

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HALINA GROSSMANN PEREIRA

AVALIAÇÃO DO TESTE DE MICRONÚCLEOS COMO BIOMARCADOR
CITOLÓGICO NA DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO CRÔNICA
ORAL

CURITIBA

2025

HALINA GROSSMANN PEREIRA

AVALIAÇÃO DO TESTE DE MICRONÚCLEOS COMO BIOMARCADOR
CITOLÓGICO NA DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO CRÔNICA
ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, com área de concentração em Estomatopatologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Lucena Schussel.

CURITIBA

2025

Pereira, Halina Grossmann

Avaliação do teste de micronúcleos como biomarcador citológico na doença enxerto-contra-hospedeiro crônica oral [recurso eletrônico] / Halina Grossmann Pereira. – Curitiba, 2025.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2025.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Lucena Schussel

1. Mucosa bucal-Citologia. 2. Transplante de células. 3. Testes para micronúcleos. 4. Biomarcadores. I. Schussel, Juliana Lucena. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.63



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-
REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA

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 **HALINA GROSSMANN PEREIRA**, intitulada: **Avaliação do Teste de Micronúcleos como Biomarcador Citológico na Doença Enxerto-Contra-Hospedeiro Crônica Oral**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA LUCENA SCHUSSEL, 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 Setembro de 2025.

Assinatura Eletrônica

26/09/2025 18:02:27.0

JULIANA LUCENA SCHUSSEL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

09/10/2025 15:17:07.0

PAULO HENRIQUE BRAZ SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

16/10/2025 08:46:08.0

CASSIUS CARVALHO TORRES PEREIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4134 - E-mail: posodonto@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 486500

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 486500

AGRADECIMENTOS

O processo de escrita da dissertação e a elaboração do projeto de mestrado pode ser muito solitário. Considero-me privilegiada por ter tido ao meu lado pessoas com tamanha paciência e compreensão durante essa jornada e que entenderam minhas ausências, principalmente na etapa de avaliação das 200 lâminas analisadas neste trabalho. Pensando em todas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante esses dois anos de mestrado, reservo este trecho de minha dissertação para agradecimentos e registros.

Agradeço à minha mãe Sueli, por me incentivar a ter sonhos grandiosos e sempre fazer o possível e o impossível para torná-los realidade. Sem você, nada disso seria possível! Agradeço também à minha irmã Diandra, minha fonte de inspiração, por toda a ajuda e por me mostrar que eu era capaz de muito mais do que acreditei ser. À minha avó Lourdes, hoje com 97 anos, que preencheu os meus anos de mestrado com muito humor (e algumas brigas) e me lembrou diariamente o privilégio que é tê-la ao meu lado. Ao meu pai Marcos, meu irmão Matheus e a Priscila, agradeço pelo apoio e paciência quando por vezes precisei estar ausente. À Bya, toda minha gratidão por ter sido um pilar essencial na nossa família e sempre trazer leveza para meus dias.

Agradeço ao meu companheiro Pedro pelas palavras de conforto em momentos difíceis, pelas vezes em que me acompanhou ao laboratório apenas para que eu não ficasse sozinha, pelo empenho em tentar entender o que eu estava estudando e sempre me lembrar do que eu sou capaz.

Agradeço aos amigos de pós graduação, em especial Maria Carmen e Laila, que sempre me deram força quando o caminho acadêmico parecia sombrio e impossível. Agradeço também às minhas amigas e amigos de longa data: Marina, Lyly, Taci, Arthur e muitos outros que me escutaram com entusiasmo todas as vezes em que falei de micronúcleos e me lembraram que existe vida e diversão fora da universidade.

Dedico esse espaço para agradecer também imensamente à minha orientadora Juliana Schussel por todo o ensinamento, tanto profissional quanto pessoal. Prof Ju, você é um exemplo de professora e ter sua orientação durante a realização deste trabalho foi o que permitiu que esse processo fosse tão prazeroso pra mim. Te admiro enormemente e você me inspira a fazer a diferença no mundo e na vida das pessoas. Agradeço aos demais mestres, especialmente ao professor Heliton Gustavo de Lima, que com todo seu carinho, cuidado e sabedoria, me ensinou muito e me mostrou que estou no caminho certo.

Também ao professor José Miguel Amenabar Cespedes pelo auxílio da etapa da análise estatística do trabalho.

Agradeço às residentes do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR: Rebeca, Duda, Laís e Brunna, por me auxiliarem na coleta de dados, sempre disponíveis para me ajudar a encontrar soluções e alternativas.

Agradeço aos funcionários da UFPR, especialmente Simone, técnica do Laboratório de Patologia Bucal, por me ensinar praticamente tudo que sei sobre a prática laboratorial, pelas conversas e por todo o apoio e incentivo durante todas as dificuldades vivenciadas no laboratório.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, uma Universidade pública que desde minha graduação proporcionou ensino de excelência e, para este trabalho, disponibilizou os recursos necessários para a realização da pesquisa. Agradeço também à CAPES pelo fomento através da bolsa concedida.

O produto final desta pesquisa é fruto de um trabalho conjunto, enriquecido pelas contribuições de pacientes que, em momentos de fragilidade e desconforto, compartilharam generosamente suas histórias. Encerro reafirmando que são eles a minha maior inspiração e motivação para me tornar uma pesquisadora cada vez melhor. Um caminho que tem início aqui.

Para minha irmã.

RESUMO

A doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica (DECHc) é uma complicação relevante após o transplante de células hematopoiéticas (TCH), acometendo até 50% dos receptores. A cavidade oral é o segundo sítio mais afetado, com manifestações com risco para transformação maligna. Este estudo transversal prospectivo avaliou o teste de micronúcleos (MN) como biomarcador citológico em 45 indivíduos, distribuídos em três grupos: saudáveis (C, n=15), pós-TCH sem DECH oral (T, n=15) e pós-TCH com DECH oral (D, n=15). Foram obtidas 180 amostras de mucosa bucal por citologia esfoliativa, coradas pela reação de Feulgen, com análise da frequência de micronúcleos (FMN) e células micronucleadas (FCMN). A média de FMN foi de $0,74 \pm 0,30$ no grupo C, $1,02 \pm 0,42$ no grupo T e $1,63 \pm 0,66$ no grupo D. Para FCMN, os valores foram de $0,67 \pm 0,32$ (C), $0,86 \pm 0,32$ (T) e $1,50 \pm 0,65$ (D). A ANOVA demonstrou diferenças significativas na FMN entre os grupos ($f=13,145$; $p=0,000037$), com post hoc de Tukey indicando $C \neq T$ ($p=0,02678$), $C \neq D$ ($p=0,00003$) e $T \neq D$ ($p=0,00373$). Para FCMN, apenas o grupo D diferiu estatisticamente dos demais. Os resultados demonstraram que a DECHc oral está associada ao aumento de CMN, reforçando seu potencial de transformação maligna e a aplicabilidade do teste de MN como método não invasivo de monitoramento.

Palavras-chave: doença do enxerto-contra-hospedeiro; biomarcador celular; micronúcleos; citologia esfoliativa.

ABSTRACT

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is a relevant complication after hematopoietic cell transplantation (HCT), affecting up to 50% of recipients. The oral cavity is the second most frequently affected site, with manifestations carrying a risk of malignant transformation. This prospective cross-sectional study evaluated the micronucleus (MN) assay as a cytological biomarker in 45 individuals, distributed into three groups: healthy controls (C, n=15), post-HCT without oral GVHD (T, n=15), and post-HCT with oral GVHD (D, n=15). A total of 180 buccal mucosa samples were obtained by exfoliative cytology, stained with the Feulgen reaction, and analyzed for micronucleus frequency (MNf) and micronucleated cell frequency (MNCF). The mean MNF was 0.74 ± 0.30 in group C, 1.02 ± 0.42 in group T, and 1.63 ± 0.66 in group D. For MNCF, the values were 0.67 ± 0.32 (C), 0.86 ± 0.32 (T), and 1.50 ± 0.65 (D). ANOVA demonstrated significant differences in MNF among groups ($F=13.145$; $p=0.000037$), with Tukey's post hoc indicating $C \neq T$ ($p=0.02678$), $C \neq D$ ($p=0.00003$), and $T \neq D$ ($p=0.00373$). For MNCF, only group D differed statistically from the others. The results showed that oral cGVHD is associated with an increased frequency of micronucleated cells, reinforcing its potential for malignant transformation and supporting the applicability of the MN assay as a non-invasive monitoring tool.

Keywords: graft-versus-host disease; cellular biomarker; micronuclei; exfoliative cytology.

LISTA DE SIGLAS

CEC	Carcinoma de células escamosas
CMN	Células micronucleadas
DECH	Doença do enxerto-contra-hospedeiro
DECHa	Doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda
DECHc	Doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica
DOPM	Desordem oral potencialmente maligna
FCMN	Frequência de células micronucleadas
FMN	Frequência de micronúcleos
MN	Micronúcleos
TCH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Tipo de pesquisa	19
3.2. Local de pesquisa.....	19
3.3. Amostra.....	19
3.3.1. Critérios de inclusão e exclusão	19
3.4. Aspectos éticos	20
3.5. Procedimentos metodológicos	20
3.5.1. Etapa clínica	20
3.5.2. Etapa laboratorial.....	21
3.6. Análise estatística	23
4. ARTIGO.....	25
Introdução.....	27
Métodos	29
Resultados	30
Discussão	33
Considerações finais.....	36
Referências.....	37
5. RESULTADOS ADICIONAIS	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A - TCLE	53
ANEXO B – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA	56
ANEXO C – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO E REAÇÃO DE FEULGEN PARA ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS	59

1. INTRODUÇÃO

O transplante de células hematopoiéticas (TCH) é um procedimento já consolidado para o tratamento de doenças nas quais há uma deficiência ou falha do sistema hematopoiético. Consiste em um processo no qual as células de medula óssea e o sistema imunológico do receptor debilitado são substituídos por células-tronco saudáveis, obtidas de diferentes fontes – como medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical – após condicionamento, realizado através da administração de quimioterapia, radioterapia ou ambos. O TCH pode ser classificado em autólogo, quando as células são do próprio paciente, ou alogênico, quando são provenientes de um doador compatível (relacionado ou não). Ele é indicado para o tratamento tanto de doenças não neoplásicas (como aplasia de medula, imunodeficiências congênitas e algumas doenças autoimunes graves) quanto neoplásicas (como leucemias, linfomas e mieloma múltiplo). Seu principal objetivo é reestabelecer a função hematopoiética e imunológica, permitindo produção adequada de células sanguíneas e reconstituindo o sistema imune (1,2). Avanços recentes em tipagem HLA, imunossupressão e cuidados de suporte melhoraram significativamente a sobrevida e reduziram complicações como rejeição do enxerto e doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), tornando o TCH uma alternativa cada vez mais segura e eficaz.

Ainda assim, reações imunológicas entre as células T do doador e os tecidos do receptor podem produzir complicações clínicas pós- transplante que podem levar a morbidade grave e morte. De 25 a 80% dos indivíduos transplantados podem sofrer de uma complicação grave conhecida como doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (3).

A DECH é um processo inflamatório mediado pelo sistema imunológico na qual os linfócitos T imunocompetentes do doador (o enxerto) reconhecem antígenos expressos pelas células do receptor (hospedeiro) como estranhos, desencadeando uma reação imune seguida por intensas respostas inflamatórias que resultam em danos a diferentes órgãos e tecidos dos pacientes. Os órgãos comumente afetados são a pele, trato gastrointestinal, boca, fígado, pulmão, olhos, genitália, sistema musculoesquelético, sistema imunológico e hematopoético, entre outros (4,5).

A DECH pode ser classificada em formas aguda (DECHa) e crônica (DECHc), que, em alguns casos, apresentam sobreposição de manifestações clínicas. Durante muito tempo os critérios clássicos para classificar a DECH foram baseados no tempo de início

da doença, com a forma aguda começando durante os primeiros 100 dias após o transplante e a forma crônica após 100 dias. Atualmente, no entanto, o diagnóstico dessas formas é baseado em sinais e sintomas clínicos (6). A forma aguda afeta mais comumente a pele, o fígado e o trato gastrointestinal (7). Já a forma crônica afeta, mais frequentemente, a pele, a cavidade oral, os olhos, o trato gastrointestinal, o fígado e os pulmões (8,9).

A incidência DECH é menor em transplantes com doadores aparentados compatíveis, quando comparada à observada em transplantes com doadores não aparentados. Entre os fatores adicionais que influenciam o risco de desenvolvimento da DECH estão: a incompatibilidade de gênero, a fonte das células-tronco utilizadas (células-tronco mobilizadas do sangue periférico versus células-tronco obtidas da medula óssea), a depleção de células T do enxerto, bem como a duração e o tipo de terapia imunossupressora (11,13,14).

A DECHc acomete até 50% dos receptores de TCH alogênico (5) e frequentemente surge após a DECHa, mas pode se desenvolver também sem manifestação aguda prévia (7). Após a pele, a cavidade oral é o segundo sítio mais comumente acometido pela DECHc, com até 70% dos pacientes apresentando manifestações orais (10,11).

Clinicamente, a DECHc na cavidade oral apresenta-se, na maioria dos casos, com lesões de aspecto liquenoide, caracterizadas por manchas ou placas hiperqueratóticas, frequentemente estriadas e de tamanhos variados. Além disso, poder ser observados eritema difuso, atrofia da mucosa e comprometimento da função das glândulas salivares, resultando em xerostomia, sensação de ardência e dor oral. Em casos mais graves e extensos, é comum o surgimento de úlceras dolorosas, geralmente recobertas por uma fina pseudomembrana de coloração branco-acinzentada ou amarelada, que comprometem de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes (15,16).

Em termos histológicos, com base na literatura, o National Institutes of Health (NIH) descrevem os critérios mínimos para o diagnóstico da DECHc oral que incluem alterações teciduais localizadas ou generalizadas, com infiltrado inflamatório líquenóide, exocitose e apoptose, ou a presença de linfócitos intralobulares e periductais com ou sem plasmócitos e exocitose de linfócitos (sem neutrófilos) nos ductos e acinos intralobulares (5). O consenso estabelece os critérios para a realização da coleta de amostras de biópsia e obtenção de espécimes de lesões suspeitas de DECHc, recomendando que as biópsias da mucosa oral incluam o epitélio e, no mínimo, cinco lobos das glândulas salivares menores (17).

Em 2020, foi publicada a nova classificação de desordens orais potencialmente malignas (DOPM) pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (17) e, além das lesões classicamente consideradas com potencial de transformação maligna, como a leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e o líquen plano oral (LPO), a forma oral de DECHc e as lesões liquenóides orais foram adicionados às DOPMs.

A revisão sistemática com meta-análise de Gervazio et al. (18) analisou o risco de pacientes com DECHc oral de desenvolverem carcinoma espinocelular. Foram encontrados 9 estudos elegíveis para avaliação quantitativa e o resultado mostrou que há uma diferença no risco do desenvolvimento de carcinoma de células escamosas oral (CEC) em pacientes com DECHc comparados aos pacientes que passaram pelo TCH e não manifestaram a DECH e que, portanto, a presença da DECHc aumenta o risco do desenvolvimento de CEC. Também em relação à associação entre a DECHc e o desenvolvimento de CEC, Janowiak-Majeranowska et al. (19), em sua revisão sistemática, observaram que, nos 9 estudos analisados, a maioria dos pacientes apresentava a forma oral da DECHc antes do diagnóstico da malignidade oral, sendo a língua e a mucosa jugal os dois sítios mais frequentemente acometidos.

Considerando o reconhecido potencial de transformação maligna da DECHc oral, é fundamental que tanto clínicos quanto patologistas estejam atentos ao fato de que lesões com alterações displásicas e neoplasias malignas em estágios iniciais, frequentemente se apresentam com uma aparência liquenoide. Embora a avaliação histopatológica seja um recurso importante, o NIH ressalta que o diagnóstico da DECHc oral é estabelecido predominantemente por critérios clínicos, e que a biópsia não é indicada em todos os casos (5). Nesse contexto, a citologia esfoliativa surge como uma alternativa menos invasiva, útil para o monitoramento e acompanhamento das lesões orais associadas à DECHc.

A citologia esfoliativa é uma técnica de fácil realização e baixo custo, que evita 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 (16) e pode ser um meio de monitorar as desordens orais potencialmente malignas (DOPM).

A técnica de citologia consiste em coletar células descamadas de uma mucosa ou tecido com um auxílio de um instrumento, podendo ser eles espátulas plásticas, de madeira ou metálicas ou ainda instrumentos confeccionados para esse fim, que recebem o nome de citobrush ou escova endocervical (20). Apesar da avaliação clínica e a biópsia

serem consideradas padrão ouro para o diagnóstico de DOPM (20), recentemente há um crescente interesse em ferramentas de diagnóstico menos invasivas. A partir disso, a técnica de citologia esfoliativa emerge como um procedimento seguro e efetivo para a coleta e caracterização de células da superfície da mucosa bucal.

Entretanto, a utilização da citologia esfoliativa oral para a análise e o diagnóstico de CEC oral ou DOPM apresenta limitações, uma vez que, em estágios iniciais, as células malignas podem não alcançar o epitélio, sendo necessária a coleta de camadas mais profundas da mucosa oral. Essa limitação pode resultar em falsos negativos (21). Diante disso, a incorporação de biomarcadores celulares surge como alternativa para aprimorar a avaliação citológica, aumentando a precisão diagnóstica.

Um biomarcador é uma característica mensurável que pode estar implicada em um processo biológico, patogênico ou farmacológico (22). Estudos destacaram que o uso de biomarcadores na avaliação de uma doença está alinhado com um melhor prognóstico clínico e diagnóstico (23,24). A busca por biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e na intervenção precoce de pacientes com DECH é de grande importância para orientar nessa intervenção e no tratamento. Essa busca tem sido feita tanto para a DECH aguda quanto para a DECH crônica. A revisão sistemática de Zhao et al. (23) resumiu os progressos relacionados aos biomarcadores aplicados à DECH aguda e destacou que, infelizmente, até o momento, nenhum biomarcador confiável está disponível e amplamente aceito na prática clínica.

Com relação aos biomarcadores relacionados à DECH crônica, Crossland et al. (24) revisaram modelos desenvolvidos para identificação de novos biomarcadores moleculares e celulares para o desenvolvimento da doença. Os autores afirmam que são necessárias pesquisas adicionais, bem como a correlação entre achados clínicos e laboratoriais, para que esses biomarcadores possam ser aplicados na prática clínica. Zhang et al. (25) também apresentaram ideias que buscam definir a ocorrência de novos biomarcadores moleculares em pacientes com CEC. Esse estudo avaliou a presença desses biomarcadores tendo em vista o diagnóstico e direcionamento terapêutico nesses pacientes.

Considerando que a eficácia diagnóstica de um biomarcador oral depende de sua capacidade de ser identificado e associado a uma condição específica (23), bem como a necessidade de pesquisas adicionais, justifica-se o estudo da utilização do teste de micronúcleos (MN) como biomarcador para auxiliar no diagnóstico e manejo de pacientes com DECHc.

O teste de micronúcleos é um exemplo já bastante utilizado de biomarcador celular associado à técnica de citologia esfoliativa para avaliação do potencial de transformação maligna das lesões orais (26–29). Consiste em um procedimento usado para determinar a quantidade de micronúcleos, células micronucleadas e outras anormalidades nucleares (30).

Micronúcleos são estruturas citoplasmáticas que contêm cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não foram incorporados no núcleo durante a fase da mitose da divisão celular (31). Como resultado, esses micronúcleos ficam no citoplasma da célula sem nenhuma conexão com o núcleo principal (32). A ruptura micronuclear representa o destino de cerca de 40% a 50% dos micronúcleos a qualquer momento (33) e representa um passo fundamental na progressão do câncer. Este evento pode catalisar a evolução genética rápida e a reprogramação epigenética, além de ativar vias de sinalização imunológica e, dessa forma, tem sido associado à progressão metastática, promovendo a sobrevivência das células tumorais e a rápida aquisição de heterogeneidade genômica (31).

Diversos estudos tem investigado a presença de MN em células provenientes de citologia esfoliativa da mucosa oral, principalmente em pacientes com DOPM. Esses estudos destacaram uma correlação entre um maior número de MN e a progressão para o CEC (27–29). Dessa forma, a detecção da presença de MN pode ser um indicador do risco para desenvolvimento do CEC oral (34).

Uma recente revisão sistemática com meta-análise de Caponio et al. (35) avaliou o impacto do tabaco, álcool e exposição a pesticidas na ocorrência de micronúcleos em células da mucosa oral e examinou seu potencial como biomarcador não invasivo para a predição e monitoramento do desenvolvimento de CEC em pacientes de alto risco. Foram analisados 31 estudos cujos resultados confirmaram que há uma maior presença de micronúcleos na mucosa oral de pacientes com DOPM e CEC em comparação ao grupo controle.

Ressalta-se, contudo, uma lacuna importante na literatura no que se refere à avaliação das características citológicas por meio do teste de MN em lesões orais da DECH crônica. Até o momento, baseado em extensas pesquisas, não há estudos publicados que explorem essa associação, o que reforça a originalidade e a relevância do presente trabalho.

Diante da alta morbidade associada à DECH crônica oral e do seu reconhecido potencial de transformação maligna, torna-se fundamental o desenvolvimento de

estratégias diagnósticas que sejam acessíveis, sensíveis e capazes de detectar precocemente alterações celulares sugestivas de malignização. A análise da frequência de micronúcleos, por meio da citologia esfoliativa, desponta como uma ferramenta promissora nesse cenário, possibilitando uma abordagem não invasiva e eficaz no monitoramento dessas lesões. Investigar essa correlação entre alterações clínicas e citogenéticas não apenas contribui para um entendimento mais aprofundado da DECH oral, como também pode impactar diretamente no manejo dos pacientes transplantados, promovendo condutas mais individualizadas, seguras e precoces. Assim, este estudo se justifica não apenas pela inovação metodológica, mas principalmente pelo seu potencial de transformar a prática clínica e melhorar a qualidade de vida de uma população altamente vulnerável.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de utilização do teste de micronúcleos como biomarcador celular em esfregaços citológicos de pacientes submetidos ao TCH e que apresentam manifestação oral de DECH crônica.

2.2.Objetivos específicos

- Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes que desenvolveram DECHc oral.
- Descrever os aspectos clínicos da DECHc oral.
- Avaliar a frequência de MN e de CMN nas células descamadas da mucosa oral íntegra de pacientes que não passaram por TCH.
- Avaliar a frequência de MN e de CMN nas células descamadas da mucosa oral íntegra de pacientes pós TCH.
- Avaliar a frequência de MN e de CMN nas células descamadas de mucosa oral em áreas com lesões de DECHc em pacientes pós TCH.
- Analisar comparativamente os resultados obtidos para os três grupos avaliados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Tipo de pesquisa

O presente trabalho consiste em um estudo observacional transversal com grupos de comparação.

