

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

RENATA FERREIRA PRIGOL

ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS CÉLULAS DESCAMADAS DE INDIVÍDUOS
EXPOSTOS AOS FATORES DE RISCO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
BOCA

PORTO ALEGRE

2021

RENATA FERREIRA PRIGOL

ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS CÉLULAS DESCAMADAS DE INDIVÍDUOS
EXPOSTOS AOS FATORES DE RISCO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
BOCA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para obtenção do título
de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

PORTO ALEGRE

2021

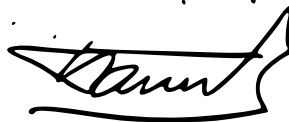
RENATA FERREIRA PRIGOL

ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS CÉLULAS DESCAMADAS DE INDIVÍDUOS
EXPOSTOS AOS FATORES DE RISCO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
BOCA

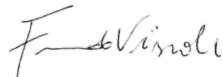
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para obtenção do título
de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre, 17 de maio de 2021.



Pantelis Varvaki Rados
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Fernanda Visioli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Márcia Gaiger de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Elisabete e Renato, pela educação, valores e amor incondicional. Ao meu irmão, Luís Henrique, pelo companheirismo, pela amizade e por ser inspiração para mim. Vocês são meus maiores incentivadores, que sempre me deram suporte para ir em busca dos meus sonhos.

Às minhas amigas Júlia e Luísa, que estiveram comigo desde a infância e tornam minha caminhada mais leve e feliz.

Ao meu orientador, Prof. Pantelis, pela paciência, dedicação, incentivo e ensinamentos. Pela possibilidade de fazer iniciação científica e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado que tive nesses anos.

Aos amigos da patologia, em especial à Tatiana, que me acompanhou durante a iniciação científica, me orientando e ensinando muito.

Aos meus colegas de turma, que se tornaram uma família para mim e que amenizaram as dificuldades do percurso.

Por fim agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de qualidade, excelentes professores e funcionários queridos.

RESUMO

O carcinoma espinocelular representa mais de 90% dos casos de neoplasias da cavidade bucal. A maior prevalência do câncer de boca ocorre em homens, etilistas e tabagistas, entre 55 e 64 anos, de cor branca e baixa escolaridade. A etiologia é considerada multifatorial, sendo que o uso de álcool e tabaco são os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do câncer de boca. Muitos casos de câncer bucal são precedidos por desordens potencialmente malignas, principalmente leucoplasias e eritroplasias. O diagnóstico precoce aumenta a sobrevida e diminui a morbidade e mortalidade dos pacientes com câncer de boca. Durante o processo de transformação maligna ocorrem mudanças celulares antes de se tornarem clinicamente perceptíveis. A citopatologia é um método que consegue identificar mudanças celulares iniciais, podendo ser útil na triagem de desordens potencialmente malignas e carcinoma espinocelular. O objetivo do estudo foi analisar a citomorfologia de células da mucosa bucal de pacientes fumantes e etilistas, com lesões leucoplásicas e com carcinoma espinocelular, comparando-os a pacientes controle (sem lesões e não expostos a álcool e fumo) a fim de verificar a possível existência de variações morfométricas entre os grupos. A amostra foi composta por 60 indivíduos classificados nos seguintes grupos grupo controle (GC), grupo álcool e fumo (GAF), grupo leucoplasia (GL) e grupo carcinoma espinocelular (GCEC). Foram realizadas as coletas citológicas e em seguida as lâminas foram coradas com a técnica de Papanicolau. A análise citomorfométrica foi feita a partir da captura fotográfica de 50 células distendidas e não sobrepostas de cada indivíduo. Foram analisados o diâmetro citoplasmático, diâmetro nuclear e razão núcleo/citoplasma. Os resultados demonstraram aumento do diâmetro nuclear e da relação núcleo/citoplasma no grupo GCEC. Não foi possível encontrar diferenças no diâmetro nuclear nem na relação núcleo/citoplasma entre os grupos GC, GAF e GL. O aperfeiçoamento da citomorfometria com a utilização de técnicas adicionais ou com desenhos experimentais longitudinais podem auxiliar no desenvolvimento de protocolos de rastreamento do câncer bucal.*

Palavras-chave: Câncer bucal. Leucoplasia. Citopatologia. Citomorfometria.

* "Esta pesquisa recebeu financiamento da FAPERGS Proc. n. 17/2551-0001470-7"

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma represents more than 90% of cases of neoplasms of the oral cavity. The highest prevalence of oral cancer occurs in men, alcoholics and smokers, between 55 and 64 years old, white and with low education. The etiology is considered multifactorial, and the use of alcohol and tobacco are the most important risk factors for the development of oral cancer. Many cases of oral cancer are preceded by potentially malignant lesions, mainly leukoplakia and erythroplasia. Early diagnosis increases survival and decreases the morbidity and mortality of patients with oral cancer. During the process of malignant transformation cellular changes occur before becoming clinically perceptible. Cytopathology is a method that can identify initial cell changes and can be useful in screening for potentially malignant lesions and squamous cell carcinoma. The objective of the study was to analyze the cytomorphology of oral mucosa cells of smoking and alcoholic patients, with leukoplastic lesions and squamous cell carcinoma, comparing them to control patients (without lesions and not exposed to alcohol and smoke) in order to verify the possible existence of morphometric variations between groups. The sample consisted of 60 individuals classified into the following groups: control group (CG), alcohol and tobacco group (GAF), leukoplakia group (GL) and squamous cell carcinoma group (GCEC). Cytological collections were performed and then the slides were stained with the Papanicolau smear. The cytomorphometric analysis was made from the photographic capture of 50 distended and non-overlapping cells of each individual. The cytoplasmic diameter, nuclear diameter and nucleus / cytoplasm ratio were analyzed. The results showed an increase in the nuclear diameter and in the nucleus / cytoplasm ratio in the GCEC group. It was not possible to find differences in the nuclear diameter or in the nucleus / cytoplasm ratio between the GC, GAF and GL groups. The improvement of cytomorphometry with the use of additional techniques or with longitudinal experimental designs can assist in the development of oral cancer screening protocols*.

