

Procedimento Operacional Padrão

Assunto: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO HISTOLÓGICO PARA ANÁLISE DE ALTERAÇÕES PRÉ MALIGNAS EM CÉLULAS DA MUCOSA ORAL		
Substitui: -		POP 15
Data de Operacionalização: 03/12/2020		Nº de Páginas: 05
Distribuição: Todos os envolvidos em análise de alterações celulares em mucosa oral		
Elaborado por: Vanessa Cristina de Branco Gonçalves		Data: 01/12/2020
Revisado por: Edgar Maquigussa		Data: 7/12/2020
Aprovado por: Mirian Aparecida Boim		Data: 10/12/2020
Obsoleto em: ___ / ___ / ___ Motivo:		

1. Objetivos

Estabelecer método e critérios técnicos para identificação de mutações, com foco no aparecimento de micronúcleos, em células da mucosa oral.

Elaborar manual de biomonitoramento de população de risco com relação a alterações precoces e mucosa oral

2. Abrangência

Indivíduos de ambos os sexos com idade a partir de 18 anos.

3. Temática

Mutações somáticas são consequências comuns em resposta à poluição ambiental. A identificação de micronúcleo em células da mucosa oral prevê uma detecção precoce dessas mutações. Esta análise simples poderá evitar e prevenir a evolução de doenças resultando em menor gasto com saúde em população de risco.

4. Responsabilidades

Dentista: responsável pela coleta de material feita em mucosa oral de pacientes odontológicos, análise e interpretação dos resultados.

Procedimento Operacional Padrão

Técnico: responsável pelo preparo das lâminas, o que inclui o preparo do material coletado em raspagem da mucosa oral, e coloração das lâminas.

Patologista: responsável pela análise das lâminas e identificação de alterações nucleares

Pesquisador Principal: responsável pela condução das diferentes etapas de realização do protocolo, disponibilizar e difundir protocolo aos diversos setores profissionais relacionados.

Pesquisador Colaborador: Auxiliar na análise de dados.

5. Definição

A poluição ambiental provoca sérios danos à saúde, incluindo as mutações genéticas principalmente em populações que sofrem diretamente com a ação dos poluentes. Estas manifestações representam um grande interesse em saúde pública, principalmente na prevenção de doenças, como as tumorais (1).

O teste de Micronúcleo representa uma importante ferramenta para monitorar alterações genéticas precoces em populações expostas a poluentes ambientais (2).

O potencial mutagênico dos poluentes em região sob influência de polo petroquímico da região de Santos/ Cubatão sobre a mucosa oral não é conhecido.

O estabelecimento do método de identificação de micronúcleos em mucosa oral permitirá o monitoramento desta população com relação à manifestação precoce de doença com potencial cancerígeno.

Difundir esta técnica entre os profissionais de saúde pública, principalmente na área odontológica pode contribuir para a prevenção de doenças com enorme impacto social e de elevado custos em saúde.

6. Procedimentos

6.1 População a ser estudada: Indivíduos atendidos em ambulatórios públicos localizados em 2 regiões distintas, sendo uma localizada no entorno do polo petroquímico de Cubatão e outra localizada na cidade de Praia Grande que está aproximadamente 30 km distante do polo petroquímico. Serão constituídos assim, 2 grupos de indivíduos, o grupo “exposto aos poluentes” e o grupo controle (não exposto). Serão incluídos indivíduos de ambos os sexos, acima de 18 anos, que concordarem em participar através de consentimento e assinatura do TCLE.

6.2 Critérios de inclusão: ausência de históricos de neoplasias progressas e atuais em cavidade oral, não ter sido submetido a procedimentos cirúrgicos em boca recentemente. Ausência de doenças sistêmicas (diabetes mellitus, doenças autoimunes, anemias).

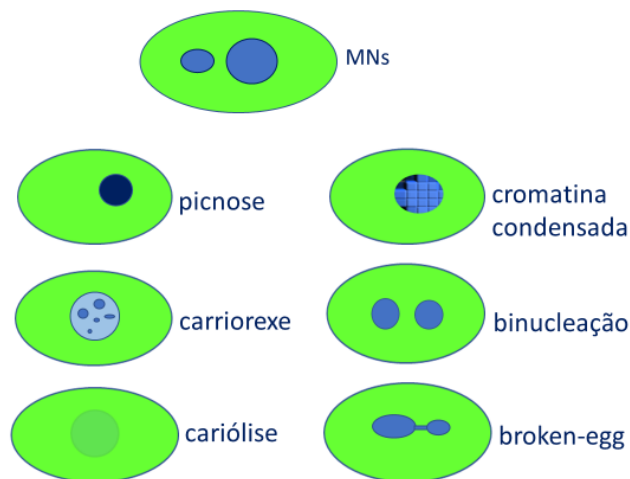
6.3 Coleta de amostras: células epiteliais serão obtidas através de raspagem gentil da mucosa oral, consistente da mucosa jugal, realizada por espátulas de madeira após enxague da boca com soro fisiológico (0,9%) estéril para remoção de possíveis detritos,

Procedimento Operacional Padrão

debris e diminuição da quantidade de bactérias. As amostras serão transferidas para tubos contendo líquido conservante.

6.4 Preparo das lâminas: As amostras serão centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante será removido e o processo repetido por 3 vezes. Em seguida será adicionada solução de metanol/ácido acético na proporção de 3:1 para fixação. De 3 a 4 gotas da suspensão de células serão colocadas em lâmina de vidro estéril, limpa e seca. Amostras serão secas em temperatura ambiente por 24 horas. Após a fixação em lâminas as amostras serão coradas com método de Feulgen com contra coloração de Fast Green (3), permitindo a observação de fragmentos nucleares ou alterações nucleares (4).

6.5 Análise de alterações nucleares: Dentro das alterações, primeiramente serão analisados e contados os micronúcleos (MNs) em células viáveis, fenômeno indicativo de genotoxicidade. Além dos MNs, a identificação de outros fenômenos, principalmente envolvidos na apoptose, também serão considerados na análise por estar relacionados à genotoxicidade (5,6). Entre esses eventos destacam-se a condensação de cromatina, picnose (aumento de cromatina e diminuição do tamanho do núcleo), cariorexis (fragmentação do núcleo em pequenos corpos), cariólise (dissolução do núcleo, ausência de núcleo estabelecido) e *broken-egg* (corpos arredondados com cor semelhante ao núcleo, porém menor e ligado ao núcleo principal por um ligamento de cromatina). Estas alterações estão representadas no esquema 1.



Esquema 1: Diagrama demonstrando alterações nucleares e MNs comumente relacionadas à genotoxicidade.

6.6 Análise estatística dos dados: As variáveis consideradas serão compostas pelos escores de pontuação (frequência com que aparecem) de genotoxicidade, citotoxicidade, apoptose e necrose. Será estabelecido significância de $p < 0,05$. A comparação entre os grupos será realizada pelo teste U de Mann-Whitney (não paramétrico).

Procedimento Operacional Padrão

7. Divulgação dos resultados

Além de artigo científico, os resultados serão utilizados na laboração de manual com informações técnicas sobre a identificação das alterações precoces da mucosa oral na população de interesse. O manual deverá conter informações detalhadas sobre os métodos de coleta e avaliação das amostras, permitindo a unificação do teste em todos os serviços públicos de saúde. Considerando-se que as técnicas de coleta, preparo e identificação de alterações nucleares são bastante simples, baixo custo e de fácil execução, este biomonitoramento terá grande potencial para identificação de condições pré malignas na população em geral e em particular na população exposta à poluição ambiental.

8. Referências Bibliográficas

1. Coronas, M. V., Horn, R. C., Ducatti, A., Rocha, J. V., Vargas, V. M. F. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.2008;650(2): 196-201.
2. Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., Bonassi, S. The Human Micronucleus Project: an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.1999; 428(1-2): 271-83.
3. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E. et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*.2009;4(6): 825-38.
4. Souto, R., Borges, F. R., da Cruz, D. M., Vilanova-Costa, C. A. S. T., da Cruz, A. D. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*.2010;37(2): 297-307.
5. Tolbert, P. E., Shy, C. M., Allen, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*.1992;271(1): 69-77.
6. Meireles, J.R.C., Lopes, M. A., Alves, N. N., Cerqueira, E. D. M. M. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2006;52(4): 337-43.

Procedimento Operacional Padrão

Controle de Revisão

Data	Versão	Revisor	Alteração