem da quantidade de células por estimativa e avaliação da morfologia das células (10x);

- 4) Visualização, identificação e contagem de MN (40x). Todos os MN identificados foram contados, além da quantidade de células micronucleadas. A lâmina foi avaliada em forma de ziguezague horizontalmente, iniciando pela esquerda da lâmina e percorrendo toda a sua extensão, sendo a técnica indicada para evitar resultados falsos-positivos e falsos-negativos;
- 5) Em caso de dúvidas ou para melhor análise das células, utilizou-se o maior aumento (100x) com auxílio de óleo de imersão;
- 6) Demais alterações nucleares como cariorrexe, picnose, cariólise, binucleação e *broken-eggs* não foram contabilizadas.

Para avaliação e identificação de MN seguiu-se os critérios básicos propostos por Tolbert, Shy & Allen (1992):

- 1) O MN deve apresentar perímetro redondo sugerindo uma membrana;
- 2) Deve apresentar tamanho igual ou menor que 1/3 do núcleo principal, mas grande o suficiente para identificar forma e cor;
- 3) Deve estar no mesmo plano focal que o núcleo;
- 4) Deve ser identificada ausência de sobreposição ou ligação com o núcleo principal;
- 5) Deve ser Feulgen Positivo, ou seja, corar em rosa;
- 6) Deve apresentar intensidade de coloração igual ou semelhante ao núcleo principal;
- 7) Deve apresentar textura similar ao núcleo principal.

A frequência de MN foi realizada com base na contagem manual do número de células, na contagem da quantidade de células micronucleadas e na contagem total da quantidade de MN encontrados. Esses dados foram descritos em ficha formulada especificamente para esse fim (anexo F). A sequência para avaliação das células se deu por grupos, iniciando pelo primeiro paciente do primeiro grupo até o último paciente do grupo 3. Além disso, uma sequência esquemática também foi seguida, iniciando por mucosa jugal direita, mucosa jugal esquerda, borda lateral de língua direita, borda lateral de língua esquerda e, nos casos de pacientes com

DOPM, as amostras extras. Cada alteração identificada foi anotada na ficha específica para a avaliação de MN.

A quantidade de MN por paciente foi contabilizada na forma de frequência relativa (FRMN), sendo proporcional a quantidade de 1000 células. A metodologia escolhida foi referenciada no estudo conduzido por Ramírez *et. al.*, em 2020, onde a frequência de MN foi investigada em pacientes com AF.

4.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados com os participantes separados nos 3 grupos já pré-estabelecidos conforme as variáveis que apresentavam, mas também com a amostra total sem divisões.

A influência dos dados clínicos na FRMN total de todos os pacientes foi avaliada por meio de regressão linear simples (Hair et al. 2009). Os modelos atenderam aos pressupostos de linearidade (confirmação gráfica), normalidade ($p > 0,05$), homocedasticidade ($p > 0,05$), ausência de outliers (-3,3) e independência dos resíduos. O Critério de Informação Akaike (AIC) foi utilizado para qualificação dos modelos (Akaike 1974, Burnham & Anderson, 2002). Todas as variáveis categorias (de acordo com os dados clínicos coletados) foram avaliadas separadamente afim de verificar sua influência, sem divisão por grupos.

A variável resposta utilizada nos testes de comparação foi a FRMN total, incluindo mucosas íntegras e DOPM daqueles que apresentavam (grupo 3). O teste do Qui-quadrado de Aderência e Independência foi utilizado para comparação das FRMN total entre os grupos. O valor de significância considerado para todos os testes foi de 0,05. A representação das diferenças se deu por meio de gráficos de barras que acompanham barras de erro padrão.

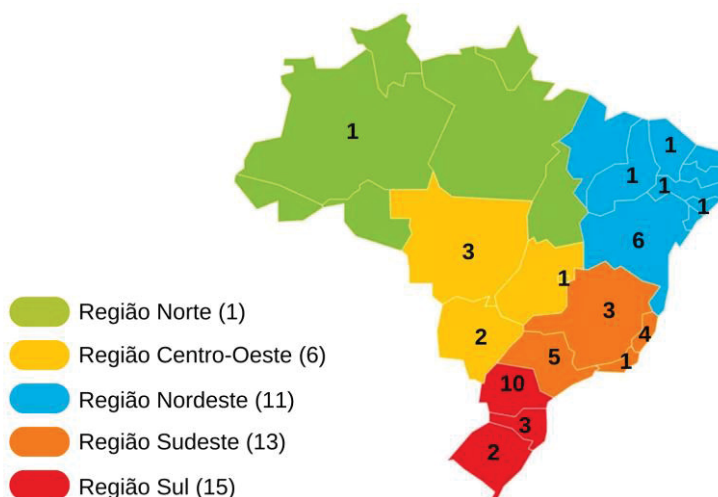
Para comparação da FRMN total entre os pacientes, foi realizado o teste de Wilcoxon para a amostra total, sem separação por grupos, que foram organizados em forma de gráfico de barras para melhor visualização.

5. RESULTADOS

Foram incluídos na amostra 46 pacientes com diagnóstico de AF em qualquer período da vida, sendo 27 mulheres e 19 homens, que foram divididos em 3 grupos. O grupo 1 foi composto por 14 pacientes, o grupo 2 por 13 pacientes e o grupo 3 por 19 pacientes.

Participaram do estudo pacientes procedentes de todas as regiões do país (figura 1), sendo a maior parte do sul (15), sudeste (13) e nordeste (11).

Figura 1. Mapa do Brasil dividido por estados e regiões, demonstrando a quantidade de participantes em cada uma delas.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

A idade dos participantes variou de 4 a 42 anos. Em relação a cor de pele, os pacientes foram classificados em brancos e não brancos, sendo o maior grupo de participantes não brancos (31 pacientes).

Nas tabelas 1, 2 e 3 é possível encontrar os dados clínicos coletados para caracterização dos pacientes, descritos de forma mais detalhada.

A maior parte dos pacientes da amostra já realizaram TCTH (32). Em relação ao tipo de TCTH, seguiu-se a seguinte classificação: não aparentado, aparentado (totalmente compatível ou compatibilidade maior que 50%) e haploidêntico (50% compatível ou menos), sem levar em consideração a fonte de coleta das células-tronco. Alguns pacientes foram submetidos há mais de um TCTH

com diferentes doadores. Os doadores familiares foram de 7 tipos, sendo que grande parte dos pacientes receberam as células-tronco de irmãos (16). O sexo dos doadores não aparentados não foram incluídos nos dados coletados pela dificuldade de fidedignidade da informação e por não constar em prontuário.

A DECH foi dividida apenas na presença ou ausência do histórico da doença, independentemente do órgão acometido. Dos 32 pacientes pós TCTH, apenas 11 relataram ter desenvolvido a DECH. Nenhum paciente apresentava DECH no momento da coleta de dados.

As DOPM manifestadas pelos pacientes incluídos no grupo 3 foram classificadas conforme o diagnóstico clínico e a localização da lesão. 19 pacientes apresentaram DOPM sendo que alguns deles tinham mais de uma. Todas as DOPM foram contabilizadas.

Quando questionados sobre hábitos nocivos como tabaco e álcool, um paciente relatou usar diariamente cigarro e um paciente relatou tomar cerveja diariamente antes de realizar o TCTH. Por causa da pequena amostragem, essas variáveis não foram testadas em relação a influência ou não na frequência de MN.

Tabela 1. Caracterização dos dados clínicos por separação de grupos.

Dados clínicos	Quantidades	Porcentagem (%)	Desvio padrão
GRUPO 1 - Sem TCTH sem DOPM			
Homens	6	42,8	-
Mulheres	8	57,1	-
Branco	2	14,3	-
Não brancos	12	85,7	-
Mediana das idades	6	-	6,55
GRUPO 2 - Pós TCTH sem DOPM			
Homens	7	53,9	-
Mulheres	6	46,1	-
Branco	5	38,5	-
Não Brancos	8	61,5	-
Mediana das idades	16	-	7
Mediana da idade quando realizou TCTH	9	-	5,2
Mediana do tempo pós TCTH	6	-	5,2
GRUPO 3 - Pós TCTH com DOPM			
Homens	6	31,6	-
Mulheres	13	68,4	-
Branco	8	42,2	-
Não Brancos	11	57,9	-
Mediana das idades	23	-	8,4
Mediana da idade quando realizou TCTH	12	-	10,6
Mediana do tempo pós TCTH	11	-	6,7

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Tabela 2. Descrição dos dados clínicos de TCTH dos pacientes incluídos nos grupos 2 e 3.

Variáveis	Categorias	Quantidade	Porcentagem (%)
Tipo TCTH (33)	Haploidêntico	8	24,2
	Aparentado	15	45,5
	Não aparentado	10	30,3
Doador Aparentado (23)	Irmãos	15	65,2
	Pais	5	21,7
	Primos	2	8,7
	Tios	1	4,3
Histórico de DECH (32)	Sim	11	34,4
	Não	21	65,6

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Tabela 3. Descrição dos dados clínicos de DOPM dos pacientes incluídos no grupo 3.

Variáveis	Categorias	Quantidade	Porcentagem (%)
Classificação DOPM (31)	Eritroplasia	1	3,2
	Leucoeritroplasia	1	3,2
	Leucoplasia	19	61,3
	LLOST	8	25,8
	Queilite Actínica	2	6,5
Localização DOPM (31)	Língua	12	38,7
	Lábio	3	9,7
	Gengiva	4	12,9
	Mucosa jugal	6	19,4
	Palato	5	16,1
	Trígono retromolar	1	3,2

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

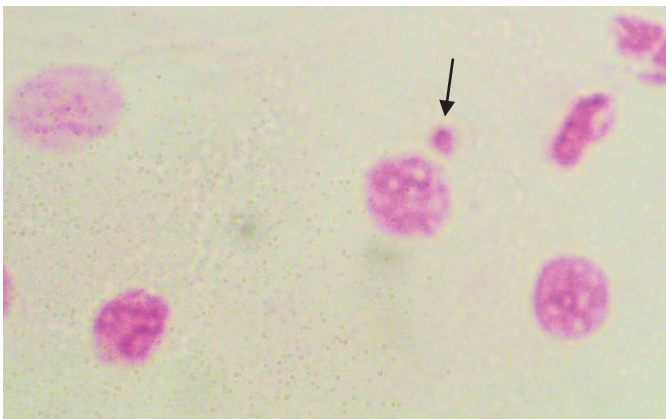
Para exemplificar as alterações nucleares identificadas nos participantes, algumas imagens foram anexadas. Na figura 2 podemos visualizar uma célula sem alterações em núcleo e citoplasma e apresentando padrão de normalidade. Nas figuras 3 e 4 podemos visualizar a principal alteração nuclear de importância para esse estudo: os MN.

Figura 2. Célula com coloração e formato normal. Coloração de Feulgen (400x).



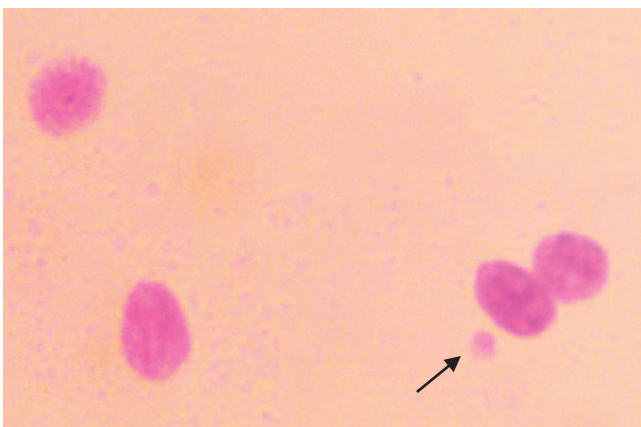
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 3. MN indicado pela seta. Coloração de Feulgen (400x).



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 4. MN indicado pela seta. Coloração de Feulgen (400x).



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Neste estudo, 46 pacientes foram avaliados e a média da FRMN total foi de 2,97, com um desvio padrão de 1,97. Foi realizado um teste de Wilcoxon para a amostra, que mostrou que não houve variação significativa ($W=542$, $p=0,986$) na FRMN total entre os pacientes.

Esses resultados sugerem que não há evidências suficientes para concluir que a média da população é significativamente diferente da média hipotética. Isso indica que, com base na FRMN total, os pacientes não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre eles.

A FRMN (a cada 1000 células) de cada participante separada nos grupos pré-definidos pode ser visualizada nas tabelas 4, 5 e 6. Sendo que a maior FRMN entre os pacientes do grupo 1 foi de 4,7; do grupo 2 foi de 4,6; já do grupo 3 foi de 9 e a menor de 2,6. Essa variabilidade pode ser também visualizada nas figuras 5 e 6. Os pacientes estão diferenciados pelo número da ficha clínica de coleta, permitindo a sua identificação para consulta e estabelecimento de condutas clínicas.

Na tabela 7 é possível observar a média, mediana e o desvio padrão da FRMN nos três grupos.

Tabela 4. FRMN total em ordem decrescente dos participantes do grupo 1.

Participante	FRMN
2	4,7
24	3
40	2,8
16	2,2
9	2
5	1,8
29	1,5
6	1,1
44	1
20	0,9
19	0,7
21	0,4
17	0
18	0

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Tabela 5. FRMN total em ordem decrescente dos participantes do grupo 2.

Participante	FRMN
51	4,6
11	3,7
38	3,7
1	3,5
28	3,5
27	2,4
22	1,8
36	1,7
35	1,4
25	1
13	0,5
8	0,4
12	0

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Tabela 6. FRMN total em ordem decrescente dos participantes do grupo 3.

Participante	FRMN
50	9
15	6,3
39	5,9
3	5,7
14	5,6
37	5,5
31	5,2
42	5
4	4,4
45	4,2
34	4,1
26	3,6
43	3,5
48	3,25
7	3,1
46	2,9
32	2,8
33	2,8
49	2,6

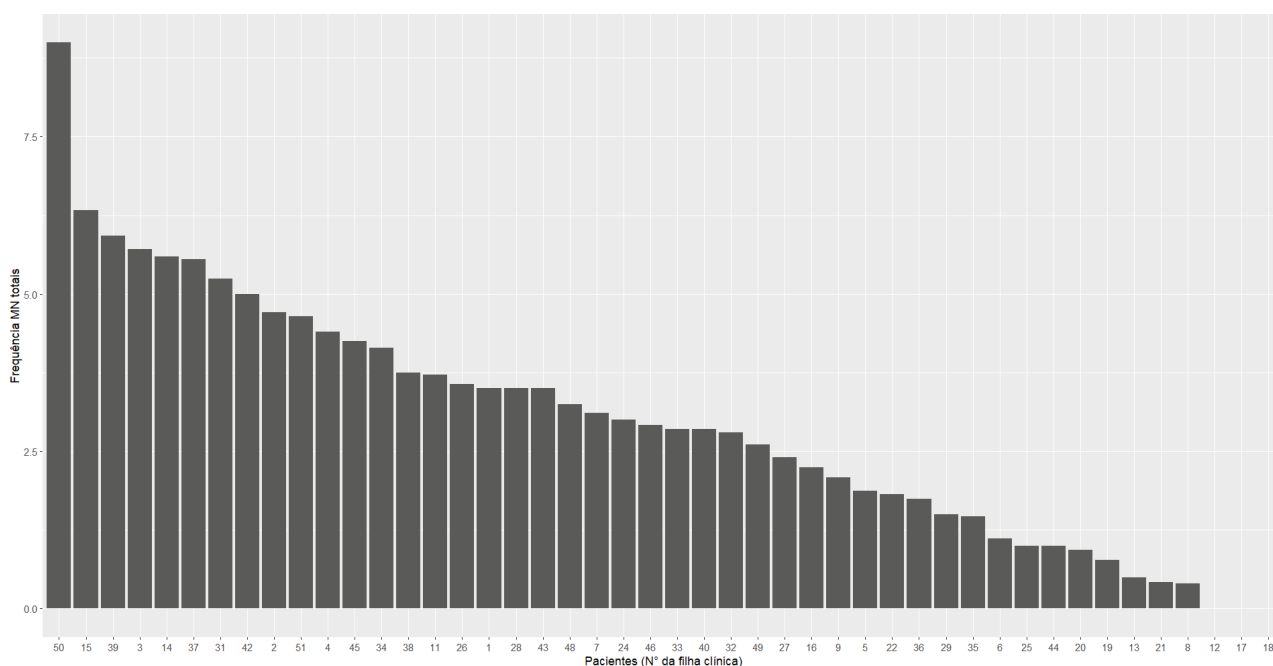
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Tabela 7. Média, mediana e desvio padrão da FRMN total nos três grupos.

Grupo	Média	Mediana	Desvio padrão
Grupo 1	1,57	1,3	1,3
Grupo 2	2,16	1,8	1,5
Grupo 3	4,49	4,2	1,6

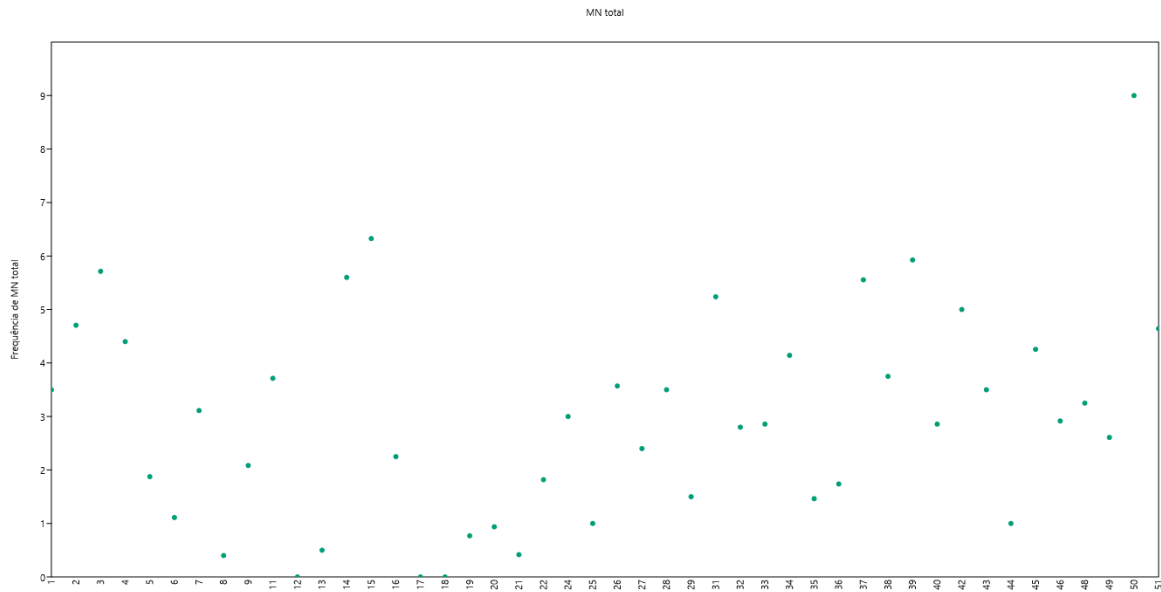
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 5. Gráfico de barras ordenadas demonstrando a variação da FRMN totais em todos os participantes.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

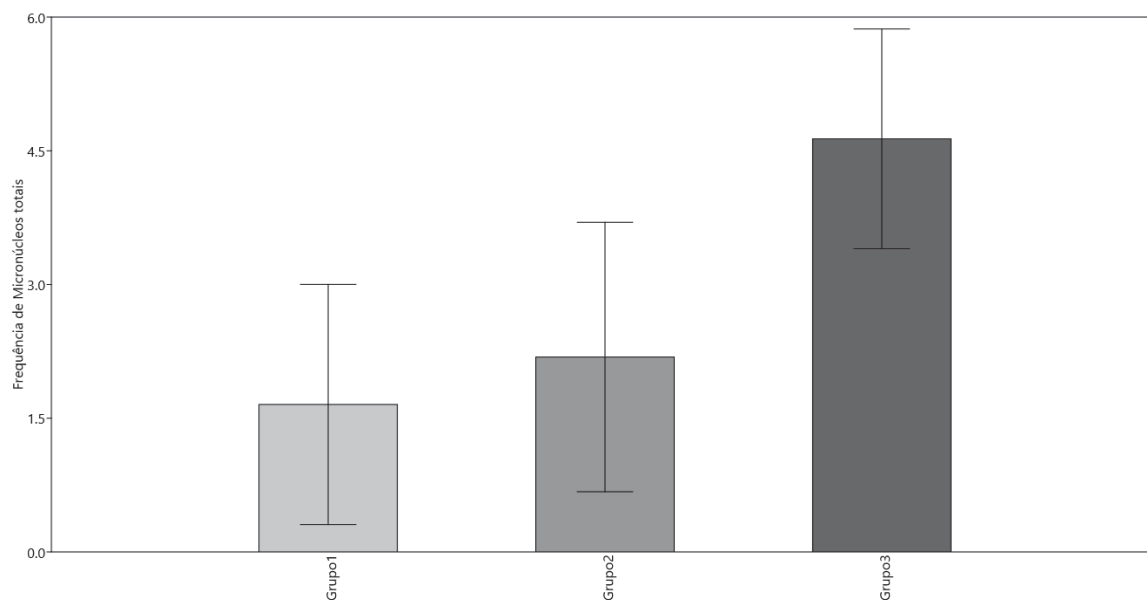
Figura 6. Gráfico de dispersão de pontos demonstrando a variabilidade da FRMN totais de todos os participantes.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

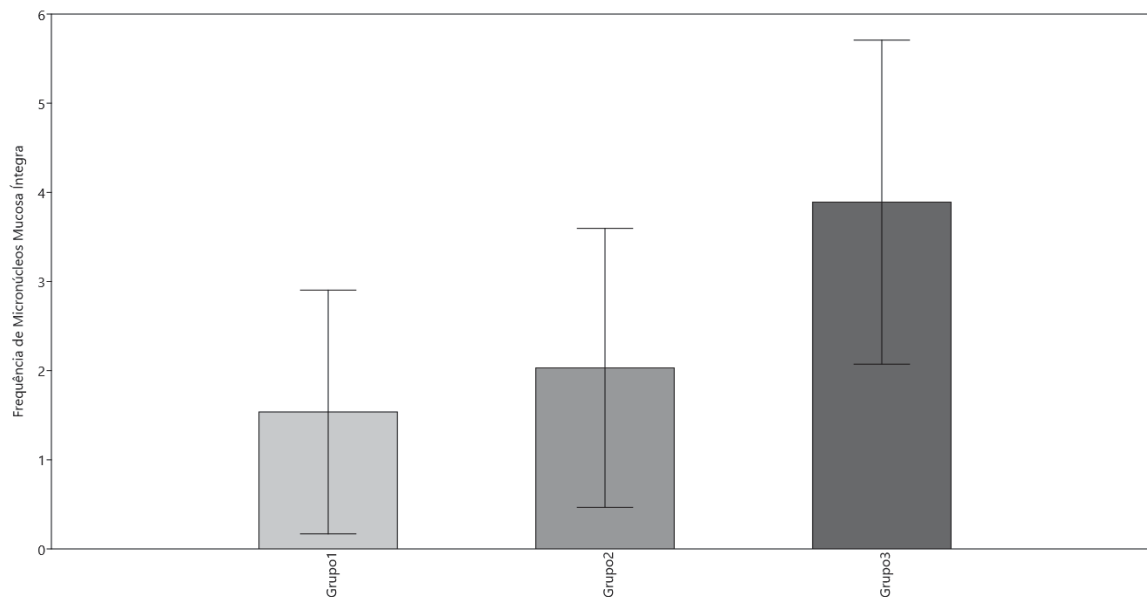
Quando comparada a FRMN total entre os 3 grupos, os resultados indicaram que, embora o grupo 3 apresente uma FRMN total maior, não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p=0,5539$) (figura 7). Quanto a FRMN em mucosa com DOPM, somente o grupo 3 apresentou valores para esta variável, o que impossibilitou a comparação entre os grupos. Adicionalmente, a comparação da FRMN apenas em mucosa íntegra entre os 3 grupos também não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,5456$), apesar de o grupo 3 também ter apresentado maior FRMN em mucosas íntegras (figura 8).

Figura 7. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN total entre os três grupos avaliados.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

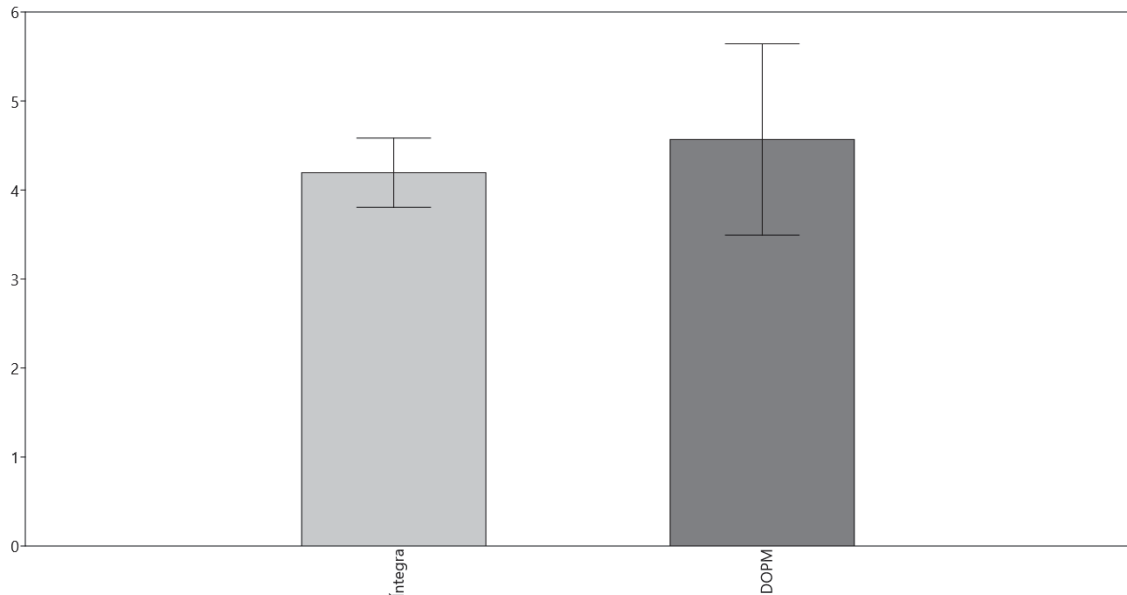
Figura 8. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em mucosa íntegra entre os três grupos avaliados.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Quando comparada a FRMN em mucosa íntegra e mucosa com DOPM dos participantes do grupo 3, foi possível identificar maior FRMN nas mucosas com DOPM (figura 9), havendo diferença estatística significativa ($p=0,0018$).

Figura 9. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em mucosa íntegra e mucosa com DOPM entre os pacientes do grupo 3.

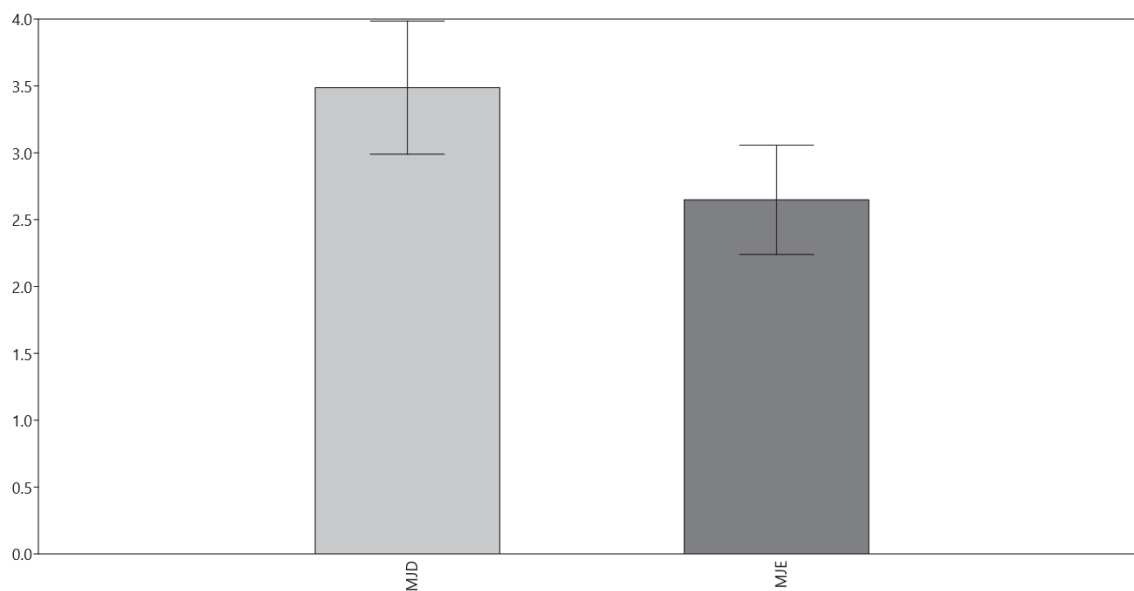


Fonte: Dados da pesquisa (2023)

As células epiteliais descamadas foram coletadas tanto em mucosa jugal bilateral quanto em bordo lingual bilateral. Foram realizados testes para comparar se há diferença na FRMN entre as mucosas nas duas lateralidades (direita e esquerda). Na mucosa jugal do lado direito (MJD) a média da FRMN é 24,8 e no lado esquerdo (MJE) a média é 21,6 (figura 10). Apesar disso, não há diferença estatística significativa entre os dois lados ($p=0,2305$).

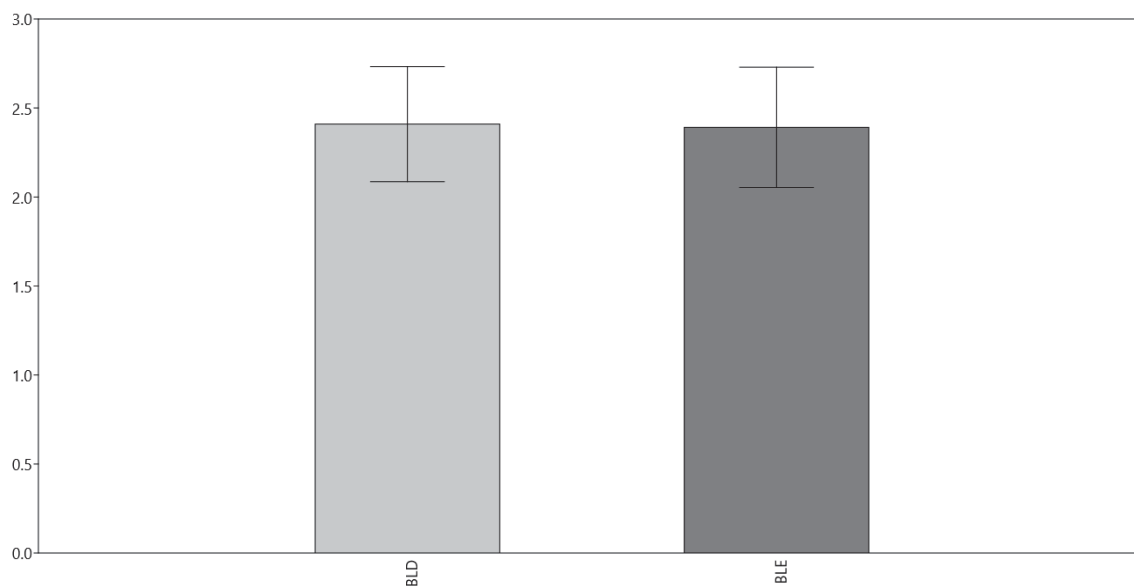
Em bordo lingual do lado direito (BLD) a média da FRMN é 23,5 e no lado esquerdo (BLE) é 22,9 (figura 11) e também não foi encontrada diferença estatística na FRMN nos dois lados da língua ($p=0,8114$).

Figura 10. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em MJD e MJE de todos os participantes.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 11. Gráfico de barras com barras de erro padrão para comparação da FRMN em BLD e BLE de todos os participantes.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

A regressão linear simples foi realizada para verificar a influência dos dados clínicos na FRMN total dos participantes da pesquisa. Dessa forma, constatou-se

que a idade tem impacto significativo na FRMN total ($R^2=0,3666$; $F=6,498$; $p<0,0001$) e os resultados indicam que a faixa etária de 26 a 30 anos apresenta a maior FRMN total ($t=4,626$; $p<0,0001$). A análise também revelou que o sexo não tem impacto significativo na FRMN total ($R^2=0,0265$; $F=2,553$; $p=0,1157$). Já a cor da pele apresentou impacto significativo na FRMN total ($R^2=0,1309$; $F=9,583$; $p=0,0030$), demonstrando que os pacientes que se autodeclararam não brancos apresentam a maior FRMN total ($t=-3,096$; $p<0,0030$). Em relação a idade que o paciente tinha quando realizou o TCTH, não foi identificada associação com maior FRMN total ($R^2=-0,0860$; $F=0,3188$; $p=0,8986$). Mas o tempo pós TCTH tem impacto significativo na FRMN total ($R^2=0,4129$; $F=8,559$; $p<0,0001$) e os resultados indicam que pacientes com tempo pós TCTH entre 16 a 20 anos apresentam maior FRMN total ($t=4,735$; $p<0,0001$). O tipo de TCTH que o paciente realizou ($R^2=0,0910$; $F=2,077$; $p=0,1025$) e quem foi seu doador ($R^2=-0,0745$; $F=0,1253$; $p=0,7495$) não têm impacto significativo na FRMN total.

A análise de regressão linear simples revelou que os pacientes sem histórico de DECH apresentam maior FRMN total ($t=3,169$; $p<0,0028$). Além disso, o teste demonstrou que a presença ($R^2=0,107$; $F=1,899$; $p=0,1408$) e a localização de DOPM ($R^2=0,0225$; $F=1,086$; $p=0,4083$) não demonstraram impacto significativo na FRMN total.

6. DISCUSSÃO

O teste de frequência de MN é frequentemente utilizado para avaliar instabilidade cromossômica e danos genotóxicos em células esfoliadas da cavidade oral de diferentes grupos de pacientes. Há estudos onde esse biomarcador celular foi aplicado em pacientes fumantes, em pacientes expostos a agrotóxicos, em pacientes com CEC oral, e em pacientes com DOPM ou outras lesões bucais, como por exemplo, líquen plano oral (CHATTERJEE *et. al.*, 2009; JADHAV *et. al.*, 2011; VIDYALAKSHMI *et. al.*, 2016; JUNEJA *et. al.*, 2019; UCHÔA *et. al.*, 2019). Um estudo realizado por Juneja *et. al.*, (2019) que avaliou a melhor coloração para identificação de MN chegou à conclusão que as colorações mais adequadas para investigação de MN são as específicas para DNA, como por exemplo, a reação de Feulgen, que foi a utilizada nesse estudo. Segundo os autores, estudos onde

colorações não específicas para DNA foram utilizadas, como, por exemplo, a coloração de Giemsa, maior FRMN é identificada, e isso provavelmente acontece pela alta probabilidade de resultados falsos-positivos.

Até o momento, consta na literatura apenas um estudo, conduzido por Ramírez *et. al.*, em 2020, que aplicou o teste de frequência de MN em células epiteliais bucais de pacientes com AF. As principais diferenças deste artigo quando comparado ao nosso estudo é a presença de um grupo controle com 24 pacientes não diagnosticados com AF, e, que a técnica para coleta dos esfregaços celulares se deu por meio da citologia esfoliativa em base líquida. Em nosso estudo, optou-se por não realizar coleta de células descamadas da cavidade oral de pacientes sem AF e a técnica utilizada foi a citologia esfoliativa convencional, devido a facilidade de aplicabilidade e baixo custo do método, considerando as limitações do laboratório de estudo. Já em relação a amostra, a quantidade de participantes diagnosticados com AF é semelhante, uma vez que no estudo conduzido por Ramírez e colaboradores (2020) foram incluídos 40 participantes diagnosticados com AF e em nosso estudo a amostra totalizou 46 pacientes. Outra diferença é que a coleta de células foi realizada apenas em mucosa jugal íntegra bilateralmente. Já em nosso estudo, optamos por coletar células epiteliais descamadas de mais de uma mucosa, objetivando maior quantidade de células para amostra. E por isso, foram coletadas células também de bordo lingual bilateral. Além disso, como pacientes com AF frequentemente apresentam DOPM, acreditamos ser necessária a avaliação da FRMN nas lesões identificadas nesse grupo de pacientes, buscando identificar se a FRMN é maior em mucosas íntegras ou em DOPM, possibilitando a mensuração e comparação do potencial de transformação maligna dessas células.

A quantidade de células avaliadas variou bastante nos estudos onde o teste de MN foi aplicado. Há estudos que realizaram a FRMN a cada 100, 500, 1000 e até 2000 células (CASARTELLI *et. al.*, 2000; HOLLAND *et. al.*, 2008; CHATTERJEE *et. al.*, 2009; JHADAV *et. al.*, 2011; GUPTA *et. al.*, 2019). Em nosso estudo, optou-se por calcular a FRMN a cada 1000 células, utilizando metodologia semelhante à pesquisa conduzida por Ramírez *et. al.*, (2020), uma vez que é o artigo que mais se assemelha a nossa investigação.

A FRMN esperada para a população geral - pacientes sem AF - pode variar de 0,5 a 2,5 MN a cada 1000 células (CASARTELLI *et. al.*, 2000; HOLLAND *et. al.*,

2008; RAMÍREZ *et. al.*, 2020), e, dessa forma, considera-se que pacientes com FRMN acima de 2,5 apresentam maior risco de desenvolver CEC oral. Dos 46 participantes deste estudo, 28 pacientes apresentaram FRMN acima de 2,5.

Ramírez *et. al.* (2020) encontrou 4 de FRMN total das mucosas jugal em pacientes com AF, sendo três vezes maior que o grupo controle, que foi de aproximadamente 1,3. Em nosso estudo, a maior FRMN total foi de 9 (em um paciente do grupo 3), sendo a média de todos os participantes de 2,9, e tendo três que apresentaram FRMN igual a 0. Os pacientes com maior FRMN são os participantes do grupo 3 – pós TCTH e com DOPM, sendo que a menor FRMN nesse subgrupo foi 2,6, ou seja, maior do que o limite superior do esperado para a população sem AF, segundo Casartelli *et. al.*, (2000) e Holland *et. al.*, (2008). Os participantes com FRMN igual a zero foram um do grupo 1 e dois do grupo 2. Já a maior FRMN total no grupo 1 foi de 4,7 e no grupo 2 de 4,6, sendo números extremamente semelhantes com os encontrados por Ramírez *et. al.*, (2020) na amostra de pacientes com AF, e nesses três casos, aplicou-se o teste de MN apenas em mucosas íntegras.

A realização de TCTH está associada com maior FRMN total nos pacientes com AF, porém, o tipo de TCTH e quem foi o doador não parece exercer influência. Já o tempo pós TCTH sim, uma vez que a análise de regressão linear demonstrou significância estatística e identificou que pacientes com tempo pós TCTH entre 16 a 20 anos apresentam maior FRMN. Esses resultados estão de acordo com dados já bem documentados na literatura que demonstram que a realização do TCTH aumenta a predisposição para o desenvolvimento de CEC oral e que quanto maior o tempo pós transplante, maior essa susceptibilidade (FURQUIM, PIVOVAR, AMENABAR *et. al.*, 2018; VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

Quando comparado pacientes com AF sem TCTH e pós TCTH, os pesquisadores (Ramírez *et. al.*, 2020) identificaram maior FRMN nos pacientes não transplantados. Os autores justificam esse resultado relatando que a realização do TCTH proporcionaria a eliminação de células com instabilidade cromossômica, uma vez que o paciente com AF vai receber as células-tronco de uma pessoa sem AF e que, possivelmente, não apresentaria danos genotóxicos nas células. Porém, em nosso estudo, a média da FRMN nos grupos 1 e 2 foi de 1,57 e 2,16, respectivamente, demonstrando que o grupo 2 - pós TCTH sem DOPM - apresentou

uma média de FRMN maior quando comparado com os pacientes do grupo 1 (não transplantados e sem DOPM). Dessa forma, esse resultado corrobora com a literatura, uma vez que a maior FRMN demonstraria maior potencial de transformação maligna das células avaliadas, e, sabe-se que a realização de TCTH aumenta ainda mais a predisposição a CEC oral em pacientes com AF (FURQUIM, PIVOVAR, AMENABAR *et. al.*, 2018; VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

Em relação aos dados sociodemográficos, como por exemplo, o sexo biológico, não foi identificada influência na FRMN. Já a cor da pele parece influenciar na FRMN, sendo que a cor do tipo não branca apresentou maior FRMN. Mas, é importante destacar que a maior parte dos participantes do estudo se autodeclararam como não brancos (33) e essa influência pode estar associada com a grande amostragem. A idade dos pacientes também parecer ter influência na maior FRMN e a faixa etária de 26 a 30 anos apresentou a maior FRMN total. Isso poderia estar relacionado com o fato de que os pacientes com AF estão sendo diagnosticados mais precocemente e dessa forma, sendo submetidos ao TCTH ainda na infância, melhorando a taxa de sobrevivência. Dessa forma, os pacientes diagnosticados com AF estão vivendo mais e tendo mais tempo pós TCTH, o que aumentaria o risco de desenvolver CEC oral (FURQUIM, PIVOVAR, AMENABAR *et. al.*, 2018; VELLEUER, DIETRICH, POMJANSKI *et. al.*, 2020).

A média da FRMN total no grupo 3 foi de 4,49, e quando comparada a FRMN das mucosas íntegras com as mucosas com DOPM do grupo 3, foi encontrada diferença estatística significativa ($p=0,0018$), o que poderia sugerir que os pacientes diagnosticados com AF que apresentem DOPM têm maior potencial de transformação maligna das células bucais em comparação com as mucosas íntegras. Em mucosas com DOPM em pacientes diagnosticados com AF não há ainda na literatura números que possibilitem comparações. Um estudo conduzido por Gupta *et. al.*, (2019), avaliou a FRMN (a cada 1000 células) em pacientes com leucoplasia oral, fibrose submucosa oral e líquen plano oral, sendo a amostra de 40 pacientes para cada subtipo de DOPM. Como resultados, os autores encontraram FRMN de 1,5 para fibrose submucosa oral, 1,7 para líquen plano e 2,3 para leucoplasia, sendo que os dados de fibrose submucosa oral e líquen plano oral foram parecidos com a média da FRMN no grupo 1 (1,57), porém, bem menores

quando comparados a média da FRMN do grupo 3, que apresentavam DOPM. A maior parte dos pacientes com DOPM apresentaram lesões compatíveis clinicamente com leucoplasia oral e a localização mais acometida foi a língua. Apesar de tudo isso, os testes estatísticos não demonstraram que a presença de DOPM, o diagnóstico clínico ou a localização interferiram na FRMN.

Os pesquisadores (Ramírez *et. al.*, 2020) também identificaram diferença estatística significativa quando compararam a FRMN em uma mucosa jugal com a outra e por isso sugerem maior potencial de transformação maligna das células de uma mucosa jugal do que a outra. Outro estudo, onde o teste de MN foi aplicado em pacientes com xeroderma pigmentoso, os autores também identificaram FRMN desigual em diferentes locais da mucosa oral (ROSIN *et. al.*, 1994). Em nosso estudo, apesar de haver diferença na FRMN quando comparada as mucosas jugal e bordas lingual direitas e esquerdas, o resultado não foi considerado estatisticamente significativo. Dessa forma, nosso estudo não sugere o maior potencial de transformação maligna comparando a lateralidade das mucosas e acredita-se que as mucosas não devem ser avaliadas de forma isolada, e por isso, optou-se por trabalhar com a FRMN total. Assim, a maior FRMN total demonstra maior instabilidade cromossômica e danos genotóxicos, sugerindo maior potencial de transformação maligna e exigindo monitoramento tempestivo dos pacientes com AF com maior FRMN total. Os estudos demonstram que é maior o índice de confiabilidade do teste de MN sem separação por mucosas, porém, dessa forma não é possível prever em qual localização da boca o paciente apresenta maior risco de desenvolver CEC oral (ROSIN *et. al.*, 1994; RAMÍREZ *et. al.*, 2020). Mas, esse fato é bastante semelhante com a presença de DOPM, já que o paciente diagnosticado com uma DOPM apresenta maior potencial de desenvolver CEC oral, sendo que essa pode ser proveniente da lesão prévia, ou em qualquer outra mucosa oral íntegra, já que uma mucosa clinicamente sem alterações nem sempre é uma mucosa citologicamente e molecularmente íntegra (WARNAKULASURIYA, KUJAN, MOLES *et. al.*, 2020; LOCCA, SOLLECITO, ALAWI *et. al.*, 2019; SPEIGHT, KHURRAM, KUJAN, 2017).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pacientes com AF apresentam alta FRMN tanto em mucosas íntegras quanto em mucosas com DOPM e essa frequência é intensificada em pacientes já transplantados e quanto maior o tempo pós TCTH. Uma vez que os MN são provenientes da instabilidade cromossômica e decorrentes da genotoxicidade imposta às células, acredita-se que quanto maior a FRMN que um paciente apresentar, maior a probabilidade de desenvolver CEC oral.

Dessa forma, o teste de FRMN pode ser um método complementar para mensurar a predisposição de pacientes diagnosticados com AF para o desenvolvimento de CEC oral podendo auxiliar na tomada de decisões, permitindo que a equipe multiprofissional desenvolva medidas para maior acompanhamento do grupo de risco, como, por exemplo, menor intervalo de tempo entre as consultas de rotina e rastreamento de DOPM, favorecendo o diagnóstico precoce e possibilitando melhor prognóstico e sobrevida.

REFERÊNCIAS

ACHA, A.; RUEGA, M.T.; RODRÍGUEZ, M.J.; PANCORBO, M.A.M.; AGUIRRE, J.M. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) em ler câncer y precâncer oral. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 10, p. 95-102, 2005.

AGUIRRE-URIZAR, J.; LAFUENTE-IBAÑES, M.; WARNAKULASURIYA, S. Malignant transformation of oral leukoplakia: systematic review and meta-analysis of the last 5 years. **Oral Diseases**. 2021

ALSARRAF, A.H.; KUJAN, O.; FARAH, C.S. The utility of oral brush cytology in the early detection of oral câncer and oral potentially malignant disorders: a systematic review. **J Oral Pathol Med**. v. 47, n. 2, p. 104-116, 2018.

AMENÁBAR, J.M.; TORRES-PEREIRA, C.C.; TANG, K.D; PUNYADEERA, C. Two Enemies, One Fight: An Update of Oral Cancer in Patients With Fanconi Anemia. **Cancer**. v.125, n.22, p. 3936-3946, 2019.

CARRARD, V.C.; COSTA, C.H.; FERREIRA, L.A.; LAUXEN, I.S.; RADOS, P.V. Teste dos Micronúcleos - Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da faculdade de Odontologia de Porto Alegre**. v. 48, n.1, p. 77-81, 2007.

CASARTELLI, G.; BONATTI, S.; DE FERRARI, M.; SCALA, M.; MEREU, P.; MARGARINO, G.; ABBONDANDOLO, A. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. **Analytical and quantitative cytology and histology**, 22 (2000) 486-492.

CHATTERJEE, S.; DHAR, S.; SENGUPTA, B.; GHOSH, A.; DE, M.; ROYA, S.; RAYCHOWDHURY, R.; CHAKRABARTI, S. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: The micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**. v.19, n.9, p. 427-433, 2009.

FURQUIM, C. P.; PIVOVAR, A.; AMENABAR, J.M.; BONFIM, C.; TORRES-PEREIRA, C.C. Oral cancer in Fanconi anemia: Review of 121 cases. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**. v. 125, p. 35–40, 2018

GUPTA, J.; GUPTA, K.; AGARWAL, R. Comparison of different stains in exfoliated oral mucosal cell micronucleus of potentially malignant disorders of oral cavity. **J Cancer Res Ther**. v.15, n.3 p. 615-619, 2019.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. 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**, 659 (2008) 93- 108.

JADHAV, K., GUPTA, N., AHMED, M.B.R. Micronuclei: an essential biomarker in oral exfoliated cells for grading of oral squamous cell carcinoma. **J Cytol**. v. 28, n.1, p. 1-12, 2011.

JUNEJA, S.; KATYAL, S.; RATHORE, A.S.; SHETTY, D.C.; TANDON, A.; JAIN, P. Utility of DNA-specific stains in Micronuclei Assay as a Marker of Genotoxicity in Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Squamous Cell Carcinoma. **J cytol**. v.36, n.2, p. 111-115, 2019.

KHOT, K. et al. A citomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. **J. Nat. Sci. Biol. Med., Mumbai**, v. 6, p. 22-24, 2015.

KUTLER, D.I.; PATEL, K.R.; AUREBACH, A.D.; KENNEDY, J.; LACH, F.P.; SANBORN, E. et al. Natural history and management of Fanconi anemia patients with head and neck cancer: A 10-year follow-up. **Laryngoscope**. v. 26, n. 4, p. 870-859, 2016.

LOCCA, O.; SOLLECITO, T.P.; ALAWI, F.; WIENSTEIN, G.S. et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and

meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. **Head Neck**. v. 42, n. 3, p. 539-555, 2020.

LUCENA, E.E.S.; MIRANDA, A.M.; ARAÚJO, F.A.C.; GALVÃO, C.A.B.; MEDEIROS, A.M.C. Collection Method and the Quality of the Smears from Oral Mucosa. **Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac.** v.11, n.2, p.1-8, 2011.

NANAYAKKARA, W.L.; DISSANAYAKA, B.G.; NANAYAKKARA, E.A.P.D.; AMARTUNGA, W.M.; Comparison of spatula and cytobrush cytological techniques in early detection of oral malignant and premalignant lesions: a prospective and blinded study. **J Oral Pathol Med**. n. 45, p. 268-274m 2016.

OGDEN, G.R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W; Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: Effect os smoking. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 19, p. 53-55, 1990. **Oral Radiol**. v.125, n.6, p. 612-627, 2018.

RAMÍREZ, J.M.; MINGUILLÓN, J.; LOVELESS, S.; LAKE, K.; CARRASCO, E.; STJEPANOVIC, N.; BALMAÑA, J.; CATALÀ, A.; MEHTA, P.A.; SURRALLÉS, J. Chromosome fragility in the buccal epithelium in patients with Fanconi anemia. **Cancer Let**. v. 1, n 472, p. 1-7, 2020.

RIEZZO, I.; PASCALE, N.; LA RUSSA, R.; LISO, A.; SALERNO, M.; TURILLAZZI, E. Donor Selection for Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Clinical and Ethical Considerations. **Stem Cells International**. v. 2017, p. 1-11, 2017.

ROSIN, M.P.; RAGAB, N.F.; ANWAR, W.; SALAMA, S.I. Localized induction of micronuclei in the oral mucosa of xeroderma pigmentosum patients, **Cancer Lett**, 81 (1994) 39-44.

RUBERT, A., BAGÁN, L., BAGÁN, J.V., Oral leukoplakia, a clinical-histopathological study in 412 patients. **J Clin Exp Dent**. v.12, n.6, p. 540-546, 2020.

SMETSERS, S.E.; VELLEUER, E.; WU, T.; BRINK, A.; et al. Noninvasive molecular screening for oral precancer in Fanconi anemia patients. **Cancer Prevention Research**. v.8, n.11, p. 1102-1111, 2015.

SPEIGHT, P.M.; KHURRAM, S.A.; KUJAN, O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v.125, n.6, p. 612-627, 2018.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**. v.271, n.1, p. 69-77, 1992.

TRAUT, H.F.; PAPANICOLAU, G.N. Cancer of the uterus: the vaginal smear in its diagnosis. **Cal West Med**. v. 59, p. 121–122, 1943.

UCHÔA, I.S.; MAGALHÃES, M.A.V. Micronucleus test as a biomarker for patients with miscellaneous pathologies: an integrating literature review. **Braz. J. Surg. Clin. Res**. v.27, n.1, p. 78-83, 2019.

VELLEUER, E.; DIETRICH, R.; POMJANSKI, N.; ARAUJO, I.K.S.A.; DE ARAUJO, B.E.S.; SROKA, I.; BIESTERFELD, S.; BOCKING, Å.; SCHRAMM, M. Diagnostic accuracy of brush biopsy-based cytology for the early detection of oral cancer and precursors in Fanconi anemia. **Cancer Cytopathol**. v. 128, n. 6, p. 403-413, 2020.

VIDYALAKSHMI, S.; NIRMAL, R.M.; VEERAVARMAL, V.; SANTHADEVVY, A.; ARAVINDHAN, R.; SUMATHY. Buccal micronuclei assay as a tool for biomonitoring DNA damage in oral lichen planus. **J Clin Diagn Res**. v.10, n.7, p. 05-07, 2016.

WARNAKULASURIYA, S.; LODI, G. Oral Potentially Malignant disorders; Proceedings from an Expert Symposium. **Oral Diseases**. v.27, n.8, p. 1859-1861, 2021.

ANEXO A – TCLE ADULTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Cassius Carvalho Torres-Pereira e Bárbara Soldatelli Ballardin, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente diagnosticado com Anemia de Fanconi ou que apresente lesões de boca compatíveis com Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) e que realiza acompanhamento multiprofissional no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado “Rastreamento de Lesões Potencialmente Malignas e Câncer Bucal em pacientes Onco-Hematológicos”. Esse estudo permitirá entender se pacientes diagnosticados com essas doenças apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de câncer de boca. Para isso, será realizado um teste chamado de frequência de Micronúcleos, que possibilita a avaliação do potencial de malignização das células. Essa avaliação é feita em laboratório após a coleta das células bucais dos participantes.

Sua participação é muito importante, pois é através de pesquisas clínicas que ocorrem os avanços em todas as áreas. Participando dessa pesquisa, você estará contribuindo no planejamento de medidas que possibilitem o diagnóstico precoce de câncer de boca e rastreamento de pacientes que apresentam maiores chances de desenvolver câncer bucal.

1. O objetivo desta pesquisa é avaliar a predisposição de pacientes com Anemia de Fanconi e DECH para desenvolver câncer de boca.
2. Caso você aceite participar da pesquisa, será necessário passar por uma avaliação no consultório da odontologia que está localizado no ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea da instituição. Nessa avaliação, perguntas sobre a doença diagnosticada e os tratamentos já realizados serão feitas. Também serão feitas fotografias de lesões presentes em boca. Além disso, será realizado o exame para coleta das células.
3. Para a realização do exame, será utilizada uma escova para coleta das células da mucosa da boca. Rasparemos essa escova nas mucosas. Você só precisará fazer essa avaliação uma vez, não necessitando refazer estes exames em outros momentos. O tempo gasto para responder as perguntas, fotografias e coleta das células será de 30 minutos.
4. É possível que você experimente algum desconforto, embora mínimo, principalmente relacionado ao exame da coleta das células da boca. Pois esse exame trata-se da raspagem de uma escova na mucosa. Esse procedimento não causa dor. Caso você apresente lesões bucais dolorosas ou diminuição da quantidade de saliva na boca e sensação de boca seca, poderá sentir leve desconforto durante a raspagem. Faremos o possível para que este exame seja o mais rápido possível. Caso você se sinta constrangido ou desconfortável durante o atendimento, poderá desistir de participar da pesquisa. Além do mais, todos os dados obtidos e as fotos serão guardados com sigilo e identificados com códigos, para que sua identidade não seja revelada.
5. Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser por exemplo o fato de você apresentar alguma fadiga na boca devido ao tempo que pode levar para realizar o exame físico, as fotografias e a coleta das células. Pode ser ainda que a raspagem de mucosas machucadas

Rubricas:



Pesquisadora:

Participante da Pesquisa e /ou responsável:

ou ressecadas cause leve dor ou sangramento. Garantimos, porém, que faremos todo o esforço para evitar estas situações desagradáveis e que você estará livre para nos avisar caso algo assim aconteça ou para desistir da participação da pesquisa.

6. Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

- ✓ Melhor acompanhamento dos grupos de risco para câncer de boca;
- ✓ Monitoramento de lesões com potencial de transformação maligna;
- ✓ Aperfeiçoar técnicas que possibilitem o diagnóstico precoce;
- ✓ Melhor caracterização das lesões que podem ser encontradas em boca.

No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

7. A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. O seu atendimento e/ou tratamento está garantido e não será interrompido caso você desista de participar.

8. Caso sejam identificadas lesões bucais, sejam de DECH ou de outra natureza, você receberá os tratamentos necessários. A realização desse estudo permitirá que pacientes com maior predisposição para desenvolvimento de câncer de boca, tenham melhor acompanhamento, possibilitando o diagnóstico precoce. Os resultados dos exames podem ser solicitados aos pesquisadores. Alterações identificadas serão informadas e caso necessite de tratamento, esse será realizado.

9. As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas pela equipe de saúde do Serviço de Transplante de Medula Óssea, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.


10. O material obtido – lâminas com as células coletadas e imagens – será utilizado unicamente para essa pesquisa.

11. As despesas necessárias para a realização da pesquisa como as luvas, máscaras, gorros, escova para coleta de células e demais materiais necessários para a análise laboratorial não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela participação na pesquisa.

12. Você terá a garantia de que problemas como dor e sangramento decorrentes da realização do exame necessário para o estudo serão tratados no ambulatório de Odontologia do Serviço de Transplante de Medula Óssea.

13. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código e as fotografias serão organizadas de forma que não permita a sua identificação.

Os pesquisadores Cassius Carvalho Torres-Pereira e Bárbara Soldatelli Ballardin, dentistas responsáveis por este estudo, poderão ser contatados no prédio de Odontologia do Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jd. Botânico, Curitiba - PR) de segunda à sexta-feira em horário comercial, ou através dos telefones: 054 99605-0168 ou 041 3360-4024, e-mail: cassius@ufpr.br ou barbarasballardin@gmail.com, para esclarecer

Rubricas:

Pesquisadora:
Participante da Pesquisa e /ou responsável:

eventuais dúvidas que você possa ter, e fornecer as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP é de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

Autorizo () Não autorizo () o uso de minhas fotografias e informações do meu histórico de saúde e das células coletadas para fins da pesquisa, sendo seu uso restrito a análise pelos pesquisadores envolvidos para a mensuração do potencial de transformação maligna.

Eu li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim e sem que esta decisão afete meu tratamento ou atendimento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de _____

Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou seu representante legal para a participação neste estudo.



Bárbara Soldatelli Ballardín - Pesquisadora

ANEXO B – TCLE RESPONSÁVEL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – RESPONSÁVEL LEGAL

A criança/adolescente, sob sua responsabilidade, está sendo convidada(o) por nós, Cassius Carvalho Torres-Pereira e Bárbara Soldatelli Ballardin, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente diagnosticado com Anemia de Fanconi ou que apresente lesões de boca compatíveis com Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) e que realiza acompanhamento multiprofissional no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado “Rastreamento de Lesões Potencialmente Malignas e Câncer Bucal em pacientes Onco-Hematológicos”. Esse estudo permitirá entender se pacientes diagnosticados com essas doenças apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de câncer de boca. Para isso, será realizado um teste chamado de frequência de Micronúcleos, que possibilita a avaliação do potencial de malignização das células. Essa avaliação é feita em laboratório após a coleta das células bucais dos participantes.

Sua participação é muito importante, pois é através de pesquisas clínicas que ocorrem os avanços em todas as áreas. Participando dessa pesquisa, você estará contribuindo no planejamento de medidas que possibilitem o diagnóstico precoce de câncer de boca e rastreamento de pacientes que apresentam maiores chances de desenvolver câncer bucal.

1. O objetivo desta pesquisa é avaliar a predisposição de pacientes com Anemia de Fanconi e DECH para desenvolver câncer de boca.
2. Caso você permita que a criança/adolescente participe da pesquisa, a mesma passará por uma avaliação no consultório da odontologia que está localizado no ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea da instituição. Nessa avaliação, perguntas sobre a doença diagnosticada e os tratamentos já realizados serão feitas. Também serão feitas fotografias de lesões presentes em boca. Além disso, será realizado o exame para coleta das células.
3. Para a realização do exame, será utilizada uma escova para coleta das células da mucosa da boca. Rasparemos essa escova nas mucosas. Você só precisará fazer essa avaliação uma vez, não necessitando refazer estes exames em outros momentos. O tempo gasto para responder as perguntas, fotografias e coleta das células será de 30 minutos.
4. É possível que a criança/adolescente experimente algum desconforto, embora mínimo, principalmente relacionado ao exame da coleta das células da boca. Pois esse exame trata-se da raspagem de uma escova na mucosa. Esse procedimento não causa dor. Caso essa apresente lesões bucais dolorosas ou diminuição da quantidade de saliva na boca e sensação de boca seca, poderá sentir leve desconforto durante a raspagem. Faremos o possível para que este exame seja o mais rápido possível. Caso sintam-se constrangido ou desconfortável durante o atendimento, poderá desistir de participar da pesquisa. Além do mais, todos os dados obtidos e as fotos serão guardados com sigilo e identificados com códigos, para que sua identidade não seja revelada.
5. Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser por exemplo o fato de apresentar alguma fadiga na boca devido ao tempo que pode levar para realizar o exame físico, as fotografias e a coleta das células. Pode ser ainda que a raspagem de mucosas machucadas ou

Rubricas:

Pesquisadora:

Participante da Pesquisa e /ou responsável:

ressecadas cause leve dor ou sangramento. Garantimos, porém, que faremos todo o esforço para evitar estas situações desagradáveis e que você estará livre para nos avisar caso algo assim aconteça ou para desistir da participação da pesquisa.

6. Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

- ✓ Melhor acompanhamento dos grupos de risco para câncer de boca;
- ✓ Monitoramento de lesões com potencial de transformação maligna;
- ✓ Aperfeiçoar técnicas que possibilitem o diagnóstico precoce;
- ✓ Melhor caracterização das lesões que podem ser encontradas em boca.

No entanto, nem sempre o participante será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

7. A participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. O seu atendimento e/ou tratamento está garantido e não será interrompido caso você desista de participar.

8. Caso sejam identificadas lesões bucais, sejam de DECH ou de outra natureza, os tratamentos necessários serão ofertados. A realização desse estudo permitirá que pacientes com maior predisposição para desenvolvimento de câncer de boca, tenham melhor acompanhamento, possibilitando o diagnóstico precoce. Os resultados dos exames podem ser solicitados aos pesquisadores. Alterações identificadas serão informadas e caso necessite de tratamento, esse será realizado.

9. As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas pela equipe de saúde do Serviço de Transplante de Medula Óssea, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

10. O material obtido – lâminas com as células coletadas e imagens – será utilizado unicamente para essa pesquisa.

11. As despesas necessárias para a realização da pesquisa como as luvas, máscaras, gorros, escova para coleta de células e demais materiais necessários para a análise laboratorial não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela participação na pesquisa.

12. Garantimos que problemas como dor e sangramento decorrentes da realização do exame necessário para o estudo serão tratados no ambulatório de Odontologia do Serviço de Transplante de Medula Óssea.

13. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome do participante, e sim um código e as fotografias serão organizadas de forma que não permita sua identificação.

Os pesquisadores Cassius Carvalho Torres-Pereira e Bárbara Soldatelli Ballardín, dentistas responsáveis por este estudo, poderão ser contatados no prédio de Odontologia do Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jd. Botânico, Curitiba - PR) de segunda à sexta-feira em horário comercial, ou através dos telefones: 054 99605-0168 ou 041 3360-4024, e-mail: cassius@ufpr.br ou barbarasballardin@gmail.com, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter, e fornecer as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Rubricas:



Pesquisadora:

Participante da Pesquisa e /ou responsável:

Se você tiver dúvidas sobre os direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP é de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

Autorizo () Não autorizo () o uso de fotografias e informações do histórico de saúde e das células coletadas da criança/adolescente para fins da pesquisa, sendo seu uso restrito a análise pelos pesquisadores envolvidos para a mensuração do potencial de transformação maligna.

Eu li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo e sem que esta decisão afete o tratamento ou atendimento da criança/adolescente.

Eu concordo voluntariamente que a criança/adolescente participe deste estudo.

Curitiba, ___ de _____ de _____

Assinatura do Responsável Legal

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou seu representante legal para a participação neste estudo.



Bárbara Soldatelli Ballardín - Pesquisadora

ANEXO C - TALE

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Rastreamento de Lesões Potencialmente Malignas e Câncer Bucal em pacientes Onco-Hematológicos”

Pesquisadores: Cassius Carvalho Torres-Pereira e Bárbara Soldatelli Ballardin

Local da Pesquisa: Ambulatório de Odontologia do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

O que significa assentimento?

Assentimento significa que você, criança/adolescente, concorda em fazer parte de uma pesquisa. Você terá seus direitos respeitados e receberá todas as informações sobre o estudo, por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao participante

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de entender se pacientes diagnosticados com Anemia de Fanconi ou Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de câncer de boca. Para isso, será realizado um teste chamado de frequência de Micronúcleos, que possibilita a avaliação do potencial de transformação maligna das células. Essa avaliação é feita em laboratório após a coleta das células bucais dos participantes.

Sua participação é muito importante, pois é através de pesquisas clínicas que ocorrem os avanços em todas as áreas. Participando dessa pesquisa, você estará contribuindo no planejamento de medidas que possibilitem o diagnóstico precoce de câncer de boca e rastreamento de pacientes que apresentam maiores chances de desenvolver câncer bucal.

Os benefícios da pesquisa são:


- ✓ Melhor acompanhamento dos grupos de risco para câncer de boca;
- ✓ Monitoramento de lesões com potencial de transformação maligna;
- ✓ Aperfeiçoar técnicas que possibilitem o diagnóstico precoce;
- ✓ Melhor caracterização das lesões que podem ser encontradas em boca.

No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

O estudo será desenvolvido Ambulatório de Odontologia do Serviço de Transplante de Medula Óssea dessa instituição, onde serão coletadas células da mucosa da boca, além de tiradas algumas fotografias da sua boca. O seu nome não aparecerá na pesquisa e o seu rosto não aparecerá nas fotos.

O que devo fazer se eu concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

Caso você aceite participar da pesquisa, será necessário passar por uma avaliação no consultório da odontologia que está localizado no ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea da instituição. Nessa avaliação, perguntas sobre a doença diagnosticada e os tratamentos já realizados

Rubricas:

Pesquisadora:
Participante da Pesquisa e /ou responsável:

serão feitas. Também serão feitas fotografias de lesões presentes em boca. Além disso, será realizado o exame para coleta das células. Para a realização do exame, será utilizada uma escova para coleta das células da mucosa da boca. Rasparemos essa escova nas mucosas. Você só precisará fazer essa avaliação uma vez, não necessitando refazer estes exames em outros momentos. O tempo gasto para responder as perguntas, fotografias e coleta das células será de 30 minutos. A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar não terá nenhum prejuízo no seu atendimento ou tratamento.

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiverem dúvidas com relação ao estudo ou aos riscos relacionados a ele, você deve contatar os pesquisadores Cassius Carvalho Torres-Pereira e Bárbara Soldatelli Ballardin. Poderão ser contatados no prédio de Odontologia do Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jd. Botânico, Curitiba - PR) de segunda à sexta-feira em horário comercial, ou através dos telefones: 054 99605-0168 ou 041 3360-4024, e-mail: cassius@ufpr.br ou barbarasballardin@gmail.com.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li e discuti com o pesquisador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO.

Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Curitiba, ___ de _____ de _____

Assinatura do Adolescente



Bárbara Soldatelli Ballardin - Pesquisadora

ANEXO D – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA



Rastreamento de Lesões Potencialmente Malignas e Câncer Bucal em pacientes Onco-Hematológicos

Complexo Hospital de Clínicas da UFPR

Ficha de Avaliação Clínica Nº _____

NOME DO PACIENTE: _____

Número do prontuário CHC UFPR: _____

Dados pessoais

Idade: _____ anos Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: () Feminino () Masculino

Nome do responsável: _____ () Não se aplica

Procedência: _____ Cidade Natal: _____

Grupo étnico: () Leucoderma () Melanoderma () Xantoderma () Feoderma

História Clínica

Doença de base: _____

TCTH: () Sim () Não

Tipo: () Não se aplica

() Não aparentado

() Aparentado Doador: _____

() Aparentado Haploidêntico Doador: _____

Tempo de TCTH: _____ () Não se aplica

Presença de DECH:

() Não () Não se aplica () Pulmão () Olhos () Pele () Boca () Intestino

() Outros _____

Outras doenças: _____

Fumante: () Sim () Não Quantidade cigarros/dia: _____

Bebidas alcoólicas: () Sim () Não

Tipo de bebidas: _____

Quantidade ingerida/dia: _____

Avaliação Odontológica

Queixa principal: _____

Lesões em mucosa oral compatível com DECH: () Sim () Não

Local: _____ Tempo de duração: _____

Descrição das lesões: _____

Exames Complementares realizados:

Biópsia: () Sim () Não

Local: _____ Resultado: _____

Citologia esfoliativa: () Sim () Não

Local: _____ Resultado: _____

Lesões bucais não compatíveis com DECH: () Sim () Não

Local: _____ Tempo de duração: _____

Descrição da lesão: _____

Suspeita de malignidade clinicamente: () Sim () Não

Hipótese diagnóstica clínica: _____

Exames Complementares realizados:

Biópsia: () Sim () Não

Local: _____ Resultado: _____

Citologia esfoliativa: () Sim () Não

Local: _____ Resultado: _____

Informações complementares: _____

Citologia Esfoliativa

Coleta de células descamadas:

Amostra 1: mucosa jugal direita

() Íntegra () Com lesão

Amostra 2: mucosa jugal esquerda

() Íntegra () Com lesão

Amostra 3: borda lateral de língua direita

() Íntegra () Com lesão

Amostra 4: borda lateral de língua esquerda

() Íntegra () Com lesão

Amostras extras:

Amostra extra 1: Local: _____

Amostra extra 2: Local: _____

Amostra extra 3: Local: _____

Amostra extra 4: Local: _____

ANEXO E – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO E REAÇÃO DE FEULGEN PARA ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS

Passo a passo do protocolo utilizado para pesquisa/ identificação e frequência de Micronúcleos:

1º passo – preparação do Reativo de Schiff:

- 1) Dissolver 1g de Fucsina básica em 200ml de água destilada pré-aquecida a 60°C. Agitar a solução em agitador magnético até esfriar;
- 2) Após esfriar, adicionar 10ml de Ácido Clorídrico (HCl) 1 Molar (M) e homogeneizar a solução. O HCl deve ser preparado na hora do uso, em uma capela. Dose: 0,835 mL de HCl em 9,165 ml de água destilada;
- 3) Depois de misturar o HCl na solução, adicionar 2g de Metabissulfito de Potássio e homogeneizar a solução com agitador magnético durante 10 minutos. Usar a capela com exaustão devido ao gás tóxico;
- 4) Transferir a solução para um frasco escuro e encoberto por papel alumínio para proteger da luz, homogeneizando várias vezes durante uma hora. Aguardar 24 horas;
- 5) Após 24 horas, adicionar 10g de carvão ativado e homogeneizar diversas vezes ao longo de 4 horas;
- 6) Filtrar a solução em papel de filtro diretamente para outro frasco âmbar seco e limpo. A solução filtrada deve ficar transparente;
- 7) Após a filtração, realizar teste de capacidade da coloração; Teste: Pingar uma gota da solução em papel filtro. Se formar um halo com coloração púrpura no papel sendo o seu centro branco, a solução está apta para uso. Se toda a área ficar corada, se faz necessário novo tratamento com carvão ativado por 24hrs e nova filtração (Repetir os passos 5, 6 e 7);

8) Recomenda-se nova filtragem sempre antes da utilização do reativo e novo tratamento com carvão mensal, para manter as propriedades da solução. A solução deve estar sempre com coloração transparente antes da utilização;

9) A solução pode ser guardada em geladeira em frasco âmbar, com proteção à luz, por tempo indeterminado.

2º passo – Coleta das células epiteliais descamadas por meio da técnica de Citologia Esfoliativa Convencional:

1) Coleta de células epiteliais com escova citobrush em mucosa jugal direita e esquerda, borda lateral de língua direita e esquerda e áreas de lesões bucais;

2) Identificação do número do participante da pesquisa à lápis em lâmina de vidro com ponta fosca;

3) Transpasse das células coletadas para lâmina de vidro convencional, em movimento rotatórios e em direção única;

4) Transpasse das células coletadas de uma lâmina de vidro para outra, promovendo melhor espalhamento das células, evitando sobreposição e proporcionando amostra dupla de cada local;

5) Fixação por imersão em solução de álcool absoluto por no mínimo 15 minutos;

6) Identificação dos frascos porta lâminas com informações sobre o participante do estudo;

7) Armazenamento em local fora de exposição solar até o momento da coloração.

3º passo – Reação de Feulgen:

Protocolo adaptado da indicação do fabricante – Merck.

1) Lavar as lâminas com água destilada para remover o excesso de álcool;

2) Organizar as lâminas em grades porta lâminas específicas para baterias de coloração;

- 3) Dissolver o HCl 1M para HCl 5M à 22°C. Dose: 4,15ml de HCl para cada 5,84 ml de água destilada;
- 4) Colocar as lâminas com as células epiteliais coletadas por imersão durante 50 minutos em solução de HCl 5M;
- 5) Lavar em água destilada por 2 minutos;
- 6) Lavar em água destilada por mais 2 minutos;
- 7) Imersão das lâminas em Reagente de Schiff preparado anteriormente durante 60 minutos;
- 8) Imersão em solução de Metabissulfito de Sódio (Metabissulfito I) concentrado em 5ml por 3 minutos (10g de Metabissulfito para 100ml de água destilada);
- 9) Imersão em solução de Metabissulfito de Sódio (Metabissulfito II) concentrado em 5ml por mais 3 minutos;
- 10) Lavar em água destilada por 2 minutos;
- 11) Lavar em água destilada por mais 2 minutos;
- 12) Imersão em álcool absoluto (Álcool I) por 2 minutos;
- 13) Imersão em álcool absoluto (Álcool II) por mais 2 minutos;
- 14) Imersão em Xilol I por 1 minuto;
- 15) Imersão em Xilol II por mais 1 minuto.

Observação: as soluções de Metabissulfito de Sódio, Álcool e Xilol devem estar separadas em 2 frascos para imersão, denominadas solução I e II, para evitar o acúmulo de sujidades e possíveis artefatos durante a avaliação microscópica das lâminas.

4º passo – Montagem das lâminas:

- 1) Montagem das lâminas utilizando Permunt (2 gotas) e lamínulas de vidro tamanho convencional;
- 2) Tempo de secagem das lâminas: 24h;

3) Limpeza das lâminas e remoção de excesso de Xilol + Permout.

5º passo - Avaliação das lâminas e identificação de MN conforme método proposto por Tolbert, Shy & Allen (1992).

ANEXO F – FICHA DE AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS



Rastreamento de Lesões Potencialmente Malignas e Câncer Bucal em pacientes Onco-Hematológicos

Complexo Hospital de Clínicas da UFPR

Ficha de Avaliação de Micronúcleos Nº _____

NOME DO PACIENTE: _____

Número do prontuário CHC UFPR: _____

Amostra 1: mucosa jugal direita

() Íntegra () Com lesão

Quantidade total de células: _____

Quantidade de células micronucleadas: _____

Quantidade total de MN: _____

Frequência de MN: _____

Amostra 2: mucosa jugal esquerda

() Íntegra () Com lesão

Quantidade total de células: _____

Quantidade de células micronucleadas: _____

Quantidade total de MN: _____

Frequência de MN: _____

Amostra 3: borda lateral de língua direita

() Íntegra () Com lesão

Quantidade total de células: _____

Quantidade de células micronucleadas: _____

Quantidade total de MN: _____

Frequência de MN: _____

Amostra 4: borda lateral de língua esquerda

() Íntegra () Com lesão

Quantidade total de células: _____

Quantidade de células micronucleadas: _____

Quantidade total de MN: _____

Frequência de MN: _____

Amostras extras:

Amostra extra 1: Local: _____

Quantidade total de células: _____

Quantidade de células micronucleadas: _____

Quantidade total de MN: _____

Frequência de MN: _____

Amostra extra 2: Local: _____

Quantidade total de células: _____

Quantidade de células micronucleadas: _____

Quantidade total de MN: _____

Frequência de MN: _____

Amostra extra 3: Local: _____

Quantidade total de células: _____

Quantidade de células micronucleadas: _____

Quantidade total de MN: _____

Frequência de MN: _____