3.2. 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), na Clínica de Estomatologia no setor de Odontologia da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Patologia Bucal do curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná.

3.3. Amostra

A amostra foi composta por 45 participantes divididos em três grupos, sendo eles:

Grupo C: pacientes sem comorbidades e que não foram submetidos à TCH

Grupo T: pacientes pós-TCH sem DECHc oral

Grupo D: pacientes pós-TCH com DECHc oral

A amostra foi selecionada por conveniência, com 15 participantes em cada grupo, sendo composta por indivíduos admitidos no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas (STMO-CHC) da Universidade Federal do Paraná e atendidos pelo Serviço de Odontologia do mesmo hospital (grupos T e D) ou atendidos na Clínica de Estomatologia do curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná (grupo C).

3.3.1. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos maiores de 18 anos que passaram por transplante de células tronco hematopoiéticas no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas (STMO-CHC) da Universidade Federal do Paraná (grupo T) e que apresentaram manifestação oral de DECHc (grupo D). Para o grupo C, foram incluídos participantes sem comorbidades, atendidos na Clínica de Estomatologia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná, e que não apresentavam lesão em boca.

Foram excluídos da pesquisa os participantes que apresentaram outra doença inflamatória crônica, diagnóstico prévio de neoplasias, alguma DOPM (à exceção da DECH) ou com hábitos nocivos como tabagismo ou etilismo. Também foram excluídos os indivíduos que se recusaram a participar da pesquisa ou sujeitos dos quais não foi possível a obtenção dos dados clínicos e de prontuários.

3.4. Aspectos éticos

O presente projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR e o recrutamento de participantes só foi iniciado após a aprovação, sob o número CAAE: 81589324.7.0000.

Para assegurar a privacidade dos participantes, os dados coletados são protegidos e confidenciais, não sendo divulgada nenhuma informação que possa comprometer sua identidade e sendo utilizada somente as necessárias para a elaboração deste trabalho.

Os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo A), redigido de forma simples para que pudessem compreender perfeitamente os procedimentos aos quais seriam submetidos.

3.5. Procedimentos metodológicos

Os procedimentos metodológicos ocorreram em duas etapas: clínica e laboratorial. A história clínica do participante contendo diagnóstico, histórico de TCH, doador e informações demográficas e epidemiológicas foram coletadas a partir do prontuário eletrônico médico-hospitalar. Essas informações foram anotadas na ficha clínica elaborada para a pesquisa e disponível no anexo B.

3.5.1. Etapa clínica

A etapa clínica foi realizada no Ambulatório de Odontologia junto ao STMO do CHC-UFPR (grupos T e D) e na Clínica de Estomatologia do curso de Odontologia da UFPR (grupo C).

Essa etapa foi constituída de exame clínico, busca de informações sobre a história clínica do participante em prontuários, fotografias de lesões apresentadas, de forma que não possibilitasse a identificação do participante, e realização de citologia esfoliativa da mucosa oral. Informações como a realização ou não de TCH, doador e tempo pós transplante foram investigadas e anotadas em ficha específica para avaliação clínica.

O exame clínico foi realizado em consultório odontológico, com boa iluminação e auxílio de gaze e jogo clínico, para que as mucosas possam ser devidamente avaliadas. Após o exame físico e anteriormente às coletas, foram realizadas fotografias das lesões orais. As fotografias foram realizadas para que as características clínicas das lesões apresentadas pudessem ser mais detalhadamente observadas.

Foram coletadas amostras por citologia esfoliativa de pacientes com DECHc oral, bem como de áreas de mucosa íntegra, para posterior análise. A coleta celular foi realizada bilateralmente na borda da língua e na mucosa jugal de todos os participantes do estudo, independentemente da presença ou ausência de DECHc oral, totalizando 180 amostras para análise. Essas amostras foram nomeadas como:

- MJE: Mucosa jugal esquerda
- MJD: Mucosa jugal direita
- BLE: Borda de língua esquerda
- BLD: Borda de língua direita

Essas regiões foram selecionadas com base na literatura (19), por serem áreas de maior incidência de lesões com potencial de transformação maligna.

As células epiteliais descamadas foram coletadas com o auxílio de escova endocervical (cytobrush), em movimentos rotatórios e o material foi posteriormente disposto sobre uma lâmina de vidro, em sentido único e movimentos rotatórios, com o objetivo de transpassar todas as células coletadas sem sobreposição. Posteriormente, as lâminas contendo as células coletadas e devidamente identificadas foram fixadas por imersão em álcool absoluto em frascos apropriados, também identificados. Todas as amostras foram processadas após o tempo mínimo de 2 horas de fixação em imersão em álcool absoluto.

3.5.2. Etapa laboratorial

A etapa laboratorial foi realizada no Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia da UFPR. A coloração das lâminas foi feita utilizando a Reação de Feulgen, uma técnica de coloração específica para DNA (36). A reação de Feulgen é composta por duas etapas: a hidrólise ácida, geralmente realizada com uma solução de HCl e o tratamento com o reagente de Schiff, um leucoderivado da fucsina básica (36). O protocolo utilizado para coloração e montagem das lâminas, incluindo o preparo do reagente de Schiff, pode ser visualizado no anexo C. Após a coloração e montagem das lâminas, elas foram armazenadas em caixas porta lâminas, protegidas da luz.

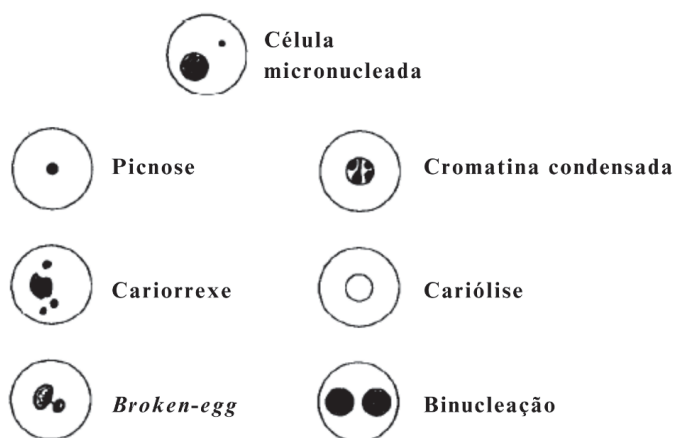
A avaliação das lâminas, com identificação e contagem de micronúcleos, foi realizada em microscópio óptico Olympus Bx 41. O procedimento iniciou-se com a limpeza das lâminas de vidro. Em seguida, foi realizado o ajuste do foco macro e micrométrico, além da análise geral da lâmina e das células na objetiva de 4x. Posteriormente, utilizou-se o aumento de 100x para a estimativa do número de células por campo focal em toda a extensão da lâmina. Na sequência, a lâmina era novamente examinada para identificação e contagem dos MN e das células micronucleadas (CMN), utilizando-se o aumento de 400x. A análise era conduzida de forma sistemática, de cima para baixo e da esquerda para a direita, garantindo o exame completo da lâmina e a obtenção mais precisa tanto da estimativa do número total de células quanto da quantificação de MN e CMN.

A avaliação e identificação de MN foi feita seguindo requisitos propostos por Tolbert, Shy & Allen (1992)(30). A célula deve possuir um núcleo normal e o MN deve atender os seguintes critérios:

- 1) Apresentar perímetro arredondado e liso, sugestivo de membrana;
- 2) Ser menor que um terço do diâmetro do núcleo principal, porém grande o suficiente para se discernir a forma e a cor;
- 3) Deve ser Feulgen-positivo, ou seja, corar em rosa;
- 4) Ter uma intensidade de coloração e textura similares à do núcleo principal;
- 5) Estar no mesmo plano focal que o núcleo principal;
- 6) Apresentar ausência de sobreposição ou ligação com o núcleo principal.

Outras alterações nucleares podem ser identificadas quando se estuda MN (Figura 1). Essas alterações por vezes se assemelham morfológicamente aos MN. No presente estudo, essas alterações não foram contabilizadas.

Figura 1 - Desenho esquemático destacando o aspecto morfológico das alterações nucleares.



Fonte: Autoria própria adaptada de Tolbert, Shy, Allen, 1992.

A frequência de micronúcleos (FMN) e a frequência de células micronucleadas (FCMN) foram determinadas considerando-se o número de MN e de CMN a cada 1000 células. Em seguida, calculou-se a média desses valores para cada grupo, os quais foram posteriormente submetidos à análise estatística.

A examinadora foi calibrada para a realização dos procedimentos técnicos, desde a coleta das células descamadas da mucosa oral, coloração e montagem das lâminas, até a identificação e contagem dos MN e de CMN.

Todos os dados sociodemográficos e os dados provenientes das análises dos materiais biológicos foram tabulados no Microsoft Excel. As fotos foram armazenadas em uma página virtual com acesso restrito.

3.6. Análise estatística

O software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 29.0.0 foi utilizado para a análise dos dados, empregando métodos descritivos e inferenciais. Um nível de significância bicaudal de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As variáveis foram categorizadas como contínuas, ordinais ou nominais, e os testes estatísticos apropriados foram selecionados de acordo com suas características. As estatísticas descritivas resumiram variáveis demográficas e clínicas, incluindo idade, sexo, doença base, tipo de doador, tempo de transplante, micronúcleos a cada 1000 células e células micronucleadas a cada 1000 células. As variáveis contínuas foram apresentadas

como médias $\pm$ desvios-padrão (DP). O teste ANOVA, seguido pelo pós hoc de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças das médias entre os grupos para as variáveis contínuas.

4. ARTIGO

(Arquivo formatado para submissão no periódico Journal of Oral Diagnosis)

Avaliação do teste de micronúcleos como biomarcador citológico na doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica oral

Running head: Micronúcleos como biomarcador na DECHc oral

^aDepartamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

Autor Correspondente:

Juliana Lucena Schussel
Av. Pref. Lothário Meissner, 632.
Curitiba, PR, Brasil
80210-170.
Telefone: +55 41 99223-8274.
E-mail: juliana.schussel@ufpr.br

Financiamento

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio de bolsas de doutorado e de iniciação científica, respectivamente.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Resumo

A doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica (DECHc) é uma complicação relevante após o transplante de células hematopoiéticas (TCH), acometendo até 50% dos receptores. A cavidade oral é o segundo sítio mais afetado, com manifestações com risco para transformação maligna. Este estudo transversal prospectivo avaliou o teste de micronúcleos (MN) como biomarcador citológico em 45 indivíduos, distribuídos em três grupos: saudáveis (C, n=15), pós-TCH sem DECH oral (T, n=15) e pós-TCH com DECH oral (D, n=15). Foram obtidas 180 amostras de mucosa bucal por citologia esfoliativa, coradas pela reação de Feulgen, com análise da frequência de micronúcleos (FMN) e células micronucleadas (FCMN). A média de FMN foi de $0,74 \pm 0,30$ no grupo C, $1,02 \pm 0,42$ no grupo T e $1,63 \pm 0,66$ no grupo D. Para FCMN, os valores foram de $0,67 \pm 0,32$ (C), $0,86 \pm 0,32$ (T) e $1,50 \pm 0,65$ (D). A ANOVA demonstrou diferenças significativas na FMN entre os grupos ($f=13,145$; $p=0,000037$), com post hoc de Tukey indicando $C \neq T$ ($p=0,02678$), $C \neq D$ ($p=0,00003$) e $T \neq D$ ($p=0,00373$). Para FCMN, apenas o grupo D diferiu estatisticamente dos demais. Os resultados mostraram uma associação da DECHc oral ao aumento de CMN, reforçando seu potencial de transformação maligna e a aplicabilidade do teste de MN como método não invasivo de monitoramento.

Palavras-chave

Doença do enxerto-contra-hospedeiro, biomarcador celular, micronúcleos, citologia esfoliativa

Introdução

A doença do enxerto-contrá-hospedeiro (DECH) é uma complicação importante associada à morbidade e mortalidade em pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas (TCH) (1). É uma doença imunomediada complexa e resulta da incompatibilidade entre as células do doador (enxerto) e do receptor (hospedeiro). Ela é classificada como aguda (DECHa) ou crônica (DECHc). A forma aguda, que geralmente ocorre nos primeiros 100 dias após o TCH afeta mais comumente a pele, o fígado e o trato gastrointestinal (2). Já a forma crônica afeta, mais frequentemente, a pele, a cavidade oral, os olhos, o trato gastrointestinal, o fígado e os pulmões (3,4). A DECHc acomete até 50% dos receptores de TCH alogênico (TCH no qual as células-tronco são coletadas de um doador (5)) e frequentemente surge após a DECHa, mas pode se desenvolver também sem manifestação aguda prévia (2) ou ainda, as duas formas podem ocorrer de forma concomitante. Após a pele, a cavidade oral é o segundo sítio mais frequentemente acometido pela DECHc, com até 70% dos pacientes apresentando manifestações orais (6,7). Embora haja sobreposição entre as manifestações agudas e crônicas, a DECHc apresenta características distintas que afetam a cavidade oral.

As manifestações da DECHc em mucosa oral são semelhantes às de muitas outras doenças autoimunes e incluem áreas liquenoides, caracterizadas pela presença de estrias reticulares brancas ou linhas semelhantes a rendas, eritema e úlceras (1). Embora qualquer área da mucosa oral possa ser afetada, as regiões mais frequentemente afetadas incluem a mucosa jugal, a língua e os lábios (8).

Em 2020, a nova classificação de distúrbios orais potencialmente malignos (DOPM) da Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu, além das lesões classicamente consideradas com potencial de transformação maligna, como a leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e o líquen plano oral (LPO), a forma oral de DECHc e as lesões liquenóides orais como lesões de risco.

Diante da alta morbidade associada à DECHc oral e do seu reconhecido potencial de transformação maligna, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias diagnósticas que sejam acessíveis, sensíveis e capazes de detectar precocemente alterações celulares sugestivas de transformação maligna. A análise da frequência de micronúcleos, por meio da citologia esfoliativa, desponta como uma ferramenta promissora nesse cenário, possibilitando uma abordagem não invasiva e eficaz no monitoramento dessas lesões. Investigar essa correlação entre alterações clínicas e

citogenéticas não apenas contribui para um entendimento mais aprofundado da DECHc oral, como também pode impactar diretamente no manejo dos pacientes transplantados, promovendo condutas mais individualizadas, seguras e precoces.

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial do teste de micronúcleos como biomarcador celular em esfregaços citológicos de pacientes submetidos ao TCH que apresentam manifestação oral de DECHc. A relevância do trabalho se justifica não apenas pela inovação metodológica, mas, sobretudo, pelo potencial de impactar a prática clínica e promover melhorias significativas na qualidade de vida de uma população altamente vulnerável.

Métodos

Este estudo constitui uma pesquisa observacional transversal prospectiva com grupos de comparação, realizada no Ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR, na Clínica de Estomatologia e no Laboratório de Patologia Bucal do curso de Odontologia da UFPR. A amostra incluiu 45 participantes, divididos em três grupos de 15 indivíduos: Grupo C (saudáveis, sem comorbidades), Grupo T (pós-TCH sem DECHc oral) e Grupo D (pós-TCH com DECHc oral). A seleção foi por conveniência e os critérios de inclusão contemplaram adultos (>18 anos) submetidos a TCH (grupos T e D) ou saudáveis (grupo C). Foram excluídos indivíduos com outras doenças inflamatórias crônicas, neoplasias prévias, DOPM (exceto DECH) ou hábitos nocivos, além daqueles com impossibilidade de obtenção de dados ou que recusaram participar.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo do Hospital de Clínicas da UFPR (CAAE: 81589324.7.0000), e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, garantindo confidencialidade e uso restrito das informações.

Os procedimentos metodológicos ocorreram em duas etapas: clínica e laboratorial. Na etapa clínica, foi realizado exame oral detalhado, coleta de histórico clínico e fotográfico, e obtenção de amostras de mucosa oral íntegra e com DECHc por citologia esfoliativa, totalizando 180 amostras. As coletas ocorreram bilateralmente na borda da língua e na mucosa jugal, utilizando escova endocervical, e as lâminas foram fixadas em álcool absoluto.

Na etapa laboratorial, as lâminas foram coradas pela reação de Feulgen, permitindo a identificação de micronúcleos (MN) e células micronucleadas (CMN) em microscópio óptico Olympus Bx 41. A contagem seguiu critérios de Tolbert et al. (9) e foi realizada de forma sistemática, utilizando aumentos de 4x, 100x e 400x. A frequência de MN (FMN) e de CMN (FCMN) foi calculada por 1.000 células, método destacado por Caponio et al. (10) como o mais comumente empregado nos trabalhos analisados e as médias por grupo foram submetidas à análise estatística.

Os dados demográficos, clínicos e citológicos foram organizados em planilha Excel e as fotografias armazenadas em sistema restrito. A análise estatística foi realizada no SPSS v.29.0, considerando significância bicaudal $p \leq 0,05$. Para variáveis contínuas,

utilizou-se ANOVA seguida de pós-hoc de Tukey, e os resultados descritivos foram apresentados como médias $\pm$ desvio padrão.

Resultados

O grupo C foi composto por 15 participantes, sendo 9 mulheres e 6 homens, com uma média de idade de $52 \pm 20,27$ anos. O grupo T foi formado por 6 mulheres e 9 homens, a média de idade foi $50,13 \pm 10,82$ anos e as doenças de base mais frequentes foram Leucemia Mielóide Aguda e Anemia Aplásica, ambas com 5 casos. O grupo D foi constituído por 8 mulheres e 7 homens, com uma média de idade de $46,8 \pm 11,46$ anos e teve a Leucemia Mielóide Aguda como a doença de base mais frequente.

Em relação ao tipo de doador do transplante, os participantes do grupo T tiveram o mesmo número de casos de doadores não aparentados (4), aparentados (4) e aparentados haploidênticos (4). Já a maioria de doadores do grupo D foram não aparentados (8 casos). A coleta da amostra no grupo T foi realizada um média de $52,13 \pm 71,37$ meses após a data do transplante, já no grupo D a média foi de $18,71 \pm 26,40$ meses.

No grupo D, apenas 2 dos 15 participantes apresentaram a manifestação de DECH restrita à mucosa bucal, enquanto a maioria (86,67%) apresentou lesões em regiões extrabuciais, sendo a pele a área mais frequentemente afetada.

A forma de manifestação clínica mais frequente da DECHc oral foi a de placa liquenoide (90,48% dos casos), havendo 1 caso de lesão branca reticular associada a áreas erosivas e 1 com lesão ulcerada. A média de sítios acometidos foi de $2,8 \pm 1,02$. São apresentados exemplos das lesões nas Figuras 1 e Figura 2.

Figura 1 - Manifestação clínica da DECH oral: placas liquenoides e hiperqueratóticas



Fonte: Autoria própria (2025).

Figura 2 - Manifestação clínica da DECH oral: placas liquenoides e áreas erosivas



Fonte: Autoria própria (2025).

A FMN e FCMN foi realizada nos três grupos por meio da contagem de células por campo em cada sítio, bem como da quantificação de MN e CMN. A Tabela 1 apresenta os valores médios e desvio padrão da FMN e FCMN para os três grupos.

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão da frequência de micronúcleos (FMN) e de células micronucleadas (FCMN) nos grupos estudados

Variáveis	Grupo C	Grupo T	Grupo D
FMN (Micronúcleos a cada 1000 células)	0,74 ± 0,30	1,02 ± 0,42	1,63 ± 0,66
FCMN (Células micronucleadas a cada 1000 células)	0,67 ± 0,32	0,86 ± 0,32	1,50 ± 0,65

Fonte: Autoria própria (2025).

A análise dos resultados pelo método ANOVA demonstrou diferença estatisticamente significativa nos valores de FMN entre os três grupos ($f = 13,145$; $p = 0,000037$). A análise post hoc pelo teste Tukey mostrou diferenças significativas entre os grupos C e D ($p = 0,00003$), grupos C e T ($p = 0,02678$), e grupos T e D ($p = 0,00373$). Dessa forma, todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Em relação à FCMN, observou-se que o grupo D diferiu dos grupos C e T ($f = 13,754$; $p = 0,000025$), enquanto os grupos C e T não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,48862$). As comparações post hoc mostraram diferença significativa entre os grupos C e D ($p = 0,00003$) e entre os grupos T e D ($p = 0,00111$). Portanto, os grupos C e T não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, mas ambos se diferenciaram estatisticamente do grupo D.

Nos grupos submetidos ao TCH (grupos T e D), foi aplicada uma regressão linear simples para avaliar a influência da idade e do tempo pós transplante sobre a FCMN. Os resultados não demonstraram impacto significativo desses fatores na FCMN total. Especificamente, para o tempo pós-transplante no momento da coleta, observou-se $R^2 = 0,1976$ no grupo T e $R^2 = 0,0181$ no grupo D. Quanto à idade, os valores foram de $R^2 = 0,135$ para o grupo T e $R^2 = 0,041$ no grupo D.

A Tabela 2 resume os valores médios e desvios padrão da frequência de micronúcleos (FMN) e de células micronucleadas (FCMN) nos grupos avaliados, bem como os resultados da análise estatística (ANOVA e teste post hoc de Tukey).

Tabela 2 - Valores médios de FMN e FCMN nos grupos estudados, com resultados da ANOVA, comparações pós-hoc de Tukey e regressões lineares

Variável	Grupo C (média ± DP)	Grupo T (média ± DP)	Grupo D (média ± DP)	ANOVA (F, p)	Comparações significativas
FMN	0,74 ± 0,30	1,02 ± 0,42	1,63 ± 0,66	13,145, p=0,000037	C≠T (p=0,02678) C≠D (p=0,00003) T≠D (p=0,00373)
FCMN	0,67 ± 0,32	0,86 ± 0,32	1,50 ± 0,65	13,754, p=0,000025	C≠D (p=0,00003) T≠D (p=0,00111) C=T (p>0,05)
Regressão linear – Tempo pós transplante	–	R ² =0,1976 (p>0,05)	R ² =0,0181 (p>0,05)	–	–
Regressão linear – Idade	–	R ² =0,135 (p>0,05)	R ² =0,041 (p>0,05)	–	–

Fonte: Autoria própria (2025).

Discussão

Diversos estudos avaliaram o perfil das manifestações orais da DECHc (11–13). O estudo de Pengpis et al. (13) relatou que a maioria dos pacientes analisados (72%) apresentava lesões brancas reticulares associadas a áreas erosivas, diferindo do trabalho de Scaraficci et al. (11), no qual a manifestação clínica mais frequente foi a presença de áreas ulceradas (53,8%), seguida por lesões reticulares associadas a úlceras (19,2%) e por áreas exclusivamente reticulares (19,2%). Já o estudo de Camargo et al. (12), realizado no mesmo hospital que este estudo, apontou que a lesão mais recorrente foi a de placas hiperqueratóticas (76,4%), seguida de lesões liquenoides (72,2%). Além disso, evidenciou que todos os 72 pacientes da amostra apresentavam mais de um tipo de lesão oral com diferentes aspectos, totalizando 188 lesões identificadas.

Esses dados contrastam com os achados do presente estudo, no qual, entre os 42 sítios com lesões identificados nos 15 participantes, a maioria correspondia a lesões de aspecto liquenoide (n=38; 90,48%). Além disso, observou-se 1 sítio com lesão branca reticular associada a áreas erosivas e 1 com lesão ulcerada. A heterogeneidade clínica das lesões e DECH podem comprometer o diagnóstico clínico e interferir na decisão de manejo da lesão. A história médica criteriosa bem como avaliação da lesão são importantes para o diagnóstico assertivo da DECHc.

Em relação a análise de MN, a revisão sistemática com meta-análise de Caponio et al. (10) destacou que nem todos os estudos avaliaram tanto a frequência de micronúcleos

quanto de células micronucleadas. A avaliação de ambos os desfechos é observada em 12 trabalhos, enquanto a avaliação de células micronucleadas é feita em 32 deles.

Nesta pesquisa, ambos os desfechos foram avaliados. Entretanto, a utilização da frequência de células micronucleadas, em vez do valor de micronúcleos, mostrou-se a abordagem mais adequada para avaliações biométricas e estudos envolvendo biomarcadores (14). Isso porque CMN representa a frequência de células portadoras de micronúcleos, constituindo uma medida padronizada, reprodutível e capaz de refletir de forma mais consistente a ocorrência de dano cromossômico. Essa característica favorece a comparação de resultados entre diferentes estudos e populações. Além disso, a análise de CMN possibilita uma avaliação mais robusta e quantitativa do dano genotóxico, uma vez que considera a frequência de células efetivamente portadoras de micronúcleos, enquanto o valor isolado de MN pode não oferecer a mesma abrangência interpretativa.

O número de CMN foi significativamente maior no grupo de participantes com lesões de DECHc oral, mesmo quando comparado aos grupos de indivíduos submetidos ao TCH. Considerando que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de indivíduos saudáveis e o grupo pós-transplante sem lesões, mas que ambos apresentaram valores inferiores ao grupo com DECHc, infere-se que a presença das lesões está associada ao aumento no número de CMN. Esse achado é particularmente relevante, uma vez que, conforme demonstrado na literatura (15–20), níveis elevados de CMN estão correlacionados à progressão maligna de DOPM, sugerindo que as lesões de DECHc oral podem apresentar um maior potencial de transformação maligna.

Até o momento, com base nas amplas pesquisas realizadas, não foram encontrados estudos publicados que tenham explorado o uso do teste de micronúcleos no diagnóstico e monitoramento de lesões orais de DECHc. Entretanto, esse tipo de investigação já vem sendo realizado com outras amostras de risco. A revisão sistemática com meta-análise de Caponio et al. (10) avaliou se havia diferença na presença de MN ou CMN em amostras de citologia esfoliativa oral de indivíduos expostos a fatores de risco conhecidos, como tabagismo, consumo de álcool e pesticidas em comparação aos não expostos. Além disso, analisou se existia diferença na presença de MN e MNC em indivíduos diagnosticados com DOPMs ou CEC em relação a indivíduos saudáveis. Todos os fatores de risco incluídos nesta metanálise mostraram-se associados ao aumento de células micronucleadas.

Além disso, considerando que o teste de micronúcleos é um biomarcador amplamente empregado em associação à citologia esfoliativa para avaliar o potencial de

transformação maligna de lesões orais (15,21–23), os resultados deste estudo corroboram a classificação da DECHc oral como uma DOPM, reforçando o interesse no desenvolvimento de novas técnicas de monitoramento da doença.

Apesar das limitações deste estudo — incluindo o número reduzido de participantes, a heterogeneidade das doenças de base e a variabilidade dos regimes de condicionamento pré-transplante —, os achados apresentados são significativos e reforçam o potencial da avaliação da frequência de células micronucleadas (FCMN) como um biomarcador útil para o monitoramento das lesões de DECHc oral. Os resultados obtidos sugerem que a presença dessas lesões está associada a um aumento na frequência de CMN, o que pode indicar maior risco de transformação maligna, fornecendo subsídios importantes para a prática clínica e para a tomada de decisão terapêutica.

Para pesquisas futuras, recomenda-se a inclusão de amostras maiores e mais homogêneas, bem como a padronização dos critérios de inclusão quanto às doenças de base e aos regimes de condicionamento. Ademais, estudos longitudinais são fortemente indicados, pois poderiam oferecer informações valiosas sobre a dinâmica de progressão das lesões, permitindo a identificação precoce de casos com maior risco de malignização. Essa abordagem contribuiria para o desenvolvimento de protocolos de acompanhamento mais precisos, capazes de melhorar a qualidade de vida de uma população altamente vulnerável.

Considerações finais

Os achados deste estudo demonstram que o teste de micronúcleos é uma ferramenta valiosa para a avaliação de pacientes com DECHc oral, uma vez que os indivíduos com lesões apresentaram aumento significativo de células micronucleadas em comparação aos demais grupos. A heterogeneidade clínica da DECHc reforça a complexidade da doença e a necessidade de métodos diagnósticos confiáveis para seu monitoramento. Nesse contexto, o teste de MN, reconhecido como biomarcador do potencial de transformação maligna de lesões orais, aliado à citologia esfoliativa, oferece uma abordagem não invasiva e eficaz, capaz de detectar alterações celulares precoces, orientar condutas clínicas individualizadas e aprimorar o manejo dos pacientes.

Dessa forma, os resultados obtidos não apenas validam o uso do teste de MN como estratégia diagnóstica, mas também evidenciam seu potencial de transformar a prática clínica, permitindo intervenções mais precoces e contribuindo para a melhora da qualidade de vida de uma população altamente vulnerável.

Referências

1. Velleuer E, Dietrich R, Pomjanski N, de Santana Almeida Araujo IK, Silva de Araujo BE, Sroka I, et al. Diagnostic accuracy of brush biopsy-based cytology for the early detection of oral cancer and precursors in Fanconi anemia. *Cancer Cytopathol.* junho de 2020;128(6):403–13.
2. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 5 de janeiro de 2017;129(1):30–7.
3. Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, Aljurf M, Atsuta Y, Bonfim C, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* 2012;34(2):109–33.
4. Majhail NS, Tao L, Bredeson C, Davies S, Dehn J, Gajewski JL, et al. Prevalence of Hematopoietic Cell Transplant Survivors in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* outubro de 2013;19(10):1498–501.
5. Bazinet A, Popradi G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol Tor Ont.* junho de 2019;26(3):187–91.
6. Arai S, Jagasia M, Storer B, Chai X, Pidala J, Cutler C, et al. Global and organ-specific chronic graft-versus-host disease severity according to the 2005 NIH Consensus Criteria. *Blood.* 13 de outubro de 2011;118(15):4242–9.
7. Lee SJ, Flowers MED. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2008;134–41.
8. Carrard VC, Ferreira LA, Lauxen I da S, Costa CH, Rados PV. Teste dos micronúcleos: um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. *Micronucleus assay: a biomarker of genotoxic damage in exfoliated oral mucosa cells* [Internet]. 2007 [citado 27 de março de 2025]; Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/22805>
9. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* fevereiro de 1992;271(1):69–77.
10. Caponio VCA, Silva FFVE, Popolo F, Giugliano S, Spizzirri F, Lorenzo-Pouso AI, et al. State of art of micronuclei assay in exfoliative cytology as a clinical biomarker of genetic damage in oral carcinogenesis: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2024;794:108508.
11. Scaraficci AC, Fernandes PM, Abreu Alves F, Filho JS, Jaguar GC. Oral manifestations of graft-versus-host disease in patients submitted to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the experience of a Brazilian Cancer Center. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer.* janeiro de 2022;30(1):567–73.
12. Camargo JR de, Grossmann-Pereira H, Mobile RZ, Torres-Pereira CC, Schussel JL. Profile of oral manifestations of graft versus host disease. *J Oral Diagn* [Internet]. 4 de junho de 2025 [citado 18 de agosto de 2025];10. Disponível em: <https://joraldiagnosis.com/revista/article/view/322>

13. Pengpis N, Prueksrisakul T, Chanswangphuwana C. Clinical characteristics of oral chronic graft-versus-host disease according to the 2014 National Institutes of Health (USA) consensus criteria. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal*. 1º de março de 2023;28(2):e167–73.
14. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, et al. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*. 2001;37(1):31–45.
15. Juneja S, Katyal S, Rathore AS, Shetty DC, 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*. 2019;36(2):111–5.
16. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. *Oral Oncol*. abril de 2008;44(4):354–60.
17. Mahimkar MB, Samant TA, Kannan S, Patil T. Influence of genetic polymorphisms on frequency of micronucleated buccal epithelial cells in leukoplakia patients. *Oral Oncol*. outubro de 2010;46(10):761–6.
18. Sánchez-Siles M, Camacho-Alonso F, Ros-Llor I, López-Jornet P. Cytogenetic biomonitoring in oral leukoplakia patients with mild dysplasia. *Int J Dermatol*. dezembro de 2014;53(12):1454–9.
19. Singam PK, Majumdar S, Uppala D, Kotina S, Namana M, Ayyagari KR. Evaluation of genotoxicity by micronucleus assay in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma with deleterious habits. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP*. 2019;23(2):300.
20. Wagh A, Raval J, Aiyer RG, Amin S. Micronuclei in Exfoliated Oral Epithelial Cells in Tobacco Users and Controls with Various Oral Lesions: A Study from Gujarat, India. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg Off Publ Assoc Otolaryngol India*. março de 2019;71(1):109–14.
21. Kokila S, Prasad H, Rajmohan M, Kumar Srichinthu K, Mahalakshmi L, Shanmuganathan S, et al. Evaluation of Micronuclei and Cytomorphometric Changes in Patients with Different Tobacco Related Habits Using Exfoliated Buccal Cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 1º de junho de 2021;22(6):1851–5.
22. Vassoler T, Dogenski LC, Sartori VK, Presotto JS, Cardoso MZ, Zandoná J, et al. Evaluation of the Genotoxicity of Tobacco and Alcohol in Oral Mucosa Cells: A Pilot Study. *J Contemp Dent Pract*. 1º de julho de 2021;22(7):745–50.
23. Upadhyay M, Verma P, Sabharwal R, Subudhi SK, Jatol-Tekade S, Naphade V, et al. Micronuclei in Exfoliated Cells: A Biomarker of Genotoxicity in Tobacco Users. *Niger J Surg Off Publ Niger Surg Res Soc*. 2019;25(1):52–9.

5. RESULTADOS ADICIONAIS

Foram incluídos 45 participantes na pesquisa, divididos igualmente em três grupos.

O grupo C foi composto por 15 participantes, sendo 9 mulheres e 6 homens, com uma média de idade de $52 \pm 20,27$ anos. O grupo T foi formado por 6 mulheres e 9 homens, a média de idade foi $50,13 \pm 10,82$ anos e as doenças de base mais frequentes foram Leucemia Mielóide Aguda e Anemia Aplásica, ambas com 5 casos. O grupo D foi constituído por 8 mulheres e 7 homens, com uma média de idade de $46,8 \pm 11,46$ anos e teve a Leucemia Mielóide Aguda como a doença de base mais frequente.

Em relação ao tipo de doador do transplante, os participantes do grupo T tiveram o mesmo número de casos de doadores não aparentados (4), aparentados (4) e aparentados haploidênticos (4). Já a maioria de doadores do grupo D foram não aparentados (8 casos). A coleta da amostra no grupo T foi realizada um média de $52,13 \pm 71,37$ meses após a data do transplante, já no grupo D a média foi de $18,71 \pm 26,40$ meses.

No grupo D, apenas 2 dos 15 participantes apresentaram a manifestação de DECHc restrita à mucosa bucal, enquanto a maioria (86,67%) apresentou lesões em regiões extrabuciais, sendo a pele a área mais frequentemente afetada.

A caracterização detalhada das amostras separadas por grupo encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização dos grupos T e D: perfil clínico e dados do transplante

Variáveis	Grupo T	Grupo D
Doença Base		
<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>	5	5
<i>Leucemia Linfoide Aguda</i>	0	4
<i>Leucemia Mielóide Crônica</i>	1	2
<i>Leucemia/Linfoma Linfoblástico</i>	0	2
<i>Síndrome Mielodisplásica</i>	0	1
<i>Linfoma Folicular</i>	1	0
<i>Mielofibrose</i>	1	0
<i>Leucemia Mielomonocítica Crônica</i>	1	0
<i>Anemia Aplásica</i>	5	0
<i>Mieloma Múltiplo</i>	1	0
<i>Leucemia Fenótipo misto</i>	0	1
Tipo de Doador		
<i>Não aparentado</i>	4	4
<i>Aparentado</i>	4	8
<i>Aparentado haploidêntico</i>	4	3
<i>Autólogo</i>	2	0
<i>Alogênico haploidêntico</i>	1	0
Tempo do transplante em meses	52,13 ± 71,37	18,71 ± 26,40
Local extrabucal de DECH		
<i>Pulmão</i>	-	1
<i>Olhos</i>	-	2
<i>Pele</i>	-	12
<i>Intestino</i>	-	2
<i>Fígado</i>	-	3
<i>Articulações</i>	-	1

Fonte: Autoria própria (2025).

No grupo D, a manifestação clínica mais frequente foi a de placa liquenoide (90,48% dos casos), havendo 1 caso de lesão branca reticular associada a áreas erosivas e 1 com lesão ulcerada. As Figuras 2 e 3 apresentam imagens representativas da manifestação clínica documentada nos participantes do estudo.

Figura 2 - Manifestação clínica da DECH oral: placas liquenoides e hiperqueratóticas



Fonte: Autoria própria (2025).

Figura 3 - Manifestação clínica da DECH oral: placas liquenoides e áreas erosivas



Fonte: Autoria própria (2025).

A média de sítios acometidos foi de $2,8 \pm 1,02$. A distribuição detalhada dos sítios de ocorrência das lesões no grupo D, por participante, está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição detalhada dos sítios com lesões nos participantes do grupo D

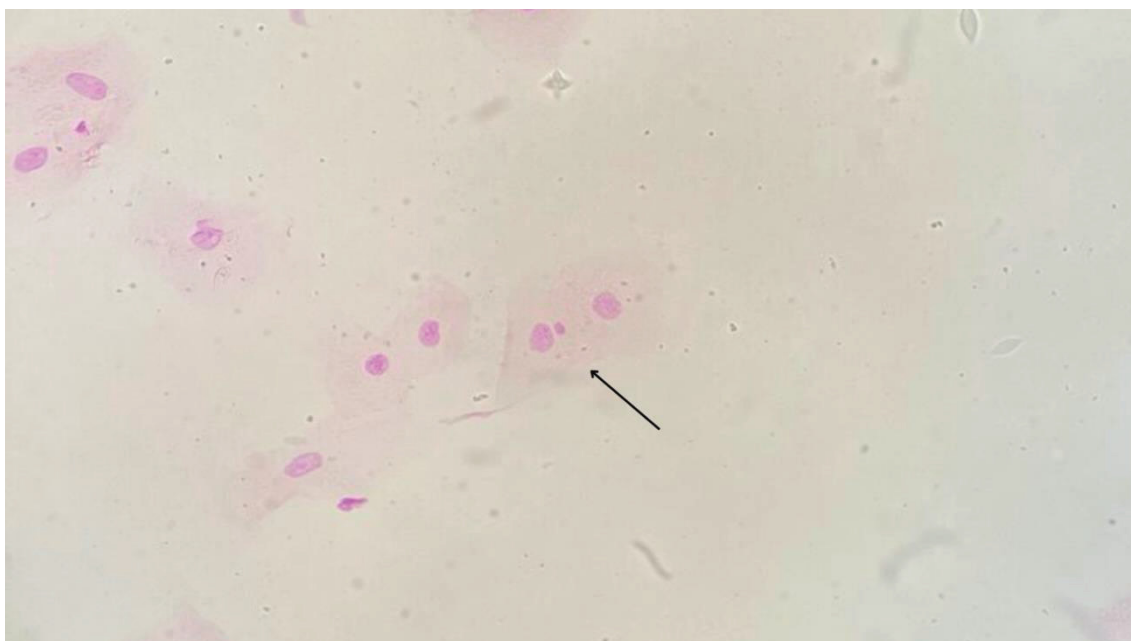
X: sítio acometido e -: sítio não acometido

Nº do participante	Amostra MJD	Amostra MJE	Amostra BLD	Amostra BLE	Total de sítios com lesão
D1	X	X	X	X	4
D2	X	X	X	X	4
D3	X	X	-	-	2
D4	X	X	-	-	2
D5	-	X	-	-	1
D6	X	X	-	-	2
D7	X	X	-	-	2
D8	X	X	-	-	2
D9	X	X	-	X	3
D10	X	X	X	X	4
D11	X	X	X	X	4
D12	X	X	-	X	3
D13	X	X	X	-	3
D14	X	X	X	X	4
D15	X	X	-	-	2

Fonte: Autoria própria (2025).

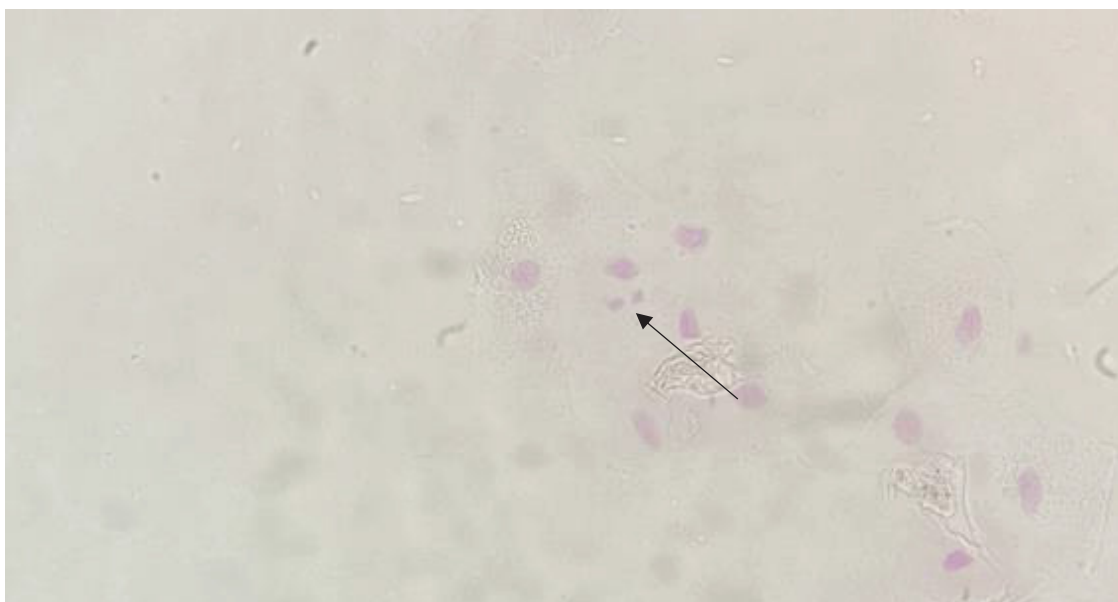
A FMN e FCMN foi realizada nos três grupos por meio da contagem de células por campo em cada sítio, bem como da quantificação de MN e CMN. Um exemplo de célula micronucleada é apresentado na Figura 4, enquanto a Figura 5 ilustra uma célula contendo mais de um micronúcleo.

Figura 4 - Célula micronucleada indicada pela seta



Fonte: Autoria própria (2025).

Figura 5 - Célula micronucleada com dois micronúcleos indicada pela seta



Fonte: Autoria própria (2025).

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os valores de células totais por indivíduo de cada grupo, o número absoluto de micronúcleos e de células micronucleadas, além das frequências de micronúcleos (FMN) e de células micronucleadas (FCMN).

Tabela 3 - Distribuição de células totais, micronúcleos e células micronucleadas do Grupo C

Nº do participante	Células totais do indivíduo	Total de micronúcleos	Total de células micronucleadas	FRMN	FRCMN
C1	5922	6	6	1,0131712	1,013171
C2	10070	10	9	0,9930487	0,893744
C3	10860	8	7	0,7366483	0,644567
C4	4930	7	7	1,4198783	1,419878
C5	12490	9	9	0,7205765	0,720576
C6	20059	8	8	0,3988235	0,398823
C7	8580	6	5	0,6993007	0,582751
C8	16925	5	4	0,295421	0,236337
C9	5265	3	3	0,5698006	0,569801
C10	6235	4	2	0,6415397	0,32077
C11	6610	7	7	1,0590015	1,059002
C12	7770	3	3	0,3861004	0,3861
C13	6095	5	3	0,8203445	0,492207
C14	6220	3	3	0,4823151	0,482315
C15	10815	10	9	0,9246417	0,832178

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 4 - Distribuição de células totais, micronúcleos e células micronucleadas do Grupo T

Nº do participante	Células totais do indivíduo	Total de micronúcleos	Total de células micronucleadas	FRMN	FRCMN
T1	4760	2	2	0,4201681	0,420168
T2	7510	6	5	0,7989348	0,665779
T3	22235	9	9	0,4047673	0,404767
T4	5995	7	6	1,1676397	1,000834
T5	7840	9	7	1,1479592	0,892857
T6	11435	13	12	1,1368605	1,04941
T7	5995	3	3	0,500417	0,500417
T8	8980	9	8	1,0022272	0,890869
T9	4165	2	2	0,4801921	0,480192
T10	14140	13	10	0,9193777	0,707214
T11	11320	20	14	1,7667845	1,236749

T12	7980	11	11	1,3784461	1,378446
T13	19165	26	19	1,3566397	0,991391
T14	10445	14	11	1,3403542	1,053135
T15	11180	17	14	1,5205725	1,252236

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 5 - Distribuição de células totais, micronúcleos e células micronucleadas do Grupo D

Nº do participante	Células totais	Total de micronúcleos	Total de células micronucleadas	FRMN	FRCMN
D1	19220	36	35	1,8730489	1,82102
D2	7390	15	14	2,02977	1,894452
D3	7700	14	12	1,8181818	1,558442
D4	23235	32	30	1,3772326	1,291156
D5	16355	13	11	0,794864	0,672577
D6	9315	16	15	1,7176597	1,610306
D7	23085	20	19	0,8663634	0,823045
D8	11665	19	18	1,6288041	1,543078
D9	5815	3	3	0,5159071	0,515907
D10	3000	10	10	3,3333333	3,333333
D11	9930	17	15	1,7119839	1,510574
D12	9070	16	14	1,7640573	1,54355
D13	6185	8	8	1,2934519	1,293452
D14	5075	10	8	1,9704433	1,576355
D15	4490	8	7	1,7817372	1,55902

Fonte: Autoria própria (2025).

A Tabela 6 apresenta os valores médios e desvio padrão da FMN e FCMN para os três grupos.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão da frequência de micronúcleos (FMN) e de células micronucleadas (FCMN) nos grupos estudados

Variáveis	Grupo C	Grupo T	Grupo D
FMN (Micronúcleos a cada 1000 células)	$0,74 \pm 0,30$	$1,02 \pm 0,42$	$1,63 \pm 0,66$
FCMN (Células micronucleadas a cada 1000 células)	$0,67 \pm 0,32$	$0,86 \pm 0,32$	$1,50 \pm 0,65$

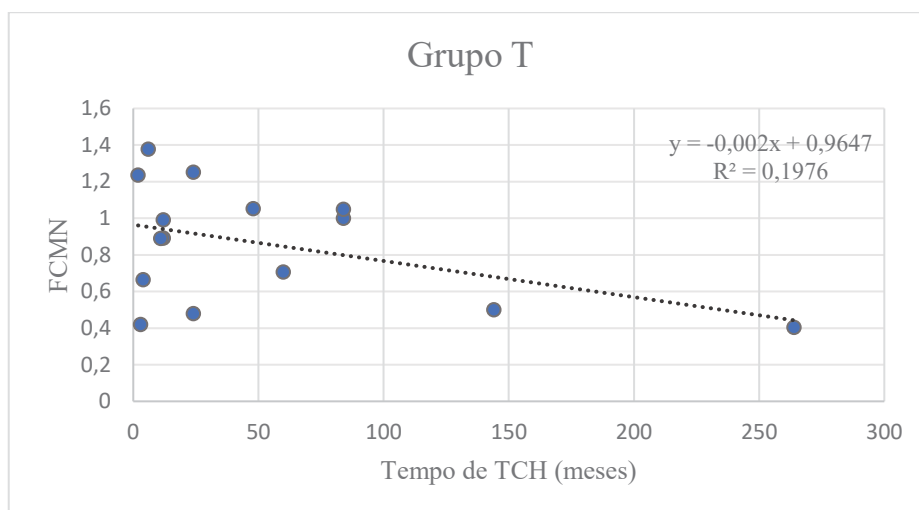
Fonte: Autoria própria (2025).

A análise dos resultados pelo método ANOVA demonstrou diferença estatisticamente significativa nos valores de FMN entre os três grupos ($f = 13,145$; $p = 0,000037$). A análise post hoc pelo teste Tukey mostrou diferenças significativas entre os grupos C e D ($p = 0,00003$), grupos C e T ($p = 0,02678$), e grupos T e D ($p = 0,00373$). Dessa forma, todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Em relação à FCMN, observou-se que o grupo D diferiu dos grupos C e ($f = 13,754$; $p = 0,000025$), enquanto os grupos C e T não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,48862$). As comparações post hoc mostraram diferença significativa entre os grupos C e D ($p = 0,00003$) e entre os grupos T e D ($p = 0,00111$). Portanto, os grupos C e T não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, mas ambos se diferenciaram estatisticamente do grupo D.

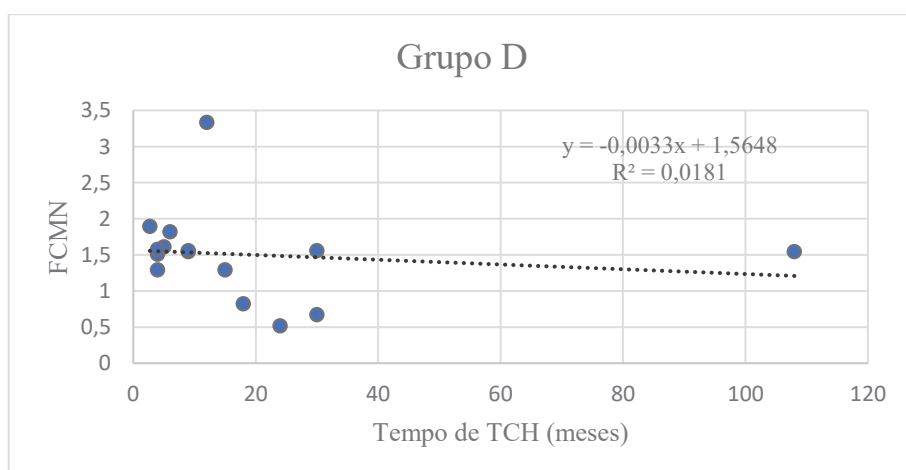
Para os grupos que foram submetidos ao TCH (grupos T e D), foi realizada uma regressão linear simples para verificar a influência da idade e do tempo pós transplante na FCMN. Dessa forma, não foi observado um impacto desses dois fatores na FCMN total. Para o tempo pós-transplante no momento da coleta, no grupo T os valores foram $R^2 = 0,1976$ e no grupo D os valores foram $R^2 = 0,0181$. As Figuras 6 e 7 exibem gráficos da relação entre o tempo pós transplante e a FCMN para os dois grupos.

Figura 6 - Gráfico da FCMN em função do tempo pós-transplante no grupo T



Fonte: Autoria própria (2025).

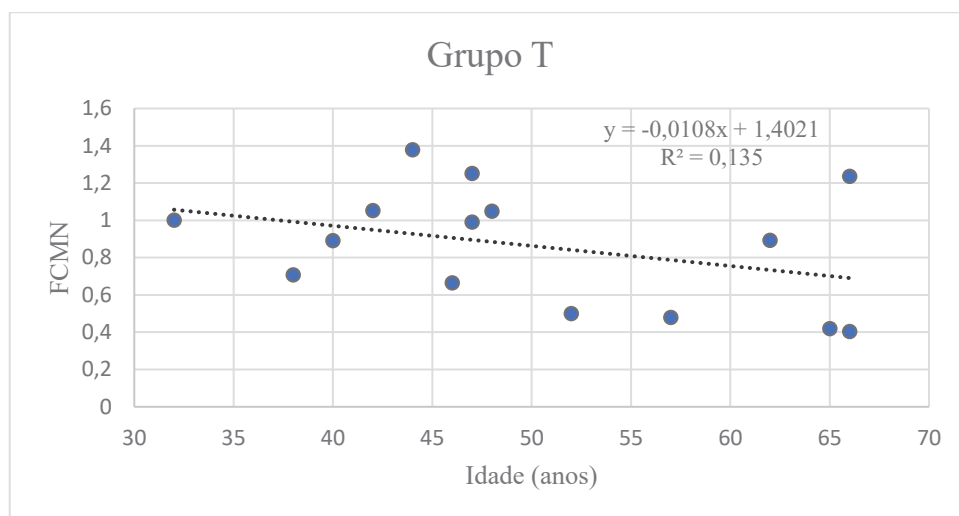
Figura 7 - Gráfico da FCMN em função do tempo pós-transplante no grupo D



Fonte: Autoria própria (2025).

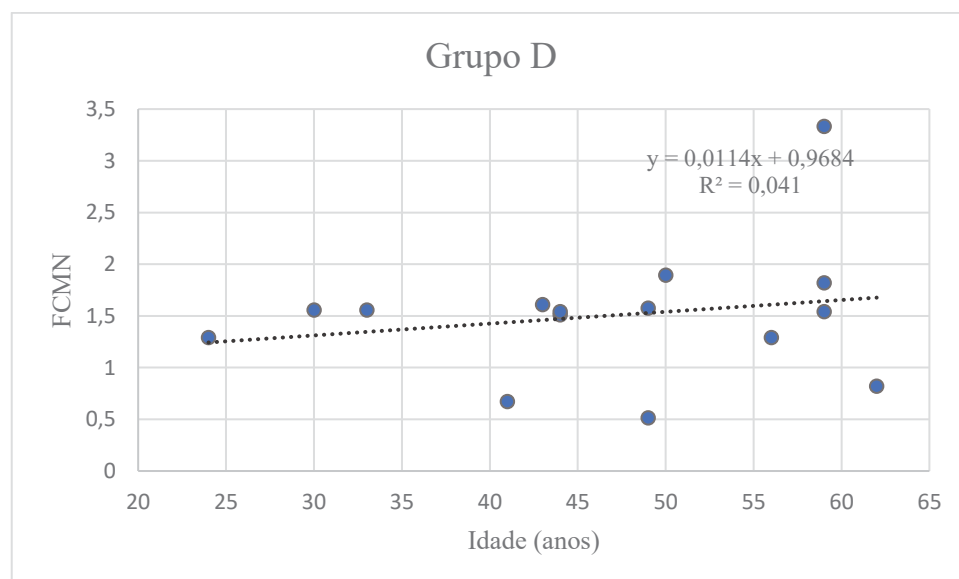
Já para a idade, os valores foram de $R^2 = 0,135$ para o grupo T e $R^2 = 0,041$ no grupo D. As Figuras 8 e 9 mostram gráficos da relação entre a idade do participante e a FCMN. A partir da análise, não foi observada uma associação da idade e do tempo pós-transplante com a FCMN.

Figura 8 - Gráfico da FCMN em função da idade dos participantes no grupo T



Fonte: Autoria própria (2025).

Figura 9 - Gráfico da FCMN em função da idade dos participantes no grupo D



Fonte: Autoria própria (2025).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados deste estudo demonstram que a avaliação de frequência de micronúcleos é uma ferramenta valiosa para a avaliação de pacientes com DECHc oral, uma vez que os indivíduos com lesões apresentaram aumento significativo de células micronucleadas em comparação aos demais grupos. A heterogeneidade clínica da DECHc reforça a complexidade da doença e a necessidade de métodos diagnósticos confiáveis para seu monitoramento. Nesse contexto, o teste de MN, reconhecido como biomarcador do potencial de transformação maligna de lesões orais, aliado à citologia esfoliativa, oferece uma abordagem não invasiva e eficaz, capaz de detectar alterações celulares precoces, orientar condutas clínicas individualizadas e aprimorar o manejo dos pacientes.

Dessa forma, os resultados obtidos não apenas validam o uso do teste de MN como estratégia diagnóstica, mas também evidenciam seu potencial de transformar a prática clínica, permitindo intervenções mais precoces e contribuindo para a melhora da qualidade de vida de uma população altamente vulnerável.

REFERÊNCIAS

1. Bazinet A, Popradi G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol Tor Ont.* junho de 2019;26(3):187–91.
2. Santos PS da S, Granzotto FCN, Antunes HS, de Lima EM, Varanda R de F, Maccari K, et al. Dentistry consensus on HSCT - Part III: Special topics - Dentistry on HSCT. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2023;45(3):379–86.
3. Scaraficci AC, Fernandes PM, Abreu Alves F, Filho JS, Jaguar GC. Oral manifestations of graft-versus-host disease in patients submitted to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the experience of a Brazilian Cancer Center. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer.* janeiro de 2022;30(1):567–73.
4. Margaix-Muñoz M, Bagán JV, Jiménez Y, Sarrión MG, Poveda-Roda R. Graft-versus-host disease affecting oral cavity. A review. *J Clin Exp Dent.* fevereiro de 2015;7(1):e138-145.
5. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* março de 2015;21(3):389-401.e1.
6. Mays JW, Fassil H, Edwards DA, Pavletic SZ, Bassim CW. Oral chronic graft-versus-host disease: current pathogenesis, therapy, and research. *Oral Dis.* maio de 2013;19(4):327–46.
7. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 5 de janeiro de 2017;129(1):30–7.
8. Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, Aljurf M, Atsuta Y, Bonfim C, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* 2012;34(2):109–33.
9. Majhail NS, Tao L, Bredeson C, Davies S, Dehn J, Gajewski JL, et al. Prevalence of Hematopoietic Cell Transplant Survivors in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* outubro de 2013;19(10):1498–501.
10. Lee SJ, Flowers MED. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2008;134–41.
11. Elad S, Aljitawi O, Zadik Y. Oral Graft-Versus-Host Disease: A Pictorial Review and a Guide for Dental Practitioners. *Int Dent J.* fevereiro de 2021;71(1):9–20.
12. Arai S, Jagasia M, Storer B, Chai X, Pidala J, Cutler C, et al. Global and organ-specific chronic graft-versus-host disease severity according to the 2005 NIH Consensus Criteria. *Blood.* 13 de outubro de 2011;118(15):4242–9.

13. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 18 de outubro de 2012;367(16):1487–96.
14. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, Karanes C, Costa LJ, Wu J, et al. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood*. 14 de julho de 2011;118(2):282–8.
15. Weng X, Xing Y, Cheng B. Multiple and Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity After Graft-Versus-Host Disease. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. setembro de 2017;75(9):1899–905.
16. Demarosi F, Soligo D, Lodi G, Moneghini L, Sardella A, Carrassi A. Squamous cell carcinoma of the oral cavity associated with graft versus host disease: report of a case and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. julho de 2005;100(1):63–9.
17. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*. novembro de 2021;27(8):1862–80.
18. Gervazio TC, Silva JK, Evangelista K, Cavalcanti MGP, Silva MAGS, Yamamoto-Silva FP, et al. Risk of oral cancer in patients with graft-vs-host disease: A systematic review and meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. junho de 2022;133(6):650–62.
19. Janowiak-Majeranowska A, Osowski J, Mikaszewski B, Majeranowski A. Secondary Oral Cancer after Systemic Treatment of Hematological Malignancies and Oral GVHD: A Systematic Review. *Cancers*. 27 de abril de 2022;14(9):2175.
20. Velleuer E, Dietrich R, Pomjanski N, de Santana Almeida Araujo IK, Silva de Araujo BE, Sroka I, et al. Diagnostic accuracy of brush biopsy-based cytology for the early detection of oral cancer and precursors in Fanconi anemia. *Cancer Cytopathol*. junho de 2020;128(6):403–13.
21. Nanayakkara PGCL, Dissanayaka WL, Nanayakkara BG, Amaratunga E a. PD, Tilakaratne WM. 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*. 2016;45(4):268–74.
22. Paczesny S, Raiker N, Brooks S, Mumaw C. Graft-versus-host disease biomarkers: omics and personalized medicine. *Int J Hematol*. setembro de 2013;98(3):275–92.
23. Zhao XS, Huang XJ. Seeking biomarkers for acute graft-versus-host disease: where we are and where we are heading? *Biomark Res*. 2019;7:17.
24. Crossland RE, Perutelli F, Bogunia-Kubik K, Mooney N, Milutin Gašperov N, Pučić-Baković M, et al. Potential Novel Biomarkers in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol*. 2020;11:602547.

25. Zhang M, Chen X, Chen H, Zhou M, Liu Y, Hou Y, et al. Identification and validation of potential novel biomarkers for oral squamous cell carcinoma. *Bioengineered*. dezembro de 2021;12(1):8845–62.
26. Juneja S, Katyal S, Rathore AS, Shetty DC, 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*. 2019;36(2):111–5.
27. Kokila S, Prasad H, Rajmohan M, Kumar Srichinthu K, Mahalakshmi L, Shanmuganathan S, et al. Evaluation of Micronuclei and Cytomorphometric Changes in Patients with Different Tobacco Related Habits Using Exfoliated Buccal Cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 1º de junho de 2021;22(6):1851–5.
28. Vassoler T, Dogenski LC, Sartori VK, Presotto JS, Cardoso MZ, Zandoná J, et al. Evaluation of the Genotoxicity of Tobacco and Alcohol in Oral Mucosa Cells: A Pilot Study. *J Contemp Dent Pract*. 1º de julho de 2021;22(7):745–50.
29. Upadhyay M, Verma P, Sabharwal R, Subudhi SK, Jatol-Tekade S, Naphade V, et al. Micronuclei in Exfoliated Cells: A Biomarker of Genotoxicity in Tobacco Users. *Niger J Surg Off Publ Niger Surg Res Soc*. 2019;25(1):52–9.
30. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. fevereiro de 1992;271(1):69–77.
31. Di Bona M, Bakhoun SF. Micronuclei and Cancer. *Cancer Discov*. 8 de fevereiro de 2024;14(2):214–26.
32. Saruhanoglu A, Ergun S, Kaya M, Warnakulasuriya S, Erbağcı M, Öztürk Ş, et al. Evaluation of micronuclear frequencies in both circulating lymphocytes and buccal epithelial cells of patients with oral lichen planus and oral lichenoid contact reactions. *Oral Dis*. julho de 2014;20(5):521–7.
33. Hatch EM, Fischer AH, Deerinck TJ, Hetzer MW. Catastrophic nuclear envelope collapse in cancer cell micronuclei. *Cell*. 3 de julho de 2013;154(1):47–60.
34. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;766:20–31.
35. Caponio VCA, Silva FFVE, Popolo F, Giugliano S, Spizzirri F, Lorenzo-Pouso AI, et al. State of art of micronuclei assay in exfoliative cytology as a clinical biomarker of genetic damage in oral carcinogenesis: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2024;794:108508.
36. Mello MLS, Vidal B de C. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochem*. julho de 2017;119(6):603–9.

ANEXO A - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Juliana Lucena Schussel e Halina Grossmann Pereira, pesquisadoras da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar de um estudo intitulado “Análise da frequência de micronúcleos em doença do enxerto contra hospedeiro crônica oral”. Esse estudo tem como objetivo avaliar as células da boca de pacientes diagnosticados com essa doença e verificar a presença de uma alteração chamada de micronúcleo. A presença de micronúcleos nas células pode indicar maior predisposição para o desenvolvimento de câncer de boca. Para isso, será realizado uma coleta de células da sua boca, com uma pequena escova própria para isso, que depois serão avaliadas no microscópio.

Sua participação é muito importante, pois é através de pesquisas como essas 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 doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) para desenvolver câncer de boca.
2. Caso você aceite participar da pesquisa, será necessário passar por uma avaliação odontológica, na qual será realizada uma entrevista para obter informações sobre sua condição de saúde e tratamentos realizados. Também poderão ser feitas fotografias de lesões presentes na boca. Além disso, será realizado o exame para coleta das células.
3. Para a realização do exame, você precisará comparecer ao serviço de Odontologia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, mas esse exame será realizado seguindo a sua rotina clínica de atendimentos. Durante o exame, será utilizada uma escova para coleta das células da mucosa da boca. A escova será passada na região selecionada pela pesquisadora com leve pressão. 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 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. As pesquisadoras Juliana Lucena Schussel e Halina Grossmann Pereira, dentistas responsáveis por este estudo, poderão ser contatadas 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: 041 99223-8274 ou 041 99608-3996, e-mail: juliana.schussel@ufpr.br ou halinapereira@ufpr, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter, e fornecer as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
8. Se o Sr (a) tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da UFPR – Rua General Carneiro 181 – Alto da Glória – Curitiba/PR. Fone 41 3360-1041 das 08:00 horas às 16:30 horas de segunda a sexta-feira. O CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) é constituído por um grupo de indivíduos com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos como participante da pesquisa.
Caso se faça necessário direcionamento do problema a instâncias superiores, você poderá entrar em contato diretamente com a CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, pelo telefone (61)3315-5877 ou pelo e-mail conep@saude.gov.br
9. 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.
10. 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, este será realizado.
11. 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.
12. O material obtido – lâminas com as células coletadas e imagens – será utilizado unicamente para essa pesquisa.
13. A participação no estudo não acarretará custos para o Sr. (a) e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. O Sr. (a) será ressarcido somente de gastos advindos diretamente da sua participação na pesquisa, como transporte e alimentação durante os seus deslocamentos necessários como participante, quando for o caso, e desde que não estejam relacionados à rotina de seu encaminhamento dentro da Instituição como paciente.
14. As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como 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.

15. Você terá a garantia de que problemas como dor e sangramento decorrentes da realização do exame necessário para o estudo serão imediatamente tratados no local em que você já está sendo atendido (a).
16. 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.

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. Fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema diretamente relacionado ao desenvolvimento da pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome por extenso, legível do Participante e/ou Responsável Legal

Assinatura do Participante e/ou Responsável Legal

(Somente para o responsável do projeto)

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

Nome extenso do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba, ____ de _____ de _____.

ANEXO B – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA
FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

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

Procedência: _____ Cidade Natal: _____

História Clínica

Doença de base: _____ () Não se aplica

TCH: () Sim () Não

Tipo: () Não se aplica

() Não aparentado

() Aparentado Doador: _____

() Aparentado Haploidêntico Doador: _____

Tempo de TCH: _____ () Não se aplica

Outras doenças _____

Presença de DECH

() Pulmão () Olhos () Pele () Boca () Intestino

() Outros _____

() Não () Não se aplica

Avaliação Odontológica

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

Local: _____

Tempo de duração: _____

Descrição das lesões: _____

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: _____

Exames complementares

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: _____

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

1º passo – preparo do Reativo de Schiff

- 1) Dissolver aos poucos 2g de fucsina básica em 300 mL de água fervente
- 2) Esperar esfriar até aproximadamente 30°C
- 3) Filtrar a fucsina em papel filtro duplo
- 4) Adicionar 9g de metabissulfito de potássio e agitar bem para dissolver
- 5) Adicionar os 10mL de HCl 1N aos poucos até atingir a coloração caramelo ou transparente. Utilizar a capela com exaustão devido ao gás tóxico
- 6) Adicionar 2g de carvão ativado no reagente e agitar
- 7) Transferir a solução para um frasco escuro e encoberto por papel alumínio para proteger da luz e deixar na geladeira por 24 horas
- 8) Após 24 horas, filtrar a coloração com papel filtro. A solução deve ficar de amarelo translúcido a transparente
- 9) Após a filtragem, realizar o teste de capacidade de coloração, que consiste em pingar uma gota do reagente em formol 10%. Se ficar lilás ou roxo, a solução está apta para uso.
- 10) Recomenda-se nova filtragem sempre antes da utilização do reativo. A solução deve estar sempre com coloração transparente antes da utilização
- 11) A solução pode ser guardada em geladeira em frasco âmbar, com proteção da luz, por tempo indeterminado.

2º passo – Coleta das células epiteliais descamadas pela técnica de citologia esfoliativa convencional

- 1) Coleta de células epiteliais com escova citobrush em mucosa jugal e borda de língua, bilateralmente
- 2) Identificação do número do participante da pesquisa à lápis na lâmina de vidro com ponta fosca
- 3) Transpasse das células coletadas para a lâmina de vidro
- 4) Fixação por imersão em solução de álcool absoluto por no mínimo 15 minutos
- 5) Identificação dos frascos porta lâminas com informações sobre o participante
- 6) 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 Permout (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).