Keywords: Oral cancer. Leukoplakia. Pathology. Cytomorphometry.

* "This research received financial support from FAPERGS proc. n. 17/2551-0001470-7"

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 METODOLOGIA	10
2.1 AMOSTRA	10
2.3 COLETA CITOPATOLÓGICA.....	10
2.3 ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA.....	11
3 RESULTADOS.....	13
4 DISCUSSÃO	15
5 CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS.....	19
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	21
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	25
ANEXO C – FICHA DE ANAMNESE.....	26
ANEXO D – TÉCNICA DE PAPANICOLAU MODIFICADO	28
ANEXO E – FINANCIAMENTO	29

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é uma das neoplasias mais incidentes no Brasil, estimativas apontam que para o ano de 2020 serão 15.190 novos casos de câncer da cavidade bucal no país. Entre as mulheres cerca 4.010 casos e entre os homens 11.180, sendo no sexo masculino o quinto tipo de câncer mais incidente (INCA, 2020). O carcinoma espinocelular representa a maioria dos casos de câncer de cabeça e pescoço, chegando a representar mais de 90% dos casos de neoplasias orais (DEDIVITIS et al., 2004; NEVILLE et al., 2016). A maior prevalência do câncer de boca ocorre em homens, etilistas e tabagistas, de faixa etária entre 55 e 64 anos, de cor branca e baixa escolaridade. A localização anatômica mais comum é a borda de língua seguida de assoalho de boca (SOARES; BASTOS NETO; SANTOS, 2019).

A etiologia do câncer de boca é considerada multifatorial, sendo influenciada por diversas variáveis relacionadas a estilo de vida e hábitos pessoais. Dentre os principais destacam-se o uso de álcool e tabaco, a exposição solar, a nutrição e predisposição genética. (SOARES; BASTOS NETO; SANTOS. 2019). O tabagismo e a ingestão de álcool são os fatores de risco mais importantes para desenvolvimento do câncer bucal. O efeito isolado desses fatores é difícil de ser avaliado pois geralmente seu uso é associado. Contudo, evidências apontam que o uso do tabaco é fator de risco independente para o câncer de boca, entre pacientes que desenvolvem carcinoma espinocelular, cerca de 80% são tabagistas. Além disso, o risco de desenvolvimento de câncer se eleva conforme aumenta o tempo e a quantidade de tabaco utilizada. Quando o tabagismo é associado ao álcool, há um aumento na incidência dessa neoplasia (REIS et al., 2006; NEVILLE et al., 2016).

O tratamento do paciente com câncer bucal apresenta desafios complexos e multidisciplinares que impactam na sobrevivência e qualidade de vida. O tumor ou seu tratamento podem afetar funções importantes como respiração, fala, deglutição, visão, olfato, paladar, mastigação e, muitas vezes, levar a óbito (WONG; WIESENFELD, 2015). Dependendo do estágio que a

doença se encontra, o tratamento pode envolver, principalmente, cirurgia, radioterapia e quimioterapia, por isso, é muito importante realizar o diagnóstico precocemente (NEVILLE et al., 2016; JAIRAJPURI et al., 2019).

Evidências apontam que muitos casos de câncer bucal são precedidos por desordens potencialmente malignas (DIONNE et al., 2015). Essas desordens se caracterizam por um tecido que está morfológicamente alterado, onde é mais provável o desenvolvimento de câncer quando comparado ao tecido normal. Entre as principais desordens potencialmente malignas orais as mais comuns são leucoplasia e eritroplasia (MAIA et al, 2016).

Os cirurgiões dentistas tem papel fundamental detectando desordens potencialmente malignas e diagnosticando precocemente o câncer de boca (WONG; WIESENFELD, 2015). O diagnóstico precoce dos tumores de boca e faringe aumenta a sobrevida e diminui a morbidade e mortalidade, por isso, é muito importante conhecer os fatores de risco e sintomatologia apresentada pelo paciente. Apesar da importância, a maioria dos pacientes é diagnosticado com a doença em um estágio mais avançado (MELO et al., 2010; MEHROTRA; GUPTA, 2011). Por isso, o desenvolvimento de ferramentas auxiliares de diagnóstico é muito importante (AWAN; MORGAN; WARNAKULARURIYA, 2015).

O diagnóstico de câncer bucal e das desordens potencialmente malignas é realizado através de exame clínico e biópsia, seguida de exame histopatológico, que é considerado o padrão ouro (PATEL et al., 2011; FONTES et al, 2013). Sabe-se que durante o processo de transformação maligna ocorrem mudanças moleculares, antes de se tornarem clinicamente perceptíveis (JAIRAJPURI et al., 2019). A citopatologia é um método não invasivo que consegue prever mudanças celulares iniciais, mesmo antes de haver uma lesão clinicamente visível, podendo ser útil na triagem de desordens potencialmente malignas e carcinoma espinocelular, além disso, pode ser repetida com certa frequência sem causar grandes desconfortos ao paciente (RAMAN; KAMBOJ; NARWAL, 2019; SILVA et al., 2017; PATEL et al., 2020). A citopatologia permite a coleta de células intactas de diferentes camadas do epitélio para análise microscópica e quantitativa, porém possui alta porcentagem de falsos negativos,

que se devem a variações de técnica, pouca quantidade de células no esfregaço e amostragens inadequadas. Por isso, seu uso é mais frequente em revisões de pacientes de alto risco, para seleção de área de biópsia mais adequada em lesões extensas, quando a biópsia é contraindicada ou está indisponível, no acompanhamento de casos já tratados de câncer e para rastreamento do câncer de boca (JAIRAJPURI, et al., 2019; SHAILA, SHETTY, PAI, 2016).

A avaliação citomorfométrica do esfregaço é uma análise quantitativa e objetiva que permite perceber alterações morfológicas em lesões malignas e em distúrbios potencialmente malignos a partir de parâmetros como tamanho celular, tamanho nuclear e razão entre núcleo e citoplasma (PATEL et al., 2020; JAIRAJPURI, 2019; PALAKURTHY et al., 2017). Técnicas como a citomorfometria podem aumentar a sensibilidade da citopatologia para o diagnóstico precoce do câncer bucal, seu uso pode melhorar a confiabilidade diagnóstica da técnica (JAIRAJPURI, et al., 2019; SHAILA, SHETTY, PAI, 2016). Através do uso da citomorfometria foi demonstrado um aumento da relação núcleo citoplasma em pacientes com carcinoma espinocelular, evidenciando a capacidade deste método em auxiliar no acompanhamento do desenvolvimento de alterações na mucosa bucal de pacientes que estão expostos aos fatores de risco (LEPPER, 2018; SALGUEIRO et al., 2020). Apesar disso, uso da citopatologia para diagnóstico ainda é controverso, todavia seu uso no rastreamento do câncer de boca parece ser eficiente (PATEL et al., 2011; SILVA et al., 2017). Diante disso o objetivo do estudo foi analisar a citomorfologia de células da mucosa bucal de pacientes fumantes e etilistas, com lesões leucoplásicas e com carcinoma espinocelular, comparando-os a pacientes controle (sem lesões e não expostos a álcool e fumo) a fim de verificar a possível existência de variações morfométricas entre os grupos.

2 METODOLOGIA

2.1 AMOSTRA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número CAAE 71681817.3.0000.5347 (ANEXO A). Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS.

A coleta e seleção da amostra foi realizada por conveniência na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no município de Porto Alegre e participaram da pesquisa pessoas com idade superior a 18 anos e de ambos os sexos. A amostra coletada foi composta por 60 indivíduos que foram distribuídos da seguinte forma:

Grupo controle (GC): composto por indivíduos que não estavam expostos ao fumo e que consumissem menos de 30g/dia de álcool.

Grupo álcool e fumo (GAF): indivíduos expostos ao álcool e ao fumo. Sendo incluídos indivíduos que fumavam pelo menos 20 cigarros com filtro por dia por à pelo menos um ano ou mais de 10 cigarros com filtro por mais de 10 anos, podendo ou não estar associado ao consumo de mais de 30g/dia de álcool

Grupo leucoplasia (GL): indivíduos que apresentavam lesões clinicamente compatíveis com leucoplasia.

Grupo carcinoma espinocelular (GCEC): indivíduos que apresentavam lesões de carcinoma espinocelular confirmado pelo exame histopatológico.

2.3 COLETA CITOPATOLÓGICA

No primeiro momento foi exposto ao paciente quais eram os objetivos da pesquisa, seus possíveis desconfortos, riscos e benefícios, e a leitura do Termo

de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO B). Após a concordância do paciente em participar da pesquisa o TCLE foi assinado e entregue uma via deste termo.

O paciente foi submetido a entrevista contendo um questionário (ANEXO C), e em seguida foi examinado na cadeira odontológica. A inspeção foi realizada com a utilização de luz do refletor, odontoscópio, abaixador de língua e gaze para auxílio na retirada da saliva e tração da língua. A sequência dos locais de exame foi: lábios, mucosa bucal, cristas alveolares e gengivas, palato duro e mole, língua e assoalho da boca. O paciente foi classificado nos seguintes grupos de estudo GC, GAF, GL e GCEC, confirmados após exame histopatológico. Essa avaliação foi registrada em banco de dados quanto à presença ou ausência de lesões.

As coletas citológicas foram realizadas com um Citobrush®, da região de borda de língua e assoalho de boca dos grupos controle e álcool e fumo e diretamente das lesões, evitando áreas ulceradas, nos grupos leucoplasia e carcinoma espinocelular. As células coletadas foram transferidas para lâminas de vidro que com movimentos circulares na mesma direção, e em seguida, eram fixadas e armazenadas em álcool absoluto e sob refrigeração até serem processadas. O processamento se deu por meio da técnica de coloração de Papanicolau (ANEXO D).

2.3 ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA

Na análise citomorfométrica, após o processamento foram capturadas imagens das 50 primeiras células que estivessem bem distendidas e não sobrepostas. As lâminas foram analisadas da direita para a esquerda e de cima para baixo, conforme a Figura 1, a fim de evitar que as mesmas células fossem capturadas mais de uma vez. Para obtenção das imagens foi utilizado o microscópio na ocular de 40x e uso do software Cell Sens®. Por fim, com auxílio do software ImageJ® foram obtidas duas medidas para citoplasma e duas para o núcleo para determinar o diâmetro citoplasmático (DC) e diâmetro nuclear

(DN). As medidas foram obtidas utilizando duas linhas perpendiculares entre si, formando um ângulo de 90° , tanto para citoplasma como para núcleo. DC e DN foram obtidos a partir das médias entre as duas medidas de cada parâmetro. Os dados foram tabulados e a partir das médias calculou-se a relação núcleo/citoplasma (N/C).

Figura 1. Sentido de análise das lâminas.



Sentido de análise das lâminas para evitar captura das mesmas células mais de uma vez.

Fonte: elaborada pela autora.

3 RESULTADOS

Neste estudo foram coletados 60 indivíduos, porém 11 amostras foram consideradas inadequadas para a realização das análises, devido a degradação rápida que ocorre com a técnica de coloração. A distribuição por sexo, cor e média de idade estão descritas na Tabela 1. Mais da metade da amostra foi composta por homens, sendo que, no grupo GCEC ela foi exclusivamente masculina. A média de idade dos participantes foi de 56,74 anos, variando entre 33 e 80 anos. A branca foi a cor de pele mais predominante em nossa amostra, seguida da cor parda e negra. No caso específico do grupo GL optou-se por manter os casos com e sem displasia epitelial agrupados, tendo em vista o número de casos com displasia (3 casos).

Tabela 1. Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo.

	Sexo			Média de Idade (Desvio padrão)	Cor				Total de indivíduos por grupo
	Feminino	Masculino	Informação não obtida		Branco	Negros	Pardos	Informação não obtida	
GC	6	5	1	58,63 (10,23)	8	1	2	1	12
GAF	2	2	4	54,25 (10,56)	3	1	0	4	8
GL	11	12	3	55,64 (12,09)	14	1	1	10	26
GCEC	0	3	0	59,33 (15,63)	2	0	1	0	3
Total	19	22	8	56,74 (11,36)	27	3	4	15	49

A avaliação do diâmetro do citoplasma, diâmetro do núcleo e a relação núcleo/citoplasma estão descritas na Tabela 2 e Gráfico 1.

Da análise dos dados obtidos destas mensurações, observa-se, pela análise citomorfométrica, aumento da razão núcleo/citoplasma no GCEC quando comparado aos outros grupos. Também foi possível observar um aumento do diâmetro nuclear e uma diminuição do diâmetro citoplasmático no grupo GCEC em relação aos outros grupos. Os demais grupos experimentais apresentaram valores de mensuração muito próximos entre si em todas as variáveis mensuradas.

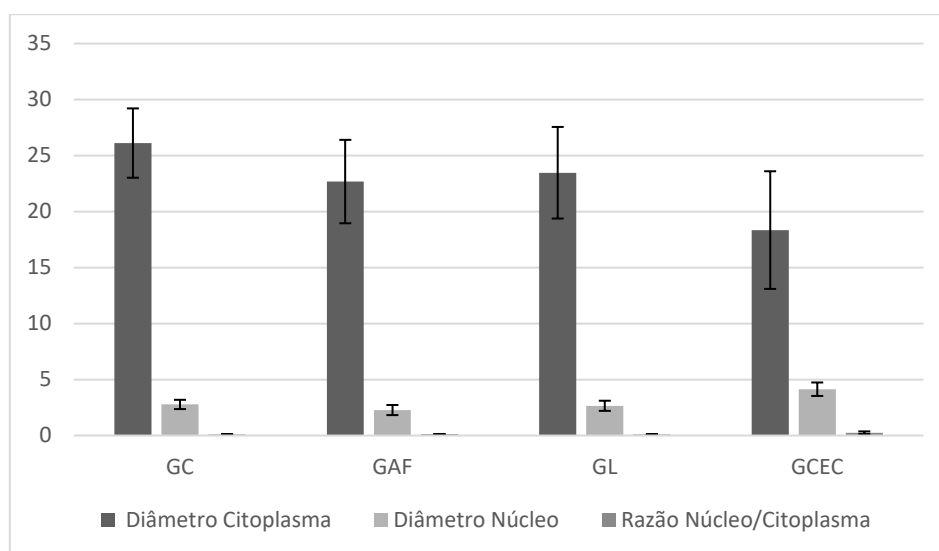
Este estudo compõem um projeto mais ampliado, com outras análises citológicas com o objetivo de contribuir para a elaboração de protocolos de rastreamento do câncer de boca.

Tabela 2. Diâmetro do citoplasma, diâmetro do núcleo e relação núcleo citoplasma por grupo.

	Diâmetro Citoplasma (DP*) (μm)	Diâmetro Núcleo (DP*) (μm)	Razão N/C (DP*) (μm)
GC	26,1 (3,09)	2,8 (0,41)	0,11 (0,02)
GAF	22,7 (3,72)	2,7 (0,45)	0,12 (0,01)
GL	23,4 (4,09)	2,6 (0,45)	0,11 (0,02)
GCEC	18,4 (5,26)	4,1 (0,60)	0,24 (0,12)

*DP= desvio padrão

Gráfico 1. Citomorfometria em Papanicolau de cavidade bucal.



A localização anatômica das lesões de leucoplasia estão descritas na Tabela 3. Nos casos de carcinoma espinocelular de boca dois casos se localizavam na borda de língua e um em assoalho de boca.

Tabela 3. Localização anatômica das lesões de leucoplasia.

Localização das lesões de leucoplasia	
Borda de língua	4
Mucosa jugal	3
Gengiva inserida	3
Lábio inferior	2
Assoalho de boca	2
Palato	2
Dorso de língua	1
Mucosa labial interna	1
Informação não obtida	8
Total	26

4 DISCUSSÃO

O uso da citopatologia bucal tem potencial como método auxiliar de diagnóstico e de monitoramento de pacientes com maior risco de transformação maligna. Tendo em vista que em nosso estudo observamos praticamente a duplicação do diâmetro nuclear no grupo GCEC e da relação núcleo citoplasma. As alterações citomorfométricas podem ser o primeiro indício de mudanças celulares (PATEL et al., 2020), entretanto em nosso estudo estes achados não foram demonstrados. Esta ausência de evidências pode ser em função do tamanho amostral destes grupos.

A análise citomorfométrica é uma técnica de avaliação quantitativa, precisa, objetiva e reproduzível, porém a realização das análises é lenta. Em nosso estudo foi possível realizar a quantificação, tanto do diâmetro celular como do diâmetro nuclear em todas as amostras coletadas.

O tempo dispendido para realizar a obtenção das imagens seguida das análises de cada amostra foi de, em média, 80 minutos o que sugere alguma dificuldade para seu uso em grande escala. A possibilidade de análise automatizada com o uso de sistemas informatizados, pode tornar este processo mais rápido. Estes achados não encontram qualquer possibilidade de comparação na bibliografia consultada.

Com a associação destes parâmetros no acompanhamento de indivíduos expostos pode-se especular que a citomorfometria aumentaria a sensibilidade da citopatologia na detecção precoce de alterações celulares em câncer bucal. Jairajpuri et al, 2019 encontrou resultados que se assemelham aos demonstrados neste estudo, tendência de aumento na média do diâmetro nuclear e na razão (N/C) em casos de atipia e malignidade.

Segundo Nadaf et. al (2014), o processo de amadurecimento normal das células do epitélio da mucosa bucal, geralmente provoca a diminuição do núcleo e da relação núcleo/citoplasma, porém, durante a carcinogênese as células encontram-se em maior atividade com aumento de seu volume nuclear gerando um aumento da relação destes compartimentos celulares. Diante disso,

alterações nos parâmetros morfológicos como o diâmetro citoplasmático, o diâmetro nuclear e a relação núcleo/citoplasma podem indicar alterações celulares precoces. Estes achados, não foram demonstrados em nosso estudo, entretanto, sim observamos o aumento do diâmetro nuclear e da relação (N/C) nas células descamadas no GCEC. A observação desta duplicação de valores pode sugerir a existência de variações progressivas na citomorfometria se o desenho experimental for o de acompanhamentos longitudinais.

Shayla, Shetty e Pai (2016) analisaram esfregaços citopatológicos obtidos de 53 indivíduos sem lesão e de 52 com leucoplasia. Através da análise citomorfométrica, relataram um aumento do diâmetro nuclear, da área nuclear e da razão núcleo/citoplasma nos casos de leucoplasia com atipia celular. Esses achados, demonstram também o potencial da citomorfometria para classificar o risco em pacientes com leucoplasia. Em nossos achados estes resultados não foram identificados, possivelmente por que utilizamos casos de pacientes com leucoplasias com e sem displasia epitelial. Adicionalmente, os nossos resultados podem ter falhado em encontrar estas variações por termos incluídos casos de leucoplasias com camadas espessas de ceratina na superfície da leucoplasias.

Este estudo vai ao encontro dos achados de Lepper (2018), que relatou aumento na razão núcleo/citoplasma em pacientes com carcinoma, com amostra de 25 indivíduos, neste caso, mesmo com o aumento da amostra os resultados foram praticamente os mesmos.

Uma potencial aplicabilidade adicional da citomorfometria, seria a de podermos utilizar coletas de células descamadas da boca, utilizando bochechos. Convém lembrar os estudos de Silva et al. (2017), Kapczinski (1997), Paiva et al. (2004), Bohrer et al. (2005) entre outros, que mostraram existir um padrão de descamação variável entre a borda da língua e o soalho bucal. Este é outro avanço possível de ser obtido em termos de aplicação massiva da citopatologia como modelo de rastreamento/acompanhamento a partir de coleta única.

O estudo de Shayla, Shetty e Pai (2016) demonstrou a possibilidade de obtenção de material para análise citopatológica seja realizada a partir de bochecho, desta forma obtendo-se amostras de melhor qualidade.

A citomorfometria pode ajudar a identificar alterações celulares antes mesmo de serem visíveis clinicamente, porém, neste estudo as diferenças só foram perceptíveis após o desenvolvimento do câncer. A partir do que foi estudado, sugerimos que sejam feitos estudos com amostras maiores de forma multicêntrica. Além disso, a possibilidade de automatização das análises pode ser uma boa alternativa a fim de agilizar o processamento e, a partir disso, poder mensurar o risco de aparecimento de carcinoma espinocelular de boca.

5 CONCLUSÃO

No grupo amostral avaliado observamos um aumento do diâmetro nuclear e da relação núcleo citoplasma no grupo GCEC. Não foi possível encontrar diferenças no diâmetro nuclear nem na relação núcleo/citoplasma entre os grupos GC, GAF e GL. Diante disso, é importante que se busque aperfeiçoar a citomorfometria com técnicas adicionais ou com desenhos experimentais longitudinais que possibilitem o estabelecimento de protocolos para rastreamento de câncer de boca.

REFERÊNCIAS

AWAN, K.H.; MORGAN, P.R.; WARNAKULARURIYA, S. Assessing the accuracy of autofluorescence, chemiluminescence and toluidine blue as diagnostic tools for oral potentially malignant disorders: a clinicopathological evaluation. **Clin. Oral. Investg.**, Berlin, v. 19, n. 9, p. 2267-2272, Mar. 2015.

BOHRER, P. L. et al. Assessment of Micronucleus Frequency in Normal Oral Mucosa of Patients Exposed to Carcinogens. **Acta Cytologica**, Baltimore, v. 49, n. 3, p. 265-272, May/June, 2005.

DEDIVITIS, Rogério A. et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 35-40, jan./fev 2004.

DIONNE, K. R. et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions in the clinic and laboratory. **Int. J. Cancer.**, v. 136, n. 3, p. 503-515, Feb. 2015.

FONTES, K. B. F. C. et al., Concordance between cytopathology and incisional biopsy in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 122-127, Mar./Apr. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> / Acesso em: 08 out. 2020.

JAIRAJPURI, Z. S. et al. Toward early diagnosis of oral cancer: Diagnostic utility of cytomorphological features, a pilot study. **Natl. J. Maxillofac. Surg.**, Lucknow, v. 10, n. 1, p. 20-26, Jan./June 2019.

KAPCZINSKI, M. P., **Estudo das células epiteliais em mucosa bucal clinicamente normal de mulheres através do uso da citologia esfoliativa.** 1997. 93f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

LEPPER, T. W. **Métodos de Rastreamento na Prevenção do Câncer Bucal.** 2018. 65f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MAIA, H. C. DE M. et al. Potentially malignant oral lesions: clinicopathological correlations. **Einstein.**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 35–40, 2016.

MEHROTRA, R.; GUPTA. D. K. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. **Head Neck Oncol.**, London, v. 3, Jan. 2011.

MELO, L.C., et al. Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v. 58, n. 3, p. 351-355, jul./set 2010.

NADAF, A. et al. A phase contrast cytomorphometric study of squames of normal oral mucosa and oral leucoplasia: Original study. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Chennai, v. 18, p. 32-38, 2014.

NEVILLE, B. W. et al. Patologia epitelial. In:_____. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap. 10, p. 331- 421.

PAIVA, R.L. et al. AgNOR Quantification in Cells of Normal Oral Mucosa Exposed to Smoking and Alcohol: A Cytopathologic Study. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St Louis, v. 26, n. 3, p. 175-180, 2004.

PALAKURTHY, P. et al. Cytological changes in normal oral mucosa of individuals with tobacco habits: A cytomorphometric study. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 18, n. 8, p. 722–727, 2017.

PATEL, P. V. et al. Quantitative cytomorphometric analysis of exfoliated normal gingival cells. **J. Cytol.**, Calcutta, v. 28, n. 2, p. 66-72, Apr./Jun. 2011.

PATEL, U. et al. Effect of tobacco in human oral leukoplakia: a cytomorphometric analysis. **Med. Pharm. Rep.**, Cluj-Napoca, v. 93, n. 3, p. 273-279, 2020.

RAMAN, R.K.; KAMBOJ, M.; NARWAL, A. The diagnostic role of methyl green-pyronin y staining in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an exfoliative cytology-based cytomorphometric analysis. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 63, n. 5, p. 401-410, May 2019.

REIS, S. R. A. et al. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. **Braz. Oral. Res.**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 97-102, Mar. 2006.

SILVA, A. D. et al. Epithelial oral mucosal cells: Do they behave differently when exposed to oral carcinogens?. **Cytopathology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 49-57, Sept. 2017.

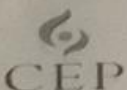
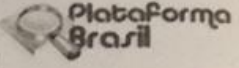
SHAILA, M., SHETTY, P., PAI, P. A new approach to exfoliative cytology: A comparative cytomorphometric study. **Indian Journal of Cancer**. v. 53, n. 1, p. 193-198, Jan./Mar 2016.

SALGUEIRO, A.P., Cytopathological tests for early detection of oral carcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**. v. 29, n. 1, p. 73-79, 2020.

SOARES, C. E.; BASTOS NETO, B. C.; SANTOS, L.P.S. Estudo epidemiológico do câncer bucal no Brasil. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa São Paulo**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 192-198, set/dez 2019.

WONG, T.S.C.; WIESENFELD, D. Oral Cancer. **Aust. Dent. J.**, v. 63, n. 1, p. 91-99, March 2018.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

	UFRGS - PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO	
---	--	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Métodos de Rastreamento na Prevenção do Câncer Bucal
Pesquisador: Pantelis Varvaki Rados
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 71681817.3.0000.5347
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.421.109

Apresentação do Projeto:
Trata-se de projeto de pesquisa a ser desenvolvido no Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estão previstas a participação de estudantes e professores produtivos e vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS. O projeto apresenta relevância clínica e científica considerando a morbi-mortalidade dos casos de câncer bucal no Brasil e poderá contribuir de forma significativa no processo de prevenção desta condição. O estudo utilizará um delineamento do tipo observacional, transversal e analítico e está prevista a participação de pacientes oriundos dos Ambulatórios de atendimento da faculdade de odontologia da UFRGS.

Objetivo da Pesquisa:

- Objetivo Geral
Avaliar a aplicabilidade clínica de testes de rastreio em pacientes de risco para o câncer bucal.
- Objetivos Específicos
Avaliar a efetividade do teste de azul de toluidina na mucosa bucal de indivíduos de risco para o câncer bucal. Avaliar o teste da citopatologia bucal com a coloração de Papanicolau em indivíduos de risco para o câncer bucal.
Avaliar as alterações histológicas e citopatológicas nas eventuais áreas positivas ao teste de azul de toluidina em mucosa bucal de indivíduos de risco para o câncer bucal. Comparar a avaliação clínica com as fotografias da mucosa bucal de pacientes de risco para o câncer de boca. Buscar

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br

Página 01 de 04



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 2.421.109

eventuais correlações entre os testes utilizados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Todas as adequações necessárias a este tópico foram adequadamente executadas em diligências anteriores, estando os mesmos de acordo com a Resolução 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os comentários relacionados ao cálculo do tamanho de amostra foram atendidos em diligência anterior estando o projeto de acordo com a Resolução 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Remover dados de identificação dos participantes como RG no formulário de coleta de dados a fim de proteger a confidencialidade.

Resposta do autor: Não existe o item RG no formulário de coleta de dados anexado, porém removemos como solicitado os dados de identificação do participante, protegendo assim a sua confidencialidade.

(Pendência atendida)

O cronograma constante no projeto é diferente daquele encontrado no formulário da plataforma brasil e está desatualizado. Favor uniformizar e rever as datas de início do projeto para que o mesmo seja executado apenas quando da aprovação pelo CEP.

Resposta do autor: A data de início do projeto e cronograma no formulário da plataforma brasil foi atualizado conforme solicitado. (Pendência atendida)

- Os pesquisadores devem informar como irão lidar com o encaminhamento de outras patologias que porventura possam ser identificadas. Essas informações devem constar no projeto de pesquisa, formulário da plataforma brasil e TCLE.

Resposta do autor: A seguinte sentença foi incorporada ao projeto e TCLE, entretanto não foi incorporada ao formulário da PB: "Se ao realizar o exame clínico for constatado qualquer outra alteração na região orofacial que não estejam relacionadas as citadas para esta pesquisa, o paciente será encaminhado para o setor correspondente para o tratamento adequado dentro da FO- UFRGS conforme disponibilidade da Instituição." (Pendência atendida)

Os autores devem rever o item riscos e benefícios e uniformizar o texto do projeto com o do formulário da PB, pois devido às alterações terem sido realizadas apenas no corpo do projeto, os documentos estão diferentes.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farrroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

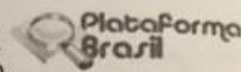
Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 2.421.109

Resposta do autor: Ajustado o item riscos e benefícios, uniformizando o texto do projeto com o do formulário PB. (Pendência atendida)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Informar sobre como será a abordagem caso outras patologias sejam detectadas nos participantes. (Ver considerações sobre os termos de apresentação obrigatória), pois não consta na Plataforma Brasil (favor uniformizar as informações no projeto e na Plataforma). (PENDÊNCIA ATENDIDA)

- Remover dados de identificação dos participantes como RG no formulário de coleta de dados a fim de proteger a confidencialidade. (PENDÊNCIA ATENDIDA).

- O cronograma constante no projeto é diferente daquele encontrado no formulário da plataforma brasil e está desatualizado. Favor uniformizar e rever as datas de início do projeto para que o mesmo seja executado apenas quando da aprovação pelo CEP. (PENDÊNCIA ATENDIDA).

- Os autores devem rever o item riscos de benefícios e uniformizar o texto do projeto com o do formulário da PB, pois devido às alterações terem sido realizadas apenas no corpo do projeto, os documentos estão diferentes (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Projeto em condições de aprovação.

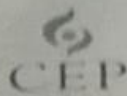
Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

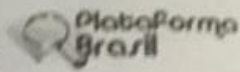
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_955157.pdf	31/10/2017 14:35:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	31/10/2017 14:33:33	TATIANA WANNMACHER LEPPER	Aceito
Outros	QUATRO.pdf	31/10/2017 14:31:55	TATIANA WANNMACHER LEPPER	Aceito

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90 040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 2.421.109

Outros	TRES.pdf	31/10/2017 14:31:30	TATIANA WANNMACHER LEPPER	Aceito
Outros	DOIS.pdf	31/10/2017 14:30:59	TATIANA WANNMACHER LEPPER	Aceito
Outros	CARTA.pdf	31/10/2017 14:30:32	TATIANA WANNMACHER LEPPER	Aceito
Outros	TERMO.pdf	06/09/2017 11:10:48	TATIANA WANNMACHER LEPPER	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEN.pdf	06/09/2017 11:09:57	TATIANA WANNMACHER LEPPER	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	24/07/2017 09:05:34	Pantelis Varvaki Rados	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	24/07/2017 09:05:23	Pantelis Varvaki Rados	Aceito
Outros	PARECER.pdf	24/07/2017 09:03:09	Pantelis Varvaki Rados	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA.pdf	24/07/2017 09:02:02	Pantelis Varvaki Rados	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 07 de Dezembro de 2017

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Caro participante, esta pesquisa, cujo título é: Métodos de Rastreamento na Prevenção do Câncer Bucal será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo avaliar a aplicabilidade clínica de testes de rastreio em pacientes de risco para o câncer bucal. Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, terá sua boca fotografada, células coletadas de sua boca com uma escova e se tiver lesão em boca, esta será corada com corantes em azul. Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes da coleta das células bucais, em que a região poderá ficar sensível, dolorida. As áreas coradas com o azul de toluidina poderão ficar coradas por algumas horas, porém a mesma coloração desaparecerá por completo posteriormente. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados, portanto, sem riscos adicionais. O benefício relacionado à participação neste estudo é o acesso ao monitoramento e diagnóstico de qualquer condição bucal. Além disso, o conhecimento adquirido com este estudo poderá contribuir para melhor entender e prevenir as doenças da boca. Fica assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas.

Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha em participar ou não desta pesquisa. Caso decida participar e depois mude de ideia, basta entrar em contato com o Professor responsável pela pesquisa e solicitar seu desligamento do grupo estudado, continuando assegurada a continuidade de seu tratamento.

Eu, _____ (participante), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, bem como sei dos meus direitos e dos deveres dos pesquisadores. Declaro, ainda, que recebi uma cópia deste Termo. Porto Alegre, _____ de _____ de 201___. Telefone: _____

O pesquisador responsável por este estudo é Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados e a aluna responsável: Tatiana Wannmacher Lepper, telefone para contato: (51)33083629 do professor responsável.

Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentares para Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e a outra da equipe de pesquisadores deste estudo. Esta pesquisa será aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone: 51.33083629 61

ANEXO C – FICHA DE ANAMNESE

Ficha Entrevista – Anamnese

Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais

1.1. Número de identificação _____

1.2. Identidade _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

1.5. Sexo: 1 masc () 2 fem ()

1.6. Qual sua data de nascimento: _____ Qual sua idade _____

1.7. A sua raça ou cor é 1 () branca 2 () negra 3 () parda 4 () amarela 5 () indígena

1.8. Você está: 1 () casado 2 () solteiro 3 () divorciado 4 () viúvo

1.9: Você é alfabetizado 1 () sim 2 () não

1.10. Você estudou até: 1 () nunca estudou 2 () 1-4 série 3 () 5-8 série 4 () 2 grau incompleto 5 () 2 grau completo 6 () superior incompleto 7 () superior completo

2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes 1 () uma vez por semana 2 () 2-5 vezes por semana 3 () uma vez por dia 4 () mais de uma vez por dia 5 () nunca escova

2.2. Você divide a sua escova com outras pessoas 1 () sim 2 () não

2.3. O que você usa para limpar seus dentes 1 () nada 2 () palito 3 () fio dental 4 () outro _____

2.4. Você usa algum produto para bochecho 1 () não 2 () sim. Qual? _____ Há quanto tempo? _____

2.5. Com que frequência 1 () uma vez por semana 2 () 2-5 vezes por semana 3 () uma vez por dia 4 () mais de uma vez por dia 5 () nunca usa

2.6. Quando iniciou o uso? 1 () antes 2 () depois do diagnóstico de câncer ou de lesão cancerizável

2.7. Quando foi a última vez que você foi ao dentista 1 () muitos anos atrás 2 () 1-3 anos atrás 3 () menos de 1 ano atrás 4 () não lembra 5 () nunca visitou

3. Fatores comportamentais

3.1. Você fuma atualmente 1 () sim 2 () não 3.2 Tipo _____

3.2 Quantos cigarros por dia _____

3.3 Há quantos anos _____

3.4 Você fumou anteriormente 1 () sim 2 () não

3.5 Quantos cigarros por dia _____

3.6 Por quantos anos _____

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar _____

3.8 Você toma chimarrão 1 () frequentemente 2 () algumas vezes 3 () raramente 4 () nunca

3.9 Você ingere bebidas alcólicas: 1 () frequentemente 2 () algumas vezes 3 () raramente 4 () nunca

3.10 Qual tipo de bebida 1 () nenhum 2 () cerveja 3 () cachaça 4 () vinho 5 () outros _____

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

4. História Médica Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes () () ()

4.2 Asma, alergia a alimentos, medicamentos () () ()

4.3 Doença cardíaca ou renal () () ()

4.4 Artrite () () ()

4.5 Outro problema de saúde (HIV, hepatite) () () ()

4.6. Você está usando alguma medicação 1 () sim 2 () não

4.7. Qual ? _____

ANEXO D – TÉCNICA DE PAPANICOLAU MODIFICADO

- Álcool absoluto por 15 segundos (quatro vezes)
- Água destilada por 15 segundos
- Hematoxilina de Harris com 0,5g de Ácido Acético Glacial durante 1 minuto
- Descansar em papel absorvente
- Levar em água corrente e remover somente quando esta tiver aspecto límpido
- Carbonato de Lítio** durante 15 segundos
- Álcool por 15 segundos (aplicar quatro vezes)
- Orange G6 durante 1 minuto com Ácido Fosfotúngstico (0,15g/l)
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por duas vezes)
- Policromo*** durante 3 minutos
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por três vezes)
- Descansar em papel absorvente
- Xilol por 5 minutos (2x) seguido por Montagem com Bálsamo do Canadá

*Técnica preconizada por Papanicolaou, 1941 e modificada pelo Serviço de Citologia

do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizada pelo Laboratório de Patologia da

UFRGS. ** O carbonato de lítio é utilizado para realçar o efeito da hematoxilina. Tal

solução é preparada com 5 gramas deste carbonato para 2 litros de água destilada.

** Composição: 200ml de corante EA36 e 600ml de corante EA65 (proporção 3:1).

ANEXO E – FINANCIAMENTO

Este estudo é parte integrante do Projeto de pesquisa "MÉTODOS DE RASTREAMENTO NA PREVENÇÃO DO CANCER BUCAL" que recebeu apoio financeiro do programa PPSUS FAPERGS 20217 através do processo número 17/2551-0001470-7.

A aluna Renata Ferreira Prigol foi bolsista de iniciação científica FAPERGS pelo período de 2 anos.