

Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em profissionais de Anatomia Patológica através do ensaio dos micronúcleos em células bucais

Dissertação de Mestrado

Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Mestrado em
Ciências Biomédicas



Ponta Delgada
2024

UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Rua da Mãe de Deus
9500-321 Ponta Delgada
Açores, Portugal

Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em profissionais de Anatomia Patológica através do ensaio dos micronúcleos em células bucais

Dissertação de Mestrado

Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Orientadores:

Professor Doutor Armindo dos Santos Rodrigues

Professora Doutora Patrícia Ventura Garcia

Professora Doutora Carina Ladeira

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright© Maria de Fátima Simas Ávila Baptista, estudante da Universidade dos Açores. A Universidade dos Açores reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivo.

“Se tenho de sonhar,
porque não sonhar os meus próprios sonhos?”

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Ao Luís Baptista, por me ter acompanhado incondicionalmente e diariamente na concretização deste sonho.

A todos os “amigos especiais”.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Orientadores, Professor Doutor Armindo Rodrigues, Professora Doutora Patrícia Garcia e Professora Doutora Carina Ladeira, por me terem acolhido de um modo único e marcante, pela profunda amizade e empatia, pela extraordinária pedagogia e conhecimento científico que sempre me inculcaram. Cada um com o seu papel, muita paciência e dedicação, que se completou de forma particularmente harmoniosa.

Ao Doutor Ricardo Camarinho, Laboratório de Histologia do Instituto de Vulcanologia e Avaliação de Riscos Geológicos, pelo seu ser “Ponto de Referência”, precioso contributo, grande colaboração e amizade.

Ao Conselho de Administração do HDES, local onde foi autorizado a realização deste Projeto, representado pela acolhedora Presidente Dra. Manuela Menezes e participação do Laboratório de Anatomia Patológica pelo Diretor do Serviço Dr. Vítor Carneiro, muito obrigada a todos pela disponibilidade demonstrada.

Ao Dr. José Melo Cabral, pela preciosa e simpática adesão do seu Laboratório de Anatomia Patológica, LABAP.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica Germano de Sousa na CUF Lagoa, através da cordialidade do Dr. Rui Oliveira, Dr. Manuel Pontes e Dra. Magda Mendes.

Aos prediletos participantes do HDES (de outros serviços) e ao serviço de Esterilização que de uma amabilidade incrível se dispuseram a contribuir.

Aos meus patrocinadores, que tornaram possível este trabalho, manifesto profunda gratidão e também a quem indiretamente deu o seu útil contributo.

- ✚ Empresa Hologic: com um Kit de citologia não ginecológica para 100 amostras (100 frascos de colheita, 100 filtros, 100 lâminas e respetivas escovas).
- ✚ Empresa Enzifarma: com dois frascos de reagente Shiff da Biooptica (500 ml cada), para a coloração de Feulgen
- ✚ Empresa Leica: com a digitalização de todas as 71 lâminas Thin Prep no equipamento de patologia digital Aperio 450.

RESUMO

Nos laboratórios de Anatomia Patológica utilizam-se diversos Compostos Orgânicos Voláteis (COV), como o formaldeído e o xileno, considerados Carcinogénicos, Mutagénicos e Tóxicos para a Reprodução (CMR). Estas substâncias são reconhecidas como genotóxicas e citotóxicas, pelo que a sua manipulação apresenta riscos para a saúde humana. O ensaio do micronúcleo (MN) bucal, é um método não invasivo, útil e simples para detetar estes efeitos em indivíduos expostos. O objetivo desta investigação, foi avaliar o risco de genotoxicidade e citotoxicidade dos COV, nos profissionais de Anatomia Patológica da ilha de S. Miguel através da quantificação de células micronucleadas (MN) enquanto biomarcadores de genotoxicidade e células com outras anomalias (ONA) para a citotoxicidade. A metodologia utilizada consistiu na constituição de dois grupos de exposição: um grupo exposto de 21 profissionais dos três laboratórios existentes, Hospital Divino Espírito Santo (HDES), Laboratório Particular de Anatomia Patológica (LABAP) e Laboratório Germano de Sousa (Hospital CUF Açores), e outro grupo não exposto (referência) constituído por 50 indivíduos recrutados aleatoriamente em outros serviços do HDES, sem qualquer exposição ocupacional a COV. Para realizar todos os procedimentos laboratoriais, após a colheita de células da mucosa bucal, foi escolhida a citologia em monocamada ThinPrep® por se apresentar mais eficaz, utilizou-se a coloração de Feulgen modificada, visualização e quantificação no microscópio óptico e digitalização de imagem. Este biomarcador permitiu avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade com base nos danos provocados no DNA. Concluiu-se que os profissionais de Anatomia Patológica da ilha de S. Miguel apresentaram um risco cerca de quatro vezes maior do que o grupo não exposto aos COV, o que revelou ter um significado preditivo da frequência de células MN e ser um fator de risco acrescido para a saúde. Apesar da legislação existente, são necessárias medidas combinadas de proteção, biomonitorização individual e coletiva, bem como investimento nas instalações para assim poder controlar este ambiente de perigo. Sugere-se mais estudos que abordem um grupo com maior número de profissionais.

Palavras-Chave: Dano DNA; células mucosa bucal; micronúcleos; formaldeído; xileno; exposição ocupacional.

ABSTRACT

In Pathological Anatomy laboratories, several Volatile Organic Compounds (VOC) are used, such as formaldehyde and xylene, classified as Carcinogenic, Mutagenic and Toxic for Reproduction (CMR) chemical reagents. These substances are recognized as genotoxic and cytotoxic, which is why their handling poses risks to human health. The oral micronucleus (MN) assay is a non-invasive, useful and simple method to detect these effects in exposed individuals. The main objective was to evaluate the risk of genotoxicity and cytotoxicity of VOC in Pathological Anatomy professionals on the island of S. Miguel. To achieve the proposed goal, two cytological techniques were compared, in terms of quality, number of cells to be visualized, staining durability, preservation and reproducibility, to choose the most effective one to perform the MN assay in cells of the oral mucosa. The methodology was based on the constitution of an exposed group belonging to 21 professionals from the three existing laboratories, namely HDES, LABAP and Germano Sousa (CUF), and another non-exposed group to serve as a reference composed of 50 individuals randomly recruited from other services of the HDES. All procedures were performed, using ThinPrep® monolayer cytology, modified Feulgen staining, visualization with counting under an optical microscope and digitalization. This biomarker made it possible to evaluate genotoxicity and cytotoxicity based on damage caused to DNA, accounted for through MN, and other nuclear anomalies (ONA), such as karyorrhexis, pyknotic and karyolytic cells. As a result, VOC proved to have a predictive significance for the frequency of MN cells, leading to the conclusion that it is an increased risk factor for the health of these professionals, approximately four times greater than that of the unexposed group. Despite existing legislation, combined protection measures, individual and collective biomonitoring, as well as investment in facilities are necessary to control this dangerous environment. More studies are suggested that cover, in detail, each of the techniques used and a group with a greater number of professionals, combined with the choice of a reference group matched by age, sex and different professional categories.

Keywords: DNA damage; buccal mucosa cells; micronuclei; formaldehyde; xylene; occupational exposure.

Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo geral	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	4
2.1. Caracterização da mucosa bucal	4
2.1.1. Epitélio da mucosa jugal (bochecha)	4
2.1.2. Micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares (ONA)	5
2.1.3. Ensaio dos micronúcleos em células bucais.....	7
2.1.4. Projeto HUMN/HUMxL	9
2.2. Ambiente em Laboratórios de Anatomia Patológica.....	9
2.2.1. Compostos Orgânicos Voláteis (COV)	9
2.2.2. Ensaio dos micronúcleos e a associação da exposição a COV	14
2.3. Métodos citológicos para recolha de amostras.....	16
2.3.1. Citologia convencional	16
2.3.2. Citologia líquida.....	16
2.4. Automatização e digitalização da citologia oral	18
3. METODOLOGIA.....	20
3.1. Caracterização do estudo	20
3.2. Participantes no estudo	20
3.3. Considerações Éticas.....	20
3.4. Procedimentos Técnicos Laboratoriais.....	21
3.4.1. Seleção da técnica citológica.....	21
3.4.2. Colheita das amostras	21
3.4.3. Processamento das amostras citológicas	22
3.4.4. Coloração de Feulgen modificada	24

3.4.5. Montagem das lâminas	25
3.5. Visualização das lâminas	26
3.6. Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Comparação e seleção das técnicas citológicas	28
4.2. Características demográficas e hábitos de vida	30
4.3. Genotoxicidade e citotoxicidade	32
4.3.1. Micronúcleos.....	32
4.3.2. ONA: Picnose, Cariólise e Cariorréxe	32
4.4. Associação entre as variáveis estudadas	35
4.4.1. Correlação entre os MN e a idade	35
4.4.2. Correlação entre os MN e as variáveis Sexo, Álcool, Fumo e Elixir	35
4.5 – Exposição ocupacional aos COV: avaliação de risco	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	42
7. BIBLIOGRAFIA.....	43
8. ANEXOS.....	51

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema demonstrativo das diversas camadas da mucosa da bochecha.....	4
Figura 2. Tipos de células bucais esfoliadas.....	5
Figura 3. Diagrama dos efeitos genotóxicos e citotóxicos.....	8
Figura 4. Modelo esquemático do ensaio dos micronúcleos bucais.....	8
Figura 5. Representação esquemática do metabolismo do xileno.....	12
Figura 6. Exposições registadas para o formaldeído e tolueno.....	13
Figura 7. Material usado na colheita para os esfregaços do epitélio bucal.....	22
Figura 8. Processo de preparação das amostras ThinPrep®	23
Figura 9. Esquema representativo da coloração de Feulgen modificada.....	25
Figura 10. A e B – Citologia Convencional 100x e 400x.....	28
Figura 11. A e B – Citologia ThinPrep® 100x e 400x	28
Figura 12. Células mucosa bucal: técnica ThinPrep® e coloração Feulgen modificada....	29
Figura 13. Células normais mucosa bucal 100x e 400x: ThinPrep® e Feulgen.....	29
Figura 14. Detalhe nuclear e diferenciação celular: ThinPrep® e Feulgen.....	30
Figura 15. Distribuição frequência células com MN grupos não exposto e exposto.....	32
Figura 16. Distribuição frequência células com ONA grupos não exposto e exposto.....	33
Figura 17. Distribuição frequência células picnóticas grupos não exposto e exposto.....	33
Figura 18. Distribuição frequência células cariólise grupos não exposto e exposto.....	34
Figura 19. Distribuição frequência células cariorréxe grupos não exposto e exposto.....	34

Índice de Tabelas

Tabela 1. Características demográficas, estilos de vida e danos no DNA das amostras em estudo (Expostos e Não expostos).....	31
Tabela 2. Correlação de Pearson entre os valores médios de MN e a idade para a amostra total (Expostos e Não Expostos), grupo Exposto e grupo Não exposto. C representa o Coeficiente de correlação e p a significância.....	35
Tabela 3. Correlação de Spearman entre os valores médios de MN e Sexo, Álcool, Fumo de tabaco e uso de Elixir para a amostra total (Expostos e Não Expostos), grupo Exposto e grupo Não exposto. C representa o Coeficiente de correlação e p a significância.....	36
Tabela 4. Ajuste da associação entre as características dos participantes no estudo expostas aos COV e a frequência de células MN. ^a RR, Risco relativo, 95% IC, 95% intervalo de confiança.....	37

Lista de Abreviaturas

AO - Assistentes Operacionais

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

ASC - Sociedade Americana de Citopatologia

ASTDR - Agência para substâncias tóxicas e registo da doença

AT - Assistentes Técnicos

CLP - Classificação Rotulagem e Embalagem de produtos químicos

CMR - cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução

COV - Compostos Orgânicos Voláteis

DGS - Direção Geral de Saúde

DS - *Data Sheet*

FDA - Food and Drug Administration

HUMN - *HUMAN Micronucleus Human*

HUMN/HUMxL - Projeto Internacional Humano e Projeto Internacional Humano xL

HUMN_{xL} - *MN assay in exfoliated cells*

IARC - International Cancer Research Agency

IAC - Academia Internacional de Citologia

MN - Micronúcleos

OMS - Organização Mundial de Saúde

ONA - Outras Anomalias Nucleares

P – Patologistas

PAP - Coloração de Papanicolaou

PNSOC - Programa Nacional de Saúde Ocupacional

PSC - Sociedade Papanicolaou de Citopatologia

RR - Risco relativo

TSDT - Técnicos Superiores Diagnóstico e Terapêutica

UAC - Universidade dos Açores

VLE - Valor limite de exposição

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

Nos Laboratórios de Anatomia Patológica utilizam-se diversos reagentes considerados tóxicos, cancerígenos, mutagénicos e teratogénicos, como o formaldeído e o xileno. Além disso, a mistura com outros reagentes potencia um ambiente químico muito diversificado, com riscos incalculáveis para a saúde humana (ASTDR, 2010; DGS, 2018). No caso do xileno a sua medição através do sangue é muito limitada devido a este possuir um metabolismo muito rápido, assim a deteção mais utilizada é ao nível do ácido metilhipúrico na urina que para ser validado, a medição tem de ser efetuada logo após a exposição (ASTDR, 2007). Para o formaldeído, pelo contrário, existem vários tipos de dosímetros (ASTDR, 2010).

O Decreto-Lei nº 39/2018, de 11 de Junho, estabelece a política da União Europeia, segundo os valores da Organização Mundial de Saúde (OMS) e refere-se especificamente às instalações que utilizam Compostos Orgânicos Voláteis (COV), sugerindo precauções quanto à necessidade de não ultrapassar os valores de exposição permitidos que comprovadamente causam danos humanos irreparáveis. Neste âmbito, alertam para a substituição de alguns dos químicos por outros com propriedades menos agressivas em relação à classificação como Cancerígenas, Mutagénicas ou Tóxicas para a Reprodução (CMR). Existe tomada de consciência da realidade e um incentivo a criar um ambiente de segurança nas instalações e na formação dos profissionais em termos de conhecimento e de biomonitorização individual (DGS, 2018).

Alguns dos substitutos do formaldeído apresentam bons resultados, sendo que não se consegue eleger um fixador alternativo com total convicção, comparativamente ao formaldeído. É necessário que seja sempre executado a validação e viabilidade da aplicação dos substitutos, realizando-se testes experimentais para avaliar a potencial implementação, o que ainda não foi conseguido na rotina dos laboratórios de Anatomia Patológica (Do Vale, 2019).

As células epiteliais da mucosa oral são usadas em ensaio dos micronúcleos (MN) na deteção precoce de eventos genotóxicos, como principais vias de contato através da ingestão e inalação, assim a frequência de MN é um dosímetro muito sensível para

detetar alterações precoces no DNA (Torres *et al.*, 2019). Estudos de biomonitorização em populações humanas, utilizando biomarcadores de genotoxicidade como os MN e de citotoxicidade como outras anomalias nucleares (ONA), nomeadamente a cariorréxe, a cariólise e a picnose, são ferramentas muito úteis para a avaliação de riscos genéticos decorrentes da exposição a produtos químicos, pois permitem avaliar os danos no DNA (Holland *et al.*, 2008; Cobanoglu *et al.*, 2019).

Segundo Ladeira *et al.* (2012), a exposição ocupacional ao formaldeído em trabalhadores de laboratórios de Anatomia Patológica resultou num incremento de ONA, onde os valores de MN foram mais elevados nos indivíduos expostos, com especial ênfase na etapa do exame macroscópico.

Recentemente, Sommer *et al.* (2020), reforçou a importância da utilização dos MN para a avaliação da genotoxicidade em programas de biomonitorização humana, realçando a importância do desenvolvimento e utilização de metodologias como a automatização da técnica. As técnicas da citologia esfoliativa bucal e de citologia líquida têm validação clínica para o diagnóstico e permitem observar a morfologia das células epiteliais e contribuir para o estudo da citomorfometria (Mayocchi *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2024).

Verificou-se que o ensaio dos MN em células bucais humanas, não foi ainda testado em citologia de monocamada no contexto de avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade em simultâneo em trabalhadores de laboratórios de Anatomia Patológica, apesar da exposição a substâncias tóxicas em contexto ocupacional ser elevada. Por outro lado, o apuramento de procedimentos citológicos rápidos e eficazes que permitam avaliar atempadamente os riscos desta exposição, é crucial para a biomonitorização e desenvolvimento de medidas preventivas nesta atividade profissional.

A escolha da questão de investigação, prende-se com a importância, cada vez maior, atribuída à proteção dos profissionais que necessitam de biomonitorização constante: Qual a melhor metodologia citológica para avaliar o risco de genotoxicidade e citotoxicidade que os profissionais de Anatomia Patológica correm devido à exposição ocupacional a COV? Para responder a esta questão, foram formulados os seguintes objetivos, que segundo Fortin (1999), vão enunciar as orientações da investigação.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar o risco de genotoxicidade e citotoxicidade dos COV nos profissionais de Anatomia Patológica da ilha de S. Miguel.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Comparar duas técnicas citológicas, em termos de qualidade, número de células a visualizar, durabilidade da coloração, preservação e reprodutibilidade;
2. Escolher uma técnica citológica eficaz para realizar o ensaio de MN em células da mucosa bucal.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO CONCETUAL

Neste capítulo pretende-se apresentar os conceitos sobre os quais a perspectiva do estudo foi realizada. Este assume um carácter prospetivo, para Fortin (1999), em que as observações são colhidas e começa a investigação com a finalidade interventiva de verificar efeitos para a saúde, avaliando a genotoxicidade e citotoxicidade através da citologia da mucosa oral.

2.1. Caraterização da mucosa bucal

2.1.1. Epitélio da mucosa jugal (bochecha)

A cavidade oral é revestida pela mucosa bucal, esta apresenta características diferentes nas várias regiões da boca consoante a sua localização, mobilização e função de revestimento, mastigatória ou especializada. As bochechas são constituídas pela mucosa jugal, um epitélio estratificado escamoso não queratinizado; a sua renovação ocorre entre 10 a 12 dias, pelo que neste período as células da camada basal atingem a superfície onde permanecem cinco a seis dias, até dar-se a descamação (Arana & Katchburian, 2017).

Como referido por (Junqueira & Carneiro, 2005), a Figura 1 esquematiza as camadas da bochecha desde o músculo em contato com a pele, seguida da submucosa que está em continuidade com a lâmina própria onde se observa papilas dérmicas. À camada inferior/basal correspondente ao estrato germinativo do epitélio, onde se formam as células epiteliais, sobrepõe-se a camada intermediária e a superficial.

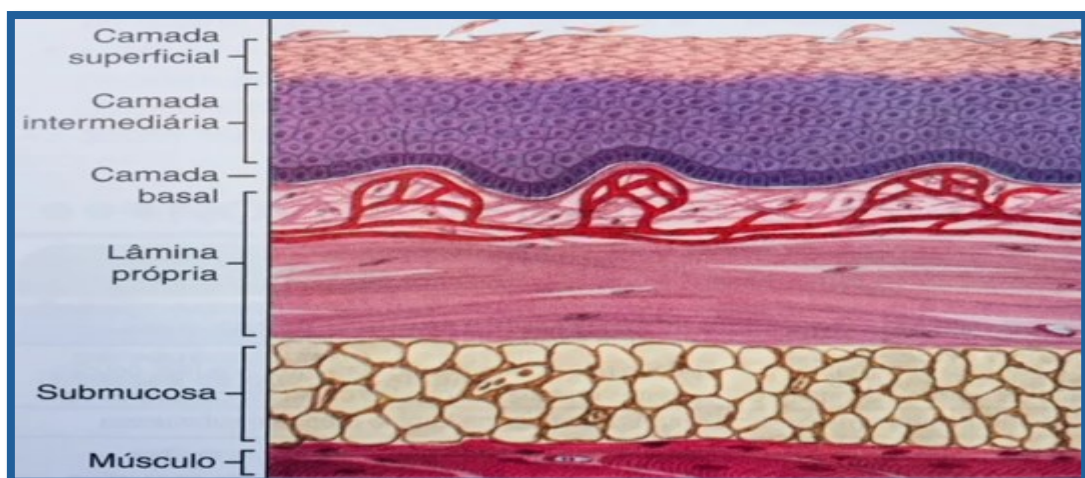


Figura 1. Esquema demonstrativo das diversas camadas da mucosa da bochecha.

Fonte: <https://odontologistas.com.br/histologia-da-mucosa-oral>

É no estrato basal ou germinativo que ocorrem as ONA, pois é aqui que as células se dividem para depois migrarem para a superfície. Aquando da esfoliação da mucosa, são as células da superfície e da camada intermediária que são colhidas.

2.1.2. Micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares (ONA)

Os diferentes tipos de células bucais esfoliadas, como mostra a Figura 2, destaca a sua profundidade, como as células da camada basal ou intermediária (quando a colheita é vigorosa ou por rutura epitelial), e as ONA que permanecem na camada superficial até atingirem a sua maturidade (Bolognesi *et al.*, 2015).

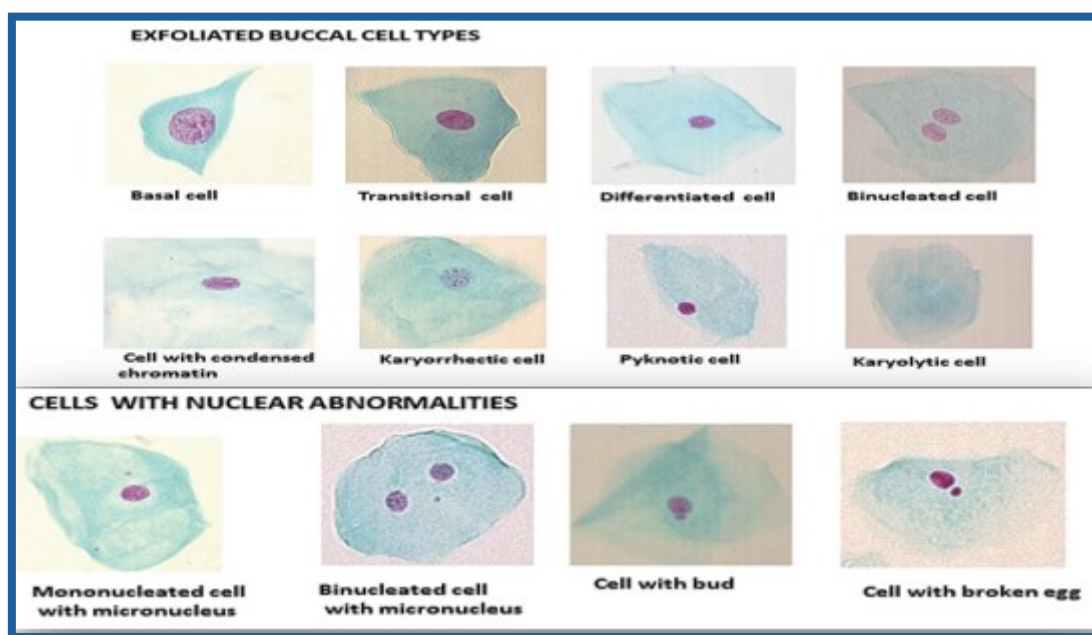


Figura 2. Tipos de células bucais esfoliadas. Fonte: Bolognesi *et al.* (2015).

Segundo Bolognesi *et al.* (2013), as células micronucleadas caracterizam-se por terem no citoplasma um núcleo principal e um ou mais MN. Estes apresentam também forma redonda ou oval, afinidade para a coloração de Feulgen e idêntica textura. Não estão ligados ao núcleo e ficam bem delimitados, os seus tamanhos podem variar entre 1/3 a 1/16 da dimensão do núcleo. Thomas *et al.* (2009), refere que as células com mais do que um MN são pouco frequentes, mas podem ser encontradas com mais facilidade em indivíduos expostos a compostos genotóxicos.

De acordo com Fenech (2007), a formação de MN tem origem em cromossomas ou fragmentos de cromossomas de células em divisão celular que não ficam incorporados no núcleo da célula. No entanto, Terradas *et al.* (2016), indica que estes afetam as funções nucleares básicas como a reparação e replicação do DNA, dando

origem a alterações na cromatina que contribuem para a instabilidade do genoma. Sommer *et al.* (2020), acrescenta que os MN podem ser resultado de processos naturais, como o metabolismo e envelhecimento, ser induzidos por fatores ambientais (incluindo a exposição em ambiente ocupacional) ou associados a diversas doenças.

Para além dos MN existem vários tipos de ONA, como as células com a cromatina condensada, cariorréxe, cariólise, picnose, células binucleadas e com pontes nucleares (Thomas *et al.*, 2009). No entanto, neste estudo apenas serão abordadas a picnose, cariólise e cariorréxe.

As células normais possuem um núcleo oval ou redondo, geralmente apresentam um tamanho maior e menor proporção núcleo/citoplasma, a fonte de DNA encontra-se apenas no núcleo (Thomas *et al.*, 2009).

Células picnóticas, têm o citoplasma do tamanho de uma célula normal, são angulares e de forma achatada, o núcleo é pequeno, denso, encolhido, formado pela condensação da cromatina e com a dimensão de 1/3 a 2/3 do núcleo de uma célula normal, este cora pelo Feulgen de forma uniforme e intensa e são representativas de células em processo de apoptose (Bolognesi *et al.*, 2013).

Nas células cariolíticas o citoplasma é idêntico ao de uma célula normal, são angulares e de forma achatada, o núcleo é esbatido, sendo chamado de “fantasma”, uma vez que desapareceu e ficou a marca, não cora com o Feulgen por não possuir DNA, aparecem nas fases posteriores da necrose e apoptose (Bolognesi *et al.*, 2013).

Quanto às células cariorréxe, têm o citoplasma do tamanho de uma célula normal, angular e plano, o núcleo contém cromatina condensada, densamente agregada e com menor ou maior fragmentação nuclear consoante se encontra na fase inicial ou avançada de degradação, respetivamente, conferindo ao núcleo um aspeto densamente salpicado. São indicativas de desintegração nuclear nas fases posteriores da apoptose (Bolognesi *et al.*, 2013).

Segundo Holland *et al.* (2008), a frequência de MN e de ONA em diferentes tipos de células serve para demonstrar os efeitos citogenéticos de fatores ambientais, exposições ocupacionais, estilos de vida e diversas patologias. Aponta como principal limitação, da utilização destes biomarcadores, a discordância e variabilidade inter e

intralaboratorial. Bolognesi *et al.* (2015), fez uma comparação em três laboratórios, verificou inconsistências na pontuação das lâminas, isto permitiu concluir que havia necessidade de melhorar a identificação das células na abordagem do ensaio do MN bucal, sugere assim que a validação de critérios mais rigorosos na classificação das lâminas, poderia beneficiar com a junção em uma única categoria de todas as células associadas à morte celular.

2.1.3. Ensaio dos micronúcleos em células bucais

Neste estudo, o tipo de teste a ser abordado corresponde ao ensaio dos micronúcleos em células bucais, utilizado para biomonitorização do impacto da exposição a agentes genotóxicos, citotóxicos, estilos de vida como consumo de tabaco e álcool, idade, cancro e doenças neurodegenerativas (Sommer *et al.*, 2020). Este é um procedimento pouco invasivo que permite medir e avaliar os danos no DNA, bem como determinar a proliferação, diferenciação, morte e citostase celular, a partir de células colhidas da mucosa bucal (Holland *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2009).

A frequência de MN no epitélio bucal é um dosímetro biológico altamente sensível e pode ser usado como um biomarcador para detetar danos precoces no DNA, tal como afirma (Torres *et al.*, 2019). Entretanto (Yang *et al.*, 2023), explica que se estes danos forem detetados atempadamente, podem ser reparados com o tempo.

Rodrigues *et al.* (2012), avançaram que os MN nos epitélios orais são reconhecidos como um biomarcador preditivo do risco de cancro numa população de indivíduos saudáveis, cujos resultados contribuíram para explicar as elevadas taxas de incidência de cancro.

Tolbert *et al.* (1992), na Figura 3, mostra esquematicamente algumas vias para produzir corpos extranucleares contendo DNA. Os efeitos da exposição aos agentes genotóxicos e citotóxicos e as alterações no DNA decorrentes desta exposição, demonstram que as células com ONA são tão frequentes como a micronucleação e alertam para o fato de poder existir erros na classificação, atribuindo um maior número aos MN, quando os outros processos celulares podem refletir também eventos relevantes para a carcinogénese. Aponta a citotoxicidade com ligação à promoção do cancro através da estimulação da proliferação celular e a apoptose induzida por

genotoxicidade como um marcador de resposta a eventos de iniciação do cancro. Sublinha a importância de considerar o conjunto de toda a morfologia celular.

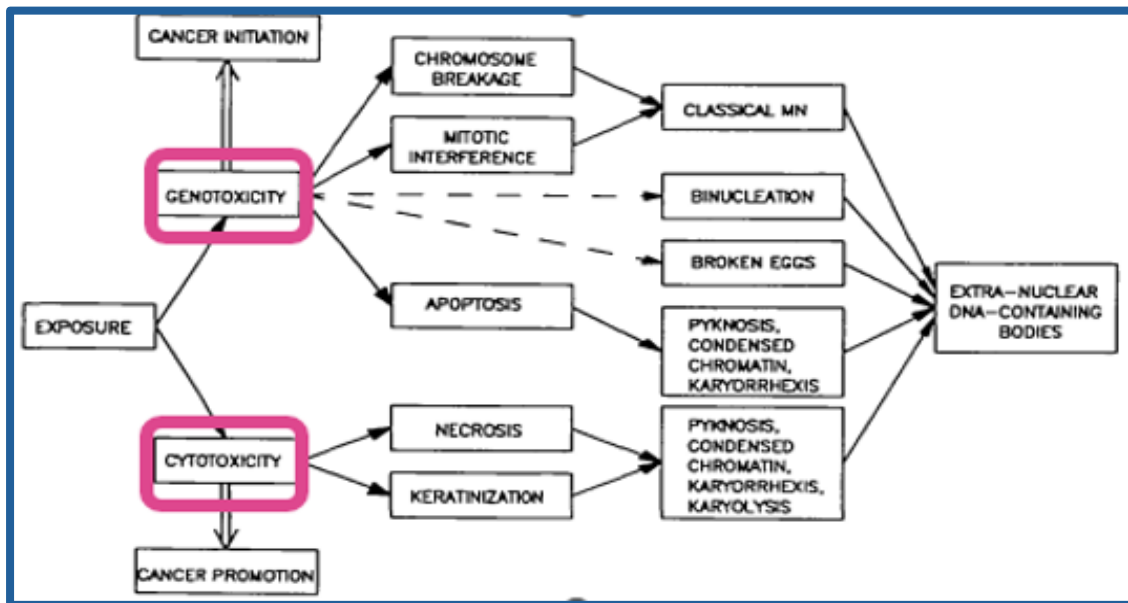


Figura 3. Diagrama dos efeitos genotóxicos e citotóxicos, Fonte: Tolbert et al. (1992).

O modelo de Thomas *et al.* (2009), Figura 4, permite distinguir todos os tipos de células (MN e ONA) e as correspondentes lesões no DNA, como a má segregação cromossómica e morte celular que as originaram. Os biomarcadores medidos neste ensaio são associados a um risco aumentado de envelhecimento, cancro e doenças neurodegenerativas. Assim, estão assinaladas com letras, as células abordadas neste estudo, correspondendo a: A - normal, B - micronucleada (MN), C - cariólise, D - picnose e E - cariorréxe.

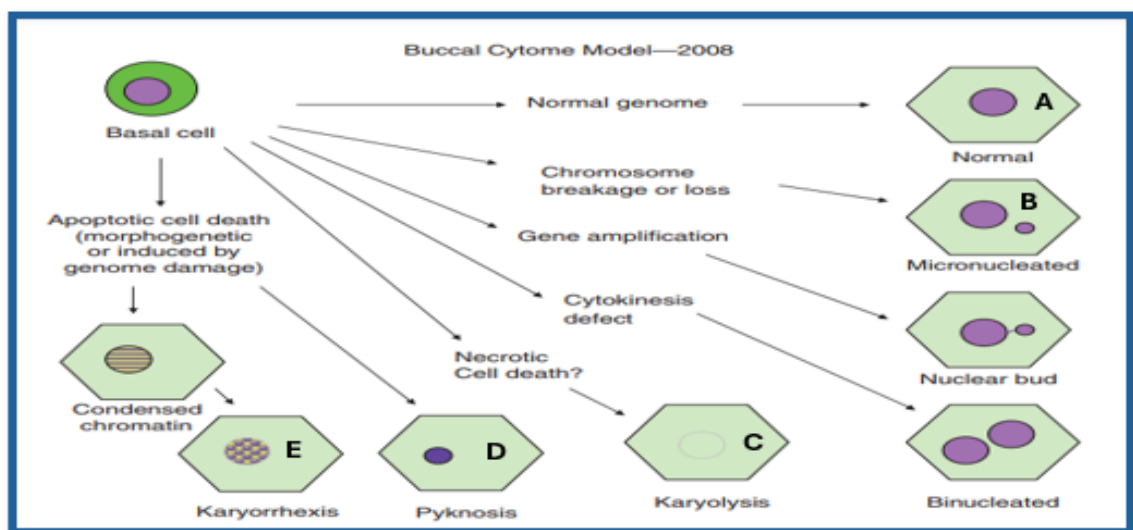


Figura 4. Modelo esquemático do ensaio dos micronúcleos bucais. Fonte: Thomas et al. (2009).

2.1.4. Projeto HUMN/HUMxL

O estudo de Holland *et al.* (2008), fazia prever que os dados de MN pudessem ser incorporados num banco e utilizados para análise de fatores de variabilidade e, posteriormente, estabelecer o valor preditivo da frequência MN em células bucais, para tecidos específicos ou generalizados, com vista a intervir no risco de cancro. Isto tornou-se possível com o desenvolvimento dos projetos internacionais *HUman MicronNucleus* (HUMN) e *Human MN assay in exfoliated cells* (HUMN_{xL}).

Estes projetos definem-se como programas de colaboração internacional, inicialmente estabelecido em 1997, com o objetivo de estudar a frequência de MN nas populações humanas, compartilhar protocolos e medição de critérios dos valores obtidos, primeiro em linfócitos do sangue periférico e mais tarde em células da mucosa bucal (Holland *et al.*, 2008). Apresenta-se como resposta a uma grande variabilidade de contagens individuais que indicavam a necessidade de um exercício de pontuação intra e interlaboratorial, de modo a padronizar a sua aplicação, mecanismos e melhorias da capacidade técnica (Bolognesi *et al.*, 2013).

Assim, o HUMN lançou o HUMN_{xL}, permitindo um consenso na padronização e validação do ensaio de MN, tendo em conta as limitações dos procedimentos existentes e uma consolidação de maior alcance para a biomonitorização de danos no DNA (Thomas *et al.*, 2009; Bonassi *et al.*, 2009). Como resultado foi definido o limite de normalidade (*baseline level*) para a frequência de células micronucleadas: 0,3-1,7 MN/1000 células (Bonassi *et al.*, 2011).

2.2. Ambiente em Laboratórios de Anatomia Patológica

2.2.1. Compostos Orgânicos Voláteis (COV)

A Anatomia Patológica é uma especialidade médica que analisa os órgãos, tecidos e células, tendo como objetivo o diagnóstico, tratamento, prognóstico e prevenção. Engloba fundamentalmente as valências de histopatologia (biópsias, peças cirúrgicas e exames extemporâneos), citopatologia (esfoliativa e aspirativa), técnicas complementares (histoquímica, imunocitoquímica e biologia molecular), (Direção-Geral da Saúde, 2017). Em relação aos grupos profissionais podemos identificar os Patologistas (P), os Técnicos Superiores Diagnóstico e Terapêutica (TSDT), os Assistentes

Técnicos (AT) e os Assistentes operacionais (AO), que estão expostos aos riscos químicos inerentes às suas funções, neste estudo não se justificou fazer distinção, devido ao reduzido número de cada categoria.

O D.L. nº 39 de 2018, garante a melhoria da qualidade do ar, através da imposição de requisitos às instalações que utilizam COV com efeitos para a saúde, em especial o formaldeído e o xileno, por serem utilizados em quantidades muito elevadas. Além destes, muitos outros produtos químicos são manuseados em várias etapas e procedimentos do laboratório, nomeadamente no processamento, descalcificação, inclusão, colorações de rotina, montagem, histoquímica, imunohistoquímica que, segundo a Classificação Rotulagem e Embalagem de produtos químicos (CLP), se distribuem por quase todas as categorias de perigo (Regulamento Europeu nº 2020/878). Os COV, contêm átomos de carbono e são caracterizados por possuírem uma alta pressão de vapor sob condições normais de temperatura e pressão e, por esse motivo, volatilizam facilmente quando em contato com o ar, segundo a Agência Portuguesa do Ambiente (APA).

Desde 2016, o formaldeído é caracterizado como um carcinogénico 1B de acordo com o Regulamento CLP, o qual estabelece as regras de classificação, embalagem e rotulagem de substâncias e misturas perigosas. É classificado, de acordo com a alínea b) do artigo n.º 2 da Diretiva 90/394/CE, relativa à proteção da segurança e da saúde dos trabalhadores contra os riscos profissionais ligados à exposição a agentes químicos no trabalho, como um agente químico perigoso e uma substância carcinogénica e mutagénica.

O formaldeído encontra-se também sujeito à Diretiva 2004/37/CE do Parlamento Europeu, relativa à proteção dos trabalhadores ligados à exposição a agentes cancerígenos ou mutagénicos durante o trabalho, a qual se encontra atualmente sujeita a uma proposta de alteração sugerida pelo Parlamento Europeu, refere o seguinte *“À luz dos novos dados científicos e técnicos e das boas práticas, técnicas e protocolos comprováveis para a medição dos níveis de exposição no local de trabalho, a Diretiva 2004/37/CE, incluindo os valores-limite vinculativos previstos de exposição ocupacional, devem ser revistos periodicamente, pelo menos de cinco em cinco anos e, se necessário, revistos em conformidade”*. Profissionais, no período da

gravidez encontram-se especialmente protegidas por estas medidas, diretiva 2008/1272/CE.

Quanto ao valor-limite de exposição (VLE), para o formaldeído, a legislação refere que este só por si já tem resultados adversos para o trabalhador, uma definição do VLE “*limite da concentração média ponderada presente no local e medido na zona de respiração do trabalhador num determinado período de tempo*” só pode contribuir para a redução dos riscos. Esta deve ser feita de três em três meses no período de atividade e verificar a ligação com outros fatores de risco. O VLE estava previsto ser alterado a 14 de julho de 2024, o valor utilizado até ao presente é de VLE = 0,3 ppm, estabelecido pela Norma Portuguesa (NP) 1796:2014.

Dos vários trabalhos científicos que estudaram os efeitos provocados pelo formaldeído em laboratórios de Anatomia Patológica, destaca-se o de Akbar-Khanzadeh *et al.* (1994), que encontrou na etapa da macroscopia valores de exposição muito elevados com efeitos na saúde dos profissionais, tendo estes autores proposto a ventilação local, exaustão combinada e boas práticas de trabalho, como medidas mitigadoras. Resultado similar, com a macroscopia a apontar o maior valor de exposição, e a verificar que exaustão e ventilação são essenciais nos laboratórios (Ladeira *et al.*, 2012).

Dado não se perspetivar a eliminação do formaldeído, Viegas (2010) alerta para a medição dos seus níveis sobretudo nos ambientes fechados e a caracterização à exposição profissional em laboratórios de Anatomia Patológica. O mesmo foi constatado como uma questão preocupante para a saúde por (Rovira *et al.*, 2016).

Perante a indicação comprovada que o formaldeído possui características neurotóxicas e efeitos tóxicos sistémicos, a sua inalação durante o período pós-natal inicial é prejudicial. Embora a prevenção completa seja impossível, devem ser tomadas precauções para diminuir e prevenir este efeito tóxico (Songur *et al.*, 2010).

Niaz *et al.* (2015), consideram que uma exposição prolongada ao xileno pode causar efeitos perigosos no sistema respiratório, sistema nervoso central, sistema cardiovascular e sistema renal. O xileno entra no organismo e provoca alterações que se encontram ilustradas na Figura 5, como um mecanismo de toxicidade e de interações

com o sistema endócrino que devem ser acompanhadas, uma vez que constituem uma ameaça para a saúde humana.

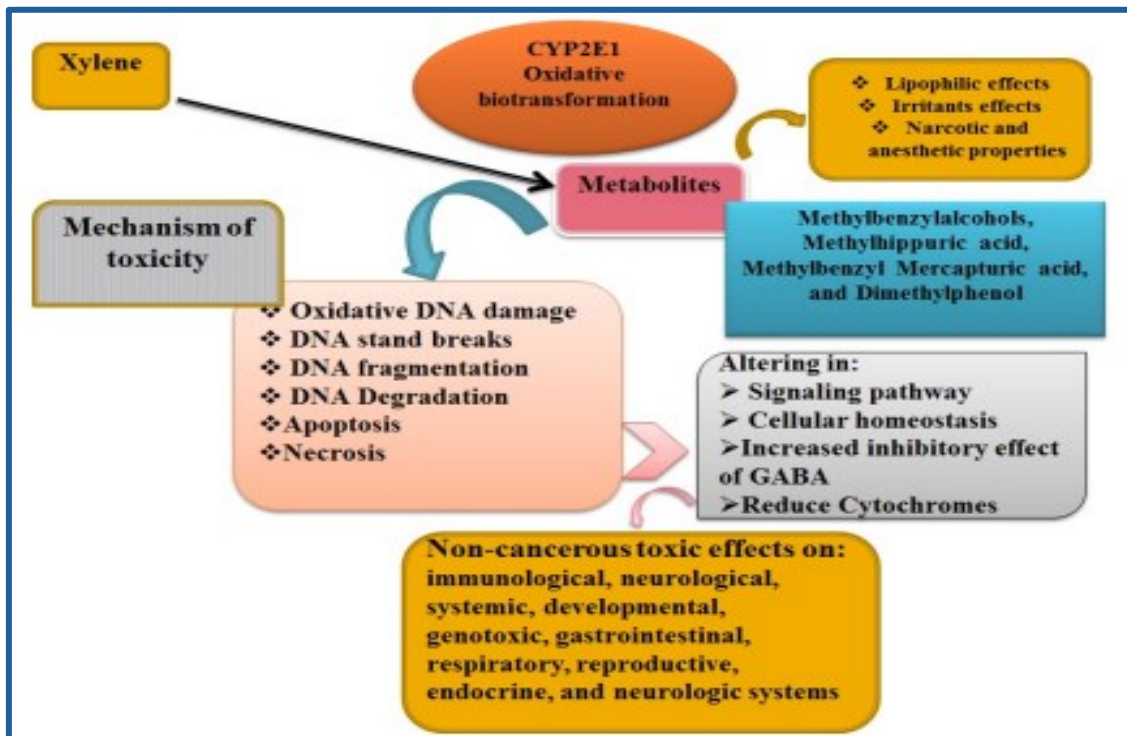


Figura 5. Representação esquemática do metabolismo do xileno, o mecanismo de toxicidade e os efeitos tóxicos para a saúde. Fonte: Niaz *et al.* (2015).

A ASTDR (2007), referindo-se aos mecanismos toxicocinéticos do xileno, por este possuir propriedades lipofílicas, é rapidamente absorvido por todas as vias de exposição e distribuído pelo organismo, se não for metabolizado é também rapidamente eliminado pelo ar expirado. A principal via de metabolismo envolve oxidases de função mista no fígado, resultando principalmente na formação de isômeros do ácido metilhipúrico que são eliminados na urina. Em humanos, a absorção do xileno foi estimada em > 50% através dos pulmões por inalação e < 50% através do aparelho gastro intestinal.

O estudo de Franklin *et al.* (2009), realizou uma avaliação ambiental simultânea do formaldeído e do xileno, e constatou a presença de riscos diversificados no laboratório de Anatomia Patológica associados a acidentes de trabalho e doenças profissionais. No entanto, dependendo da atividade realizada, ocorreram picos de elevada concentração para o formaldeído, o que é considerado risco grave e iminente. Assim, os autores justificam a implementação de medidas preventivas, em investimentos adicionais na adesão de protocolos de biossegurança e na introdução de formação contínua que possibilitem aos laboratórios atingir situações de normalidade.

Outro estudo realizado por Agapito (2023), no qual são comparados os resultados da medição dos COV, formaldeído e xileno durante três anos, revelou que os profissionais estão expostos a valores muito acima do permitido, em particular na sala de citologia, macroscopia, inclusão e colorações, tendo elaborado um Plano de Intervenção, teórico e prático com esclarecimento sobre fatores de risco e as suas consequências.

Belo (2011), contribuiu para a caracterização e quantificação da exposição simultânea a formaldeído e xileno, sugerindo a alteração de alguns procedimentos no local de trabalho e alertando os responsáveis com o objetivo de salvaguardar a saúde destes profissionais. Do mesmo modo, Kato *et al.* (2007), avaliaram os riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de Anatomia Patológica, baseado nas informações dos trabalhadores, concluindo existir uma necessidade de formação, visando a prevenção dos riscos ocupacionais e ambientais provenientes da utilização deste.

A DGS (2018), lançou o Programa Nacional de Saúde Ocupacional (PNSOC) 2013-2017, com o objetivo de vigiar a saúde dos trabalhadores expostos a agentes químicos CMR. A Figura 6, demonstra como um único indivíduo, pode contar com várias exposições, neste caso aos COV, formaldeído e xileno (este último considerado da família do tolueno), em simultâneo.

	CLASSE DE PERIGO DO AGENTE QUÍMICO		
	Carcinogenicidade	Mutagenicidade em células germinativas	Toxicidade reprodutiva
N.º total de exposições^(a) profissionais registadas pelos estabelecimentos	105.063	64.146	38.998
→ Agente químico com mais exposições profissionais	Formaldeído (28,3% das 105.063 exposições profissionais registadas)	Formaldeído (46,3% das 64.146 exposições profissionais registadas)	Tolueno (34,3% das 38.998 exposições profissionais registadas)

Figura 6. Exposições registadas para o formaldeído e tolueno. Adaptado da DGS (2018); o número de exposições profissionais não corresponde ao número de trabalhadores (a).

Cardoso (2023), alerta para a melhoria contínua das medidas de prevenção onde é importante monitorizar com regularidade a presença e o nível de substâncias tóxicas no profissional (monitorização biológica) e no ambiente de trabalho (monitorização

ambiental). Permiteu ainda identificar os químicos CMR, determinar o contexto de exposição e planear ações de acordo com os resultados obtidos.

2.2.2. Ensaio dos micronúcleos e a associação da exposição a COV

O principal objetivo na triagem dos COV, quanto à sua genotoxicidade, é reconhecer um possível perigo para as populações humanas, com resultados fiáveis e um valor preditivo (Stick *et al.*, 1983).

Garcia *et al.* (2012), num estudo de efeitos genotóxicos e citotóxicos em trabalhadores com exposição ocupacional a COV, verificaram existir uma associação entre a exposição ocupacional e a ocorrência de MN nas células epiteliais orais e realçam o aumento do risco quando não são utilizados equipamentos de proteção individual e coletivo. Recomendam revisão e reforço da proteção e biomonitorização de danos no DNA.

Os MN são considerados biomarcadores do potencial genotóxico dos COV e apontados como principal fator de risco para efeitos a longo prazo na saúde (Fenech, 1997; Fenech, 2000). Ainda outros autores, investigaram os efeitos de exposições ambientais e ocupacionais, concluíram existir uma forte ligação entre a expressão de MN e os níveis de exposição, mostraram também que patologias como o cancro e as doenças neurodegenerativas, foram induzidos por muitos compostos químicos, quando feita a comparação entre um grupo exposto e outro não exposto (Holand *et al.*, 2008; Bolognesi *et al.*, 2015; Cobanoglu *et al.*, 2019).

Ladeira *et al.* (2012) confirmam a evidência da associação entre a exposição ao formaldeído, através da biomonitorização dos profissionais de Anatomia Patológica e a presença de alterações nucleares. O tempo de exposição ao formaldeído foi estudado por Sivasankari *et al.* (2018), concluindo que a frequência média de MN é maior no grupo cuja exposição é superior a 15 anos.

A triagem com dosímetros adaptados e o uso combinado de todos os testes permite tirar conclusões da exposição individual nos Laboratórios, consideram estes instrumentos indispensáveis para avaliar com sensibilidade, especificidade e estimar a velocidade da alteração provocada (Wojcik *et al.*, 2014).

O estudo de Linhares *et al.* (2023), acredita que a exposição ocupacional é um fator de risco e reforça a utilidade do ensaio do MN, como uma ferramenta importante, para a vigilância de trabalhadores potencialmente expostos a contaminantes genotóxicos, como é o caso dos COV. Esta abordagem não estabelece apenas a frequência de MN, mas também de outros biomarcadores reveladores de danos no genoma, como a morte e proliferação celular, os quais garantem uma avaliação mais vasta, que para além da genotoxicidade abrange a citotoxicidade (Fenech *et al.*, 2007).

Thomas *et al.* (2009), apresentam um conjunto de variáveis importantes a serem consideradas quando se usa o ensaio do MN, em estudos epidemiológicos, relativos a parâmetros de citotoxicidade e genotoxicidade, como a idade, género, peso, o índice de massa corporal, os hábitos tabágicos e de consumo de álcool, histórico familiar de doenças como o cancro, cardiovasculares e neurodegenerativas, medicação, mutações ou predisposições genéticas, hábitos alimentares, exposição a carcinogénicos ou radiações, assim como o genótipo, por acreditarem que provavelmente tem impacto nas células da mucosa oral.

A genotoxicidade e citotoxicidade do genoma é avaliado através da citologia, para detetar MN e ONA, Basha & Essawy (2018), consideram que as células epiteliais bucais, refletem com precisão as alterações citotóxicas e instabilidade genómica devido à sua alta taxa de renovação que conduz as células à superfície da mucosa. Estas células ficam expostas a fatores genotóxicos e citotóxicos por inalação e/ou ingestão com efeitos secundários inevitáveis para a saúde (Oliveira *et al.*, 2017; Ceppi *et al.*, 2010). Segundo António *et al.* (2017), enquanto as alterações genotóxicas se apresentam sob a forma de MN, as citotóxicas evidenciam-se pelos tipos celulares de picnose, cariólise e cariorréxe.

Ceppi *et al.* (2010), afirma ainda que o ensaio de MN, pode ser aperfeiçoado com o número de células visualizadas, o ajuste do modelo estatístico utilizado e o controle dos fatores de confusão.

Além disso, Tomaz *et al.* (2016), concluíram no seu estudo, de forma isolada, que os hábitos de vida influenciaram os critérios celulares avaliados. Desta forma, sugerem mesmo uma terapêutica baseada no combate a estes fatores.

2.3. Métodos citológicos para recolha de amostras

2.3.1. Citologia convencional

A citologia convencional é o método mais antigo que existe de citologia esfoliativa da mucosa bucal, permitindo o estudo e interpretação das características das células que são descamadas natural ou artificialmente da mucosa. Esta consiste em utilizar a técnica da colheita de células esfoliadas para observação da citomorfologia das células em esfregaço. Técnicas quantitativas, com base na avaliação de parâmetros como variações em tamanho do núcleo e citoplasma e em alterações na relação núcleo/citoplasma, pode aumentar a sensibilidade diagnóstica porque é objetiva, precisa, com baixo custo e pode ser realizada em vários locais da mucosa bucal (Lucena *et al.*, 2011).

O estudo de Babshet *et al.* (2011) confirma que a citologia convencional é eficaz com escova e pode ser realizada facilmente com menor custo. Pode ser usada para triagem de lesões bucais suspeitas e pode ter aplicações onde os recursos são escassos. São características desta citologia a sensibilidade, especificidade e valor preditivo. Este estudo concluiu que a escova dentária é fiável e pode ser utilizada facilmente com menor custo e sem desconforto.

2.3.2. Citologia líquida

Surgiram no mercado vários sistemas de citologia de base líquida. SurePath e ThinPrep®, foram aprovadas nos EUA pela *Food and Drug Administration* (FDA), e são os métodos mais utilizados em todo o mundo. Smith (2011), refere que a introdução da citologia em monocamada melhorou a qualidade das amostras, estas tornaram-se mais adequadas e produtivas, são apropriadas para a leitura automatizada. No sistema ThinPrep®, aglomerados de células e muco são quebrados por agitação mecânica, em seguida a solução conservante líquida é filtrada através de um filtro de membrana e transferida para uma lâmina de vidro onde faz o “*imprint*”. O processador ThinPrep®2000 apenas processa uma amostra de cada vez, no entanto, o equipamento ThinPrep®3000 e ThinPrep®5000 permitem o processamento simultâneo de até 80 e 160 amostras, respetivamente. Este método citológico, ainda surge na literatura quase sempre comparado com a citologia esfoliativa tradicional.

Hayama *et al.* (2005) defendem que tanto a citologia de preparação de base líquida quanto o esfregaço convencional são diagnósticos confiáveis, no entanto o método de citologia líquida mostra uma melhoria na preservação da amostra, adequação da amostra, visualização da morfologia celular e reprodutibilidade.

A observação das células epiteliais da mucosa oral, através da citologia em base líquida é uma ferramenta útil para avaliação citomorfológica, biologia molecular e imunocitoquímica, pois permite com uma única colheita ter material para todas as técnicas e realizar lâminas com amostras adequadas boa preservação e visualização da morfologia celular, é uma potencial ferramenta de rastreamento para a cavidade oral com aplicação prática (Kujan *et al.*, 2006). Os resultados obtidos no estudo de Ramos *et al.* (2014), revelam que é possível analisar a frequência de MN em células do epitélio bucal utilizando a citologia em monocamada e que esta se apresenta como uma excelente forma de obter várias amostras, melhorar e refinar a metodologia citológica.

Alsarraf *et al.* (2018), verificaram a necessidade de estudos clínicos para avaliar a precisão da citologia oral na detecção precoce de doenças. Referem que a citologia oral líquida, oferece vantagens significativas em comparação com a citologia esfoliativa convencional. Porém, Herbert & Johnson (2001), demonstraram resultados de baixa sensibilidade, especificidade e recomendações contra a sua utilização, devido ao elevado custo tanto dos equipamentos como dos consumíveis para a realização da técnica, justificam assim que este método apenas seria compensatório se o seu benefício fosse igual ou superior ao método de citologia convencional.

Neste contexto, Lucena *et al.* (2011), estabelecem quais as principais vantagens e desvantagens das duas técnicas e concluem que são necessários mais estudos com critérios citológicos claros para diagnóstico e correlação cito-histopatológica no que concerne à citologia oral, no entanto admitem que a citologia líquida reduz muitas lacunas existentes na técnica convencional.

Busamia *et al.* (2018), fizeram a comparação das duas técnicas, citologia esfoliativa e em camada fina (citologia líquida) através de citocentrifugação. A análise da amostra revelou que as citologias processadas com a técnica de citologia líquida foram mais vantajosas, devido a distribuição fina e uniforme de material celular, que permitiu uma observação mais precisa e detalhada dos núcleos e das células; além disso,

verificaram que com a técnica em camada fina não existia sobreposição. Este procedimento permitiu ser posteriormente observado através de técnicas sofisticadas de diagnóstico como citometria e análises moleculares, com a utilização de programas de computador onde o resultado da interpretação é mais fiável.

A citologia líquida pode ser utilizada na preparação de amostras para avaliar a frequência de MN em indivíduos que estão ocupacionalmente expostos a agentes potencialmente cancerígenos, tendo em conta a melhoria geral na preservação da amostra e na visualização da morfologia celular (Arul *et al.*, 2017). De acordo com Kim *et al.* (2024), a citologia líquida está validada para a quantificação de biomarcadores, com amostras preservadas, adequadas e reprodutíveis.

2.4. Automatização e digitalização da citologia oral

A pontuação automatizada de MN em células bucais poderia aumentar a viabilidade da pontuação, o que conduziria a um poder de análise mais elevado. Assim, seria mais rapidamente atingido um número mínimo de células basais e normais diferenciadas necessário para determinar a frequência de MN, e um adequado coeficiente de variação para medições repetidas. O projeto HUMN_{XL}, tem como objetivo planejar e abordar estas questões consideradas fundamentais (Holland *et al.*, 2008).

O ensaio de MN é passível de quantificação automatizada por citometria de fluxo, no entanto o sistema, que poderia melhorar a sua aplicação em estudos populacionais, ainda precisa de ser desenvolvido e validado (Thomas *et al.*, 2009). Apenas é possível o reconhecimento de células mononucleadas, binucleadas e polinucleadas, alcançado por algoritmos matemáticos (Rodrigues *et al.*, 2018). De acordo com Seager (2014), o desenvolvimento de um protocolo e classificação padronizada, para utilizar em diferentes laboratórios na avaliação de MN por análise automatizada de imagens, seria vantajoso para determinar taxas de variação inter-laboratorial. Apesar das limitações do rastreio manual ainda existirem, o rápido progresso tecnológico em novos equipamentos, tanto de citologia em camada fina como em sistemas de triagem automatizados, têm conduzido à aprovação de alguns métodos pela FDA (Valente & Schantz, 2001).

Para compreender o problema atual da citologia digital e inteligência artificial em citologia, a Sociedade Americana de Citopatologia (ASC), a Academia Internacional de Citologia (IAC) e a Sociedade Papanicolaou de Citopatologia (PSC), decidiram identificar os problemas que estão na origem de ainda não ter sido atingido um consenso. Concluíram que a maioria dos participantes não digitalizava lâminas de citologia em comparação com a digitalização da histologia, porque é necessário fazer algo mais para validar este procedimento. No entanto, existem planos para evoluir no futuro, onde os principais desafios e áreas de melhoria para a digitalização da lâmina inteira estão na baixa qualidade da imagem em comparação com as imagens de histologia. Apontam ainda o custo para aquisição do programa que tem capacidade para desenvolver esta área. Referem ainda as áreas que têm de ser desenvolvidas na inteligência artificial, nomeadamente a triagem de lâminas de citologia, a quantificação de biomarcadores e o controlo de qualidade (Kim *et al.*, 2024).

As mudanças nas tecnologias da patologia digital podem trazer soluções práticas, aplicações clínicas e novos desafios, de acordo com Yao *et al.* (2022), o uso da citopatologia digital continuará a evoluir nos próximos anos com o aumento e a procura de avaliações rápidas e quantificação de biomarcadores. A questão levantada por Eloy *et al.* (2024) de quantas lâminas faltam até adotar totalmente a citologia digital, é um apelo para realizar as mudanças necessárias e contribuir mundialmente para esta realidade, através de uma investigação prática, que surge de um grupo denominado o Centro de citologia digital, com o objetivo de chegar a um consenso em relação à esta metodologia.

3. METODOLOGIA

A finalidade da metodologia é descrever o desenho do estudo e as experiências realizadas para responder à questão formulada na introdução (Fortin, 1999). Para tal serão abordados pormenorizadamente os procedimentos técnicos efetuados, após a definição do estudo e dos seus participantes, assim com assegurar todas as questões éticas envolvidas.

3.1. Caraterização do estudo

O presente trabalho é um estudo observacional do tipo caso-controlo, uma vez que identifica as relações possíveis entre as variáveis, utiliza métodos de colheita de dados quantitativos e qualitativos, assim como instrumentos de medida estruturados e não estruturados, as análises são descritivas, comparativas e com ligação entre fatores (Fortin, 1999).

3.2. Participantes no estudo

O grupo de estudo, na sua totalidade, é constituído por 71 indivíduos. Sendo o grupo controlo, exposto aos COV, formado por 21 profissionais dos três laboratórios de Anatomia Patológica existentes na ilha de S. Miguel, dos quais 15 pertencentes ao Hospital do Divino Espírito Santo (HDES) de Ponta Delgada, três do Laboratório de Anatomia Patológica Particular (LABAP), Ponta Delgada e os restantes três do Laboratório Germano de Sousa no Hospital da CUF, Lagoa, (87,5% dos profissionais ficaram representados). O grupo de referência é composto por 50 indivíduos recrutados aleatoriamente em outros serviços do HDES.

Os indivíduos foram considerados adequados para participar no estudo após esclarecimento pessoal, resposta ao questionário (Anexo I), elaborado para o efeito sobre as ocupações profissionais, idade, hábitos de vida como o consumo de tabaco, álcool, elixir bucal e assinatura do consentimento informado (Anexo II).

3.3. Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade dos Açores (UAC), Parecer nº 59/2023 de 22 de novembro de 2023, (Anexo III), e aprovação

de mudança de título, solicitada à UAC pelos autores, considerando que este evidência com maior clareza os resultados da investigação (Anexo IV) e pela Comissão de Ética do HDES, Parecer nº S-HDES/2024/29 de 11 de janeiro de 2024 (Anexo V).

Também foi pedida autorização aos Diretores dos três laboratórios de Anatomia Patológica, participantes no estudo: sendo HDES (Anexo V e VI), LABAP (Anexo VII) e Laboratório Germano de Sousa – Hospital CUF Açores (Anexo VIII).

3.4. Procedimentos Técnicos Laboratoriais

A realização da componente prática foi efetuada no Laboratório de Anatomia Patológica do HDES e no Laboratório de Histologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UAC.

3.4.1. Seleção da técnica citológica

No sentido de otimizar todos os procedimentos que se iriam desenvolver no laboratório, começou por se verificar a qualidade da escova que poderia ser mais adequada para a colheita. Foi necessário confirmar se a amostra, através das duas metodologias, se apresentava com o número suficiente de células, adequada e preservada. Para isso, foi realizada nos dois tipos de citologia, a coloração padrão Papanicolaou (PAP) e feitas várias experiências de otimização da coloração de Feulgen, relativamente à duração de cada etapa, à concentrações e temperatura. Posto isto, ambas as metodologias avançaram para a fase das colheitas.

3.4.2. Colheita das amostras

Para cada um dos grupos, exposto e não exposto, foram colhidas amostras do epitélio bucal nas duas bochechas, obtidas com escovas *cytobrush* (Anexo XIII). Cada participante realizou a sua própria colheita. Para o efeito, cada indivíduo recebeu duas escovas (protegidas num invólucro individual preparado pelo serviço de esterilização do HDES), em que com uma delas fez um movimento rotativo numa das bochechas 5x e após rodar a escova, repetir o mesmo procedimento. Posteriormente, foi retirada a segunda escova, e repetido o mesmo procedimento na bochecha oposta e as escovas colocadas no invólucro. Após a colheita das amostras, foi realizado o esfregaço com o material biológico contido em uma das escovas, deslizando a escova do lado esquerdo da lâmina, e repetindo o procedimento com o outro lado da escova e o lado direito da

lâmina. No final, colocou-se imediatamente numa tina de transporte de lâminas contendo etanol a 96% para fixar a amostra e servir como meio de transporte até à etapa da coloração. Repetiu-se o procedimento com a segunda escova, para obtenção de uma segunda lâmina de forma a obter duas lâminas de esfregaços convencionais. De seguida, e imediatamente, as duas escovas foram mergulhadas no frasco da citologia líquida ThinPrep®, que contém uma solução fixadora e estabilizadora composta essencialmente por metanol, PreservCyt™. No final destes procedimentos, as escovas foram descartadas.

O material usado na colheita foi preparado previamente para cada participante, Figura 7, coincidente com a *check list* para as colheitas das células da mucosa bucal (Anexo XIV), o questionário e inquérito devidamente preenchidos e assinados, assim como a sua entrega, em duplicado para o participante (tendo a maioria optado por tirar a foto ao documento e levar consigo via telemóvel).



Figura 7. Material usado na colheita para os esfregaços do epitélio bucal.

As amostras para citologia líquida Thinprep® podem permanecer neste fixador/conservante PreservCyt™ (Anexo XII) o tempo que for necessário (até um mês ou mais), este processo facilita muito o investigador, uma vez que podem ser realizadas várias colheitas em locais distintos e distantes.

3.4.3. Processamento das amostras citológicas

Este passo técnico corresponde ao início do trabalho laboratorial propriamente dito, para obtenção das lâminas que irão ser posteriormente coradas e observadas.

3.4.3.1. Citologia convencional

No caso das lâminas da citologia convencional, estas encontravam-se em etanol a 96% (desde o momento da colheita). As 142 lâminas (duas lâminas por cada indivíduo), foram colocadas em suporte de lâminas e ficaram a aguardar as restantes também em etanol a 96%, preparadas para a realização da coloração de Feulgen.

3.4.3.2 – Citologia líquida Thinprep®

No caso das amostras colhidas para citologia líquida, que ficaram a aguardar na solução PreservCyt™ as mesmas necessitam ser processadas num equipamento concebido para o efeito, o ThinPrep® 2000 da Hologic. Para tal, cada frasco de amostra PreservCyt™ foi colocado no processador (onde foi escolhido o programa 2 para amostras finas e um filtro próprio para citologia não ginecológica) que como mostra a Figura 8, realiza-se através de três passos, primeiro uma ligeira operação de dispersão, procede à separação do sangue, do muco e de detritos não diagnósticos e recolhe no filtro a amostra de células planeado para ser representativo de toda a amostra, conforme as instruções do fabricante, para o processamento de citologia ThinPrep® (Anexo XV).

O processador ThinPrep® controla a taxa de fluxo, através do filtro durante o processo, para evitar que a representação celular seja muito escassa ou densa. Uma fina camada de células é transferida para uma lâmina de vidro num círculo com 20 mm de diâmetro e a lâmina é automaticamente depositada numa solução fixadora (etanol a 96%). Em resumo, o processador efetuou três operações: dispersão, colheita das células para o filtro e a sua transferência para a lâmina. Foram realizadas 71 lâminas (uma lâmina por cada indivíduo).



Figura 8. Processo de preparação das amostras ThinPrep®. Fonte: www.hologic.com

Todos os consumíveis utilizados para a realização deste método citológico foram patrocinados pela empresa Hologic, (Anexo X).

3.4.4. Coloração de Feulgen modificada

A reação nuclear de Feulgen para a coloração específica do DNA em amostras cito-histoquímicas *in situ* foi introduzida por Feulgen e Rossenbeck em 1924, citados por (Chieco & Derenzini 1999). Estes cientistas desenvolveram um tratamento químico, a hidrólise com HCl, para produzir grupos aldeídos livres na estrutura do DNA. Após este procedimento torna-se possível aplicar nas células a coloração de Feulgen (Chieco & Derenzini 1999); Biesterfeld (2011); Mello & Campos Vidal (2017) e Kasten (2003).

Foi dado o termo de “coloração de Feulgen modificada”, porque optou-se por não se utilizar o reagente de metanol concentrado como fixador das lâminas, assim como na coloração propriamente dita, alterar os seus tempos e reagentes, que foram totalmente adaptados e trabalhados pelos autores deste trabalho, Anexo XIX.

O primeiro procedimento foi a preparação e verificação minuciosa de todas as soluções a serem utilizadas nesta coloração citoquímica, tendo por base a seleção realizada inicialmente e também a contribuição de Bancroft (2013). O Ácido Clorídrico (HCL), reagente p.a. 37%, (CAS n.º 7947-01-0, referência: 30721, marca Fluka), Anexo XVI, foi preparado numa solução a 5 M e utilizado no momento, após diluição em água destilada. Seguidamente procedeu-se à elaboração da solução de contraste - Verde luz a 0,25% (CAS n.º 5141-20-8, referência: L5382, marca Sigma), Anexo XVII, em água destilada.

Para garantir a utilização de um reagente de Schiff estável, pronto a usar, foi testado e utilizado o comercialmente disponível pela empresa Enzifarma, cuja referência: 05-M07007, e marca Bio-Optica, foi oferecido para efetuar a coloração deste estudo (Anexo IX e Anexo XVIII).

Na realização da coloração de Feulgen, foram utilizadas as três lâminas de cada participante (duas da citologia convencional e uma da citologia líquida). Estas foram colocadas nos suportes de lâminas e mergulhadas em tinas com HCL a 5M, durante 10 minutos, para promover a hidrólise ácida das cadeias de DNA, deixando apenas os grupos aldeídos que se pretende corar. Passado este tempo, os suportes com as lâminas

foram transferidos para outras tinas com o reagente de Shiff por 45 minutos no escuro. De seguida cada suporte foi colocado em água morna corrente (a uma temperatura de cerca de 38°C), durante cerca de 3 minutos para ativar o reagente de Shiff. Esta etapa da técnica é controlável macroscopicamente, pois a amostra vai adquirindo um tom rosado e o mesmo pode ser confirmado por visualização no microscópio.

Após este passo, as lâminas são passadas por água destilada e colocadas em Verde luz a 0,25% estritamente durante 10 segundos, de forma que os núcleos não sejam corados igualmente pela solução de contraste. De seguida, é feita a diferenciação e desidratação em etanol a 96%, etanol a 100% seguida da clarificação/diafanização em xileno.

A demonstração de todos os passos seguidos da técnica de coloração de Feulgen modificada estão representados na Figura 9 e Anexo XIX.



Figura 9. Esquema representativo da coloração de Feulgen modificada.

Foram coradas 213 lâminas, correspondentes a duas lâminas da citologia convencional e uma lâmina ThinPrep®, por cada participante.

Como resultados esta técnica cora os núcleos de rosa, pois permite a deteção de DNA. A solução Verde luz cora o citoplasma com a intensão de contraste para melhor individualização e visualização das células.

3.4.5. Montagem das lâminas

O procedimento da montagem das lâminas, que significa colocar uma lamela sobre a lâmina com o objetivo de proteger a amostra e poder ser visualizada ao microscópio, foi realizado no equipamento automático CV5030 da Leica (existente no

laboratório de Anatomia Patológica do HDES) e a solução de montagem usada foi *Mouting media Leica*[®] (Anexo XX). Seguidamente, as lâminas foram colocadas em tabuleiros e deixadas secar no escuro.

3.5. Visualização das lâminas

Nesta etapa de visualização, após consenso, foi decidido visualizar apenas as lâminas ThinPrep[®], uma vez que a citologia convencional não conseguiu obter resultados satisfatórios, sendo que a maioria das células desapareceu das lâminas.

Desta forma, apenas as 71 lâminas de citologia em monocamada prosseguiram para a contagem dos diferentes tipos de células: normais, picnose, cariólise, cariorréxe e com MN. Estas foram observadas recorrendo a um microscópio óptico composto da Leica CM, Leica Biosystems, a uma ampliação de 400X.

A avaliação das células micronucleadas e com outras anomalias nucleares foi efetuada de acordo com os critérios de pontuação de Thomas *et al.* (2009). Para cada indivíduo, foram contabilizadas 2000 células, incluindo as células normais, células MN, e células ONA, especificamente, células picnóticas, células cariolíticas e células com cariorréxe. Foram avaliadas as células com núcleo intacto e sem sobreposição entre citoplasmas e núcleos, segundo o critério de avaliação de anormalidades nucleares em células esfoliadas da mucosa bucal (Tolbert *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 2009). Estas foram contabilizadas com a ajuda de um contador manual.

Tolbert *et al.* (1992), fizeram remodelações nos critérios de pontuação dos MN e na inclusão de ONA no sistema de pontuação e demonstraram que os seus critérios são bem-sucedidos em detetar excesso de micronucleação em controlos positivos. Deste modo também constataram evidências de que as ONA são tão comuns como a micronucleação e que, por isso, existe o potencial para extenso erro de classificação.

Paralelamente, as lâminas foram todas digitalizadas no equipamento Aperio GT450 da Leica Biosystems, operação efetuada nas instalações da firma, em jeito de patrocínio a este estudo (Anexo XI).

As lâminas digitalizadas tiveram a finalidade de treinar, para uniformizar e adquirir um consenso mínimo ao conjunto de lâminas observadas, obter imagens e sugerir uma substituição futura da árdua visualização ao microscópio.

3.6. Análise estatística

Primeiramente, efetuou-se a análise descritiva para as variáveis qualitativas e quantitativas em estudo.

De forma a verificar a Normalidade da amostra foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, concluindo-se que a amostra não seguia uma distribuição normal, selecionando-se assim testes não-paramétricos para a realização da inferência estatística.

As variáveis qualitativas [sexo (feminino vs. masculino), hábitos tabágicos (não fuma vs. fuma), consumo de álcool (não consome vs. consome) e uso de elixir bucal (não usa vs. usa)] foram analisadas através do teste do Qui-Quadrado. As variáveis quantitativas referentes à idade, frequência de células micronucleadas e frequência de células com outras anomalias nucleares (ONA: conjunto de células picnóticas, cariolíticas e cariorréticas) foram analisadas através do teste não paramétrico U de Mann-Whitney para amostras independentes.

A associação entre as variáveis, frequência de células com MN e a idade (no total e em cada grupo), foi realizada através da correlação de Spearman. Enquanto a associação da frequência destas células com o sexo, fumo, o consumo de álcool, o consumo de tabaco e uso de elixir nos dois grupos exposto e não exposto em conjunto ou separadamente, foi feita pela correlação de Pearson.

Para analisar a associação entre a exposição a COV no grupo de profissionais de laboratórios de Anatomia Patológica e a frequência de células MN, foram calculados o risco relativo (RR) e os intervalos de confiança a 95% (IC 95%), usando um modelo linear generalizado (Regressão de Poisson), ajustado para a idade, sexo e uso de tabaco, álcool e elixir.

O IBM SPSS Statistics 29.0.0 for Windows foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Neste capítulo, pretende-se apresentar os resultados das técnicas utilizadas e estudo estatístico, à luz da questão de investigação e dos objetivos formulados.

4.1. Comparação e seleção das técnicas citológicas

Para atingir os objetivos específicos deste trabalho que se tratava de comparar as duas técnicas citológicas e selecionar a mais eficaz para realizar o ensaio de micronúcleos em células bucais, apresenta-se na Figura 10, a coloração de Papanicolaou (PAP), que fornece uma imagem geral da qualidade da técnica pela metodologia convencional, sendo que A corresponde a objetiva 100x e B a 400x respetivamente.

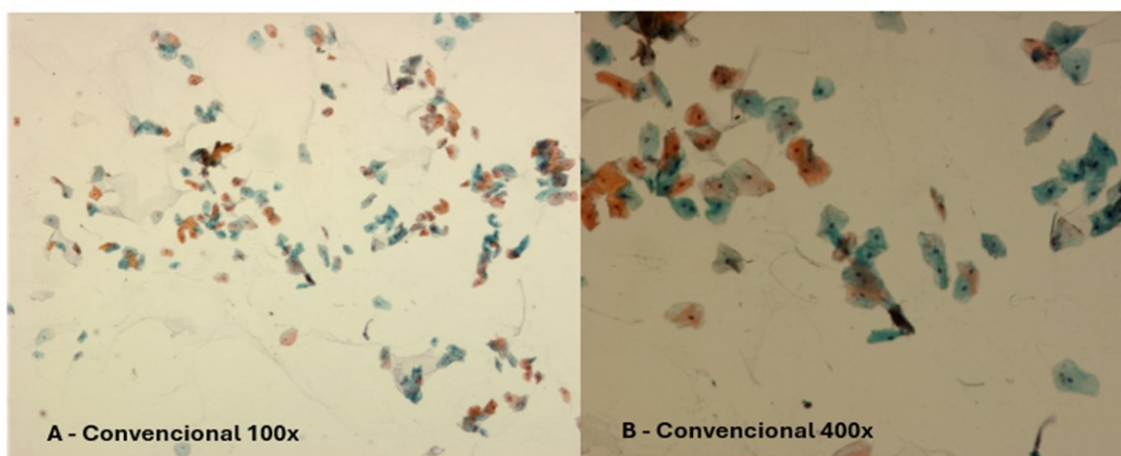


Figura 10. A e B – Citologia Convencional 100x e 400x.

Na Figura 11, podemos observar a coloração PAP, a evidenciar a qualidade da técnica pela metodologia Thinprep®, onde A corresponde a objetiva 100x e B a 400x, respetivamente.

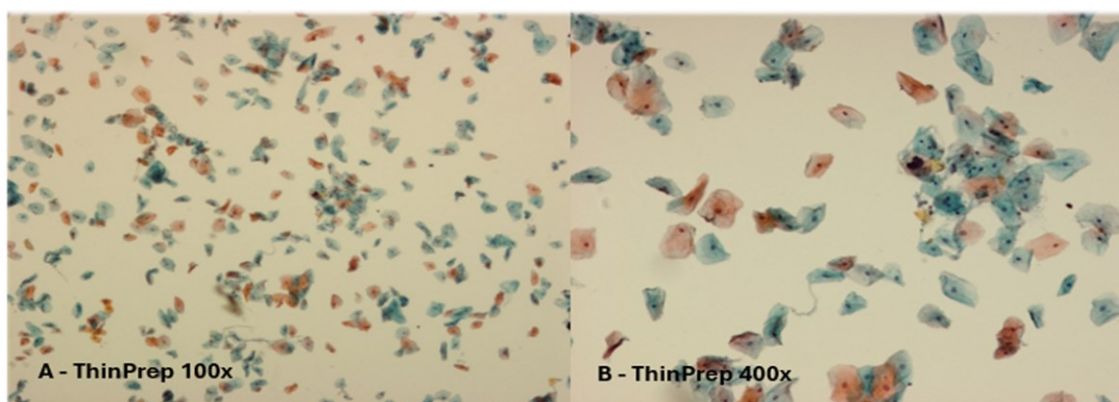


Figura 11. A e B – Citologia ThinPrep® 100x e 400x.

Ao analisarmos detalhadamente as duas técnicas, constatámos que ambas apresentavam uma boa qualidade em termos de número de células a visualizar,

durabilidade da coloração, preservação e reprodutibilidade. Apesar da citologia ThinPrep® ter maior qualidade e outras características que a diferenciam substancialmente, o seu preço é muito superior. Decidiu-se utilizar as duas metodologias, como inicialmente estava previsto.

Quanto ao tempo que as amostras podem ser conservadas, a diferença já não se apresentou satisfatória. Na citologia convencional, se a coloração de Feulgen for realizada uma semana após a colheita esta apresenta bons resultados. No entanto as amostras que aguardaram um mês ou mais até ser realizada a coloração de Feulgen, na citologia convencional, com fixação e conservação em etanol a 96%, não consegue resistir ao tratamento da reação de Feulgen.

Após as escolhas preliminares, para completar os objetivos do estudo propriamente dito, nas lâminas com a técnica de ThinPrep® e a coloração de Feulgen modificado obteve-se os resultados da Figura 12, correspondentes às células A – Normal, B – MN, C – Picnose, D – Cariólise e E – Cariorréxe.

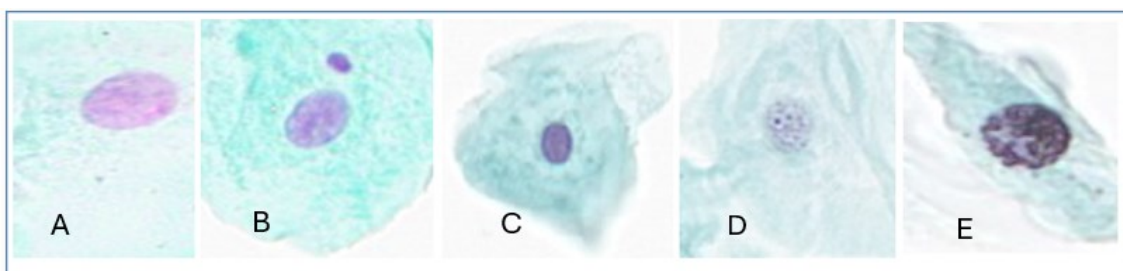


Figura 12. Células da mucosa bucal: técnica ThinPrep® e coloração de Feulgen modificada.

As células normais, avaliadas pela metodologia ThinPrep®, como se observa na Figura 13, apresentam-se sem sobreposição, boa preservação e sem detritos.

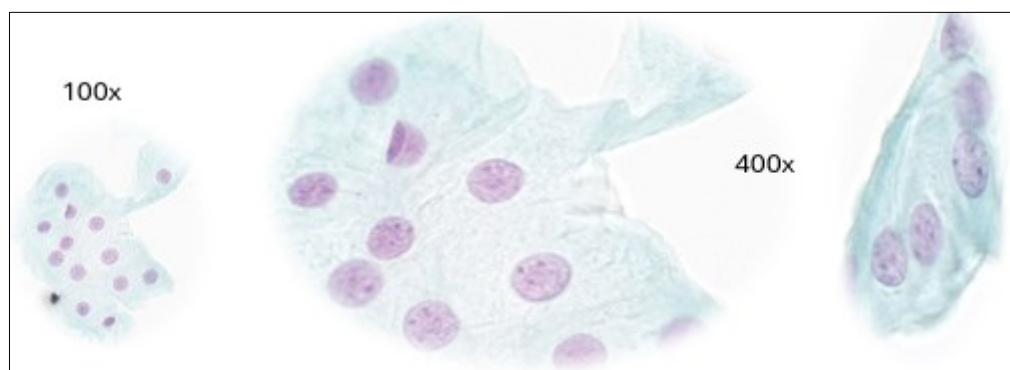


Figura 13. Células normais da mucosa bucal 100x e 400x: técnica Thinprep® e coloração de Feulgen modificada.

Neste contexto, a Figura 14 mostra como a metodologia em monocamada demonstra com clareza o detalhe nuclear em A – Célula com um MN, B – Célula com dois MN, C – Célula com 1 MN e um polimorfonuclear (este não tem DNA e não é idêntico ao núcleo) e D – Célula com ponte nucleoplasmática (a qual não foi contabilizada, neste estudo).

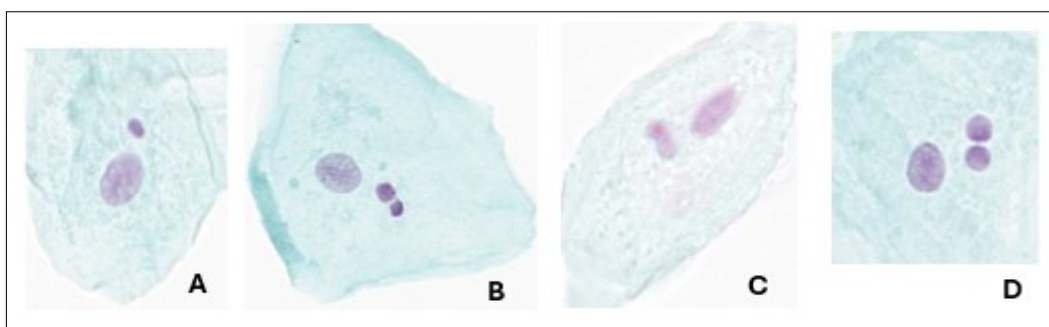


Figura 14. Detalhe nuclear e diferenciação celular: técnica ThinPrep® e coloração de Feulgen modificada.

4.2. Características demográficas e hábitos de vida

A descrição das características gerais dos grupos estudados, exposto (grupo de estudo) e não exposto (grupo de referência), são apresentadas na Tabela 1. A amostragem é constituída por 71 indivíduos, sendo que 21 pertencem ao grupo exposto, dos quais 16 são do sexo feminino e 5 do masculino, e 50 ao grupo de referência, que é composto por 42 indivíduos do sexo feminino e 8 do masculino (Tabela 1); não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos no que se refere à distribuição do sexo (Tabela 1).

Em termos de idade, verificou-se que esta diferiu significativamente entre os dois grupos, sendo a média de idades no grupo não exposto mais elevada ($47,72 \pm 1,53$ anos) comparativamente com o grupo exposto ($39,38 \pm 2,60$ anos) (Tabela 1).

Para as restantes variáveis categóricas (consumo de tabaco, consumo de álcool, uso de elixir bucal), não se obtiveram diferenças significativas entre ambos os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas, estilos de vida e danos no DNA das amostras em estudo (Expostos e Não expostos).

	<i>Grupo exposto (n=21)</i>	<i>Grupo não exposto (n=50)</i>	<i>Valor de p^a</i>
IDADE (anos) <i>(média ± desvio-padrão)</i>	39,38 ± 2,60	47,72 ± 1,53	0,009*
SEXO			
<i>Masculino</i>	5 (23,8%)	8 (16%)	
<i>Feminino</i>	16 (76,2%)	42 (84%)	0,437
CONSUMO DE TABACO			
<i>Sim</i>	5 (23,8%)	10 (20%)	
<i>Não</i>	16 (76,2%)	40 (80%)	0,720
CONSUMO DE ÁLCOOL			
<i>Sim</i>	15 (71,4%)	27 (54%)	
<i>Não</i>	6 (28,6%)	23 (46%)	0,173
USO DE ELIXIR			
<i>Sim</i>	8 (38,1%)	27 (59%)	
<i>Não</i>	13 (61,9%)	23 (46%)	0,221
GENOTOXICIDADE			
<i>MN</i>	3,62 ± 0,86	1,14 ± 0,16	0,002*
CITOTOXICIDADE			
<i>ONA</i>	74,81 ± 8,56	48,96 ± 3,92	0,005*
<i>Picnose</i>	38,90 ± 5,25	28,56 ± 3,79	0,050*
<i>Cariólise</i>	10,76 ± 1,79	9,60 ± 1,91	0,201
<i>Cariorréxe</i>	25,14 ± 3,94	10,80 ± 1,93	<0,001*

Valor de p^a compara os grupos usando o teste Mann-Whitney para variáveis contínuas e o X² para variáveis categóricas. * p<0,05.

4.3. Genotoxicidade e citotoxicidade

4.3.1. Micronúcleos

Os resultados evidenciam diferenças significativas entre o grupo de estudo em relação ao de referência para danos no DNA. A Figura 15 representa a frequência das células com micronúcleos por 2000 células epiteliais bucais, sendo em média de $1,14 \pm 0,16$ células com MN no grupo não exposto e de $3,62 \pm 0,86$ no grupo exposto, identificadoras de efeitos genotóxicos (Tabela 1).

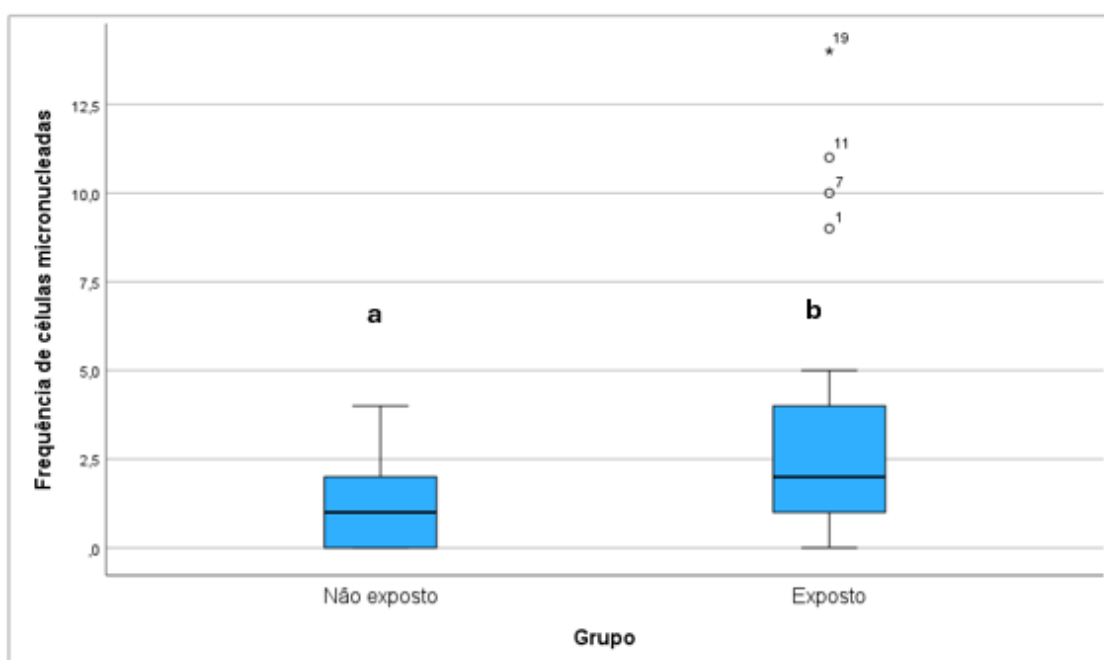


Figura 15. Distribuição da frequência de células micronucleadas nos grupos Não exposto e Exposto. A linha dentro da “caixa bigodes” corresponde à mediana e as linhas verticais aos valores mínimo e máximo; o símbolo (°) representa os valores discrepantes e o (*) os valores extremos discrepantes; letras diferentes representam diferenças significativas entre os dois grupos.

4.3.2. ONA: Picnose, Cariólise e Cariorréxe

Em relação à frequência (média \pm EP) de células com ONA, também se apresenta significativamente maior no grupo exposto do que no grupo não exposto, sendo respectivamente de $(74,81 \pm 8,56)$ e de $(48,96 \pm 3,92)$, por 2000 células epiteliais bucais, Tabela 1 e Figura 16.

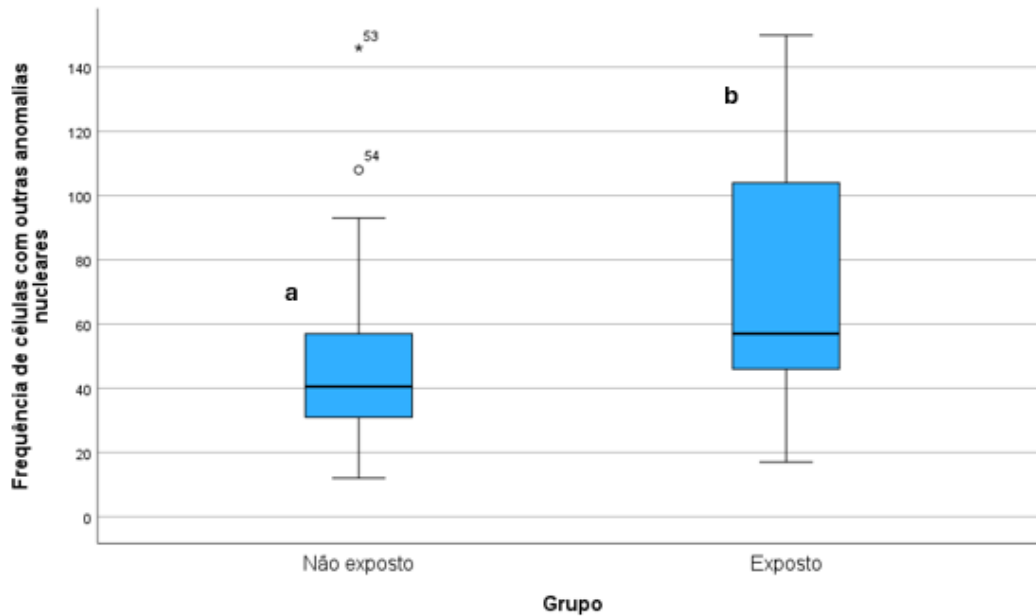


Figura 16. Distribuição da frequência de células com ONA nos grupos Não exposto e Exposto. A linha dentro da “caixa bigodes” corresponde à mediana e as linhas verticais aos valores mínimo e máximo; o símbolo (°) representa os valores discrepantes e o (*) os valores extremos discrepantes; letras diferentes representam diferenças significativas entre os dois grupos.

As ONA estudadas foram a picnose, a cariólise e a cariorréxe. A frequência (média \pm EP) de células com picnose foi ligeiramente maior, no grupo Exposto ($38,90 \pm 5,25$) comparativamente ao grupo não exposto ($28,56 \pm 3,79$), mas não diferiu significativamente entre estes, Tabela 1 e Figura 17.

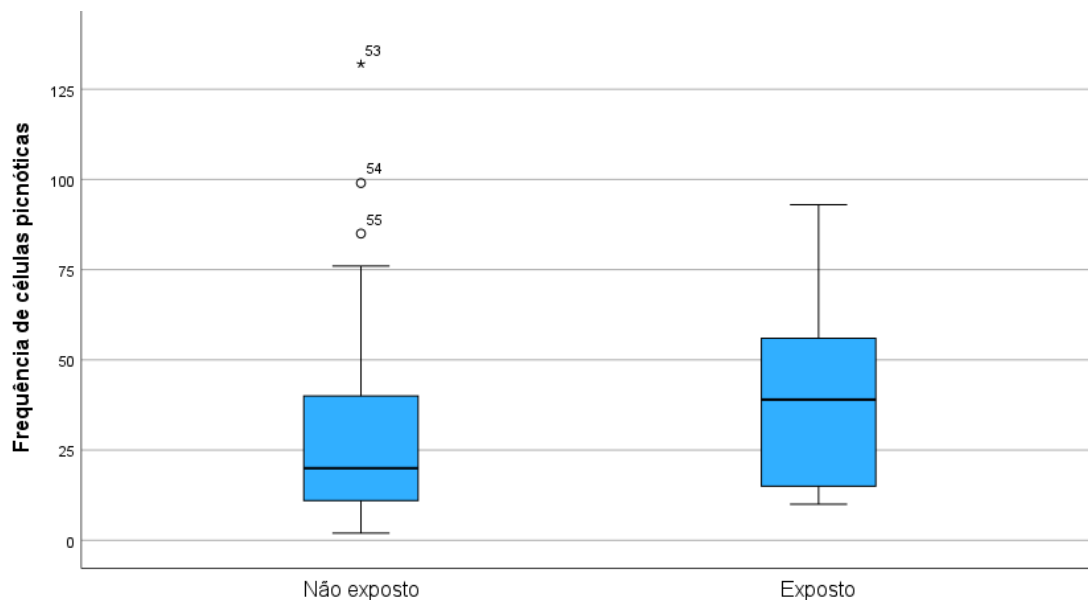


Figura 17. Distribuição da frequência de células Picnóticas nos grupos Não exposto e Exposto. A linha dentro da “caixa bigodes” corresponde à mediana e as linhas verticais aos valores mínimo e máximo; o símbolo (°) representa os valores discrepantes e o (*) os valores extremos discrepantes.

Em relação à cariólise também não se observaram diferenças significativas, sendo a média da frequência destas células de $10,76 \pm 1,79$ no grupo Exposto e de $9,60 \pm 1,91$ para o Não exposto (Tabela 1 e Figura 18).

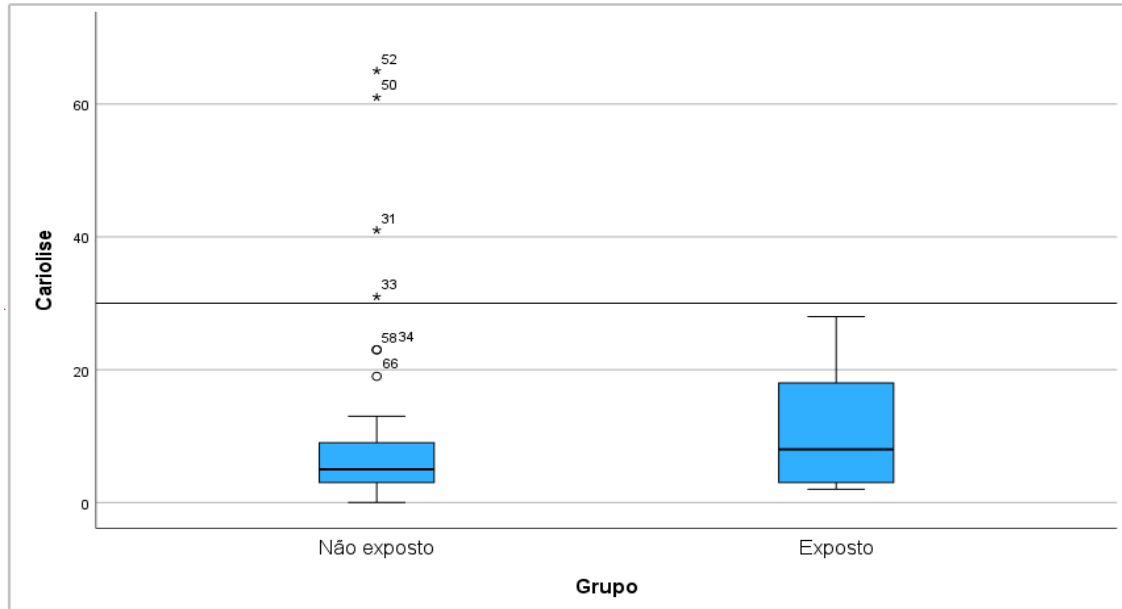


Figura 18. Distribuição da frequência de células com cariólise nos grupos Não exposto e Exposto. A linha dentro da “caixa bigodes” corresponde à mediana e as linhas verticais aos valores mínimo e máximo; o símbolo (°) representa os valores discrepantes e o (*) os valores extremos discrepantes.

Relativamente à cariorréxe, esta foi significativamente diferente em ambos os grupos, sendo a média da frequência no grupo Exposto de $25,14 \pm 3,94$ e no grupo de referência de $10,80 \pm 1,93$, Tabela 1 e Figura 19.

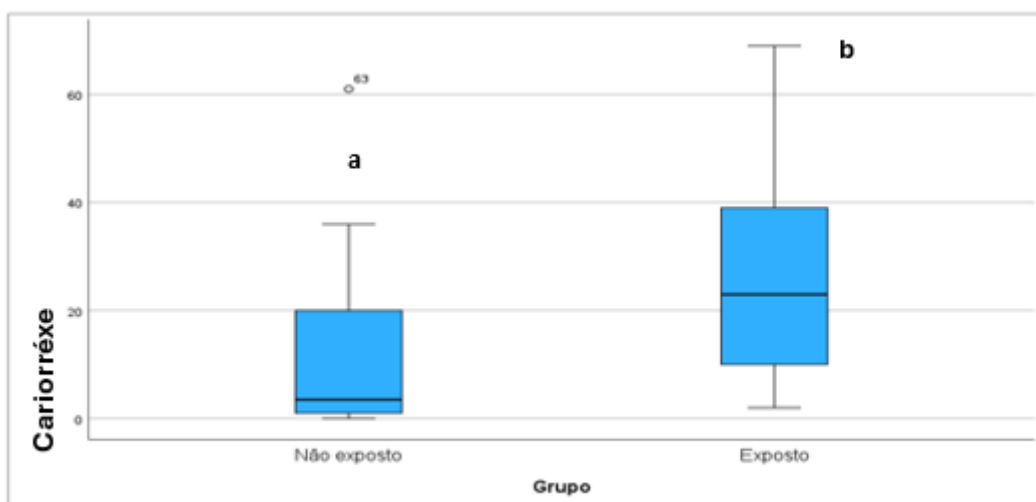


Figura 19. Distribuição da frequência células com cariorréxe nos grupos Não exposto e Exposto. A linha dentro da “caixa bigodes” corresponde à mediana e as linhas verticais aos valores mínimo e máximo; o símbolo (°) representa os valores discrepantes; letras diferentes representam diferenças significativas entre os dois grupos.

Para resumir, ambos os grupos são significativamente diferentes em relação à frequência de células com cariorréxe (sendo a frequência mais elevada no grupo exposto) no entanto, não apresentam diferenças significativas no que concerne à frequência de células cariolíticas e picnóticas.

4.4. Associação entre as variáveis estudadas

4.4.1. Correlação entre os MN e a idade

Utilizou-se a Correlação de Spearman para analisar a associação da frequência de células com MN com a idade da população em estudo, o conjunto do grupo Exposto e Não exposto, obtendo-se um coeficiente $r(71)=0,021$ e $p=0,861$, demonstrando que não é significativa a associação de MN com a idade. No sentido de explorar a possível associação da idade em cada um dos grupos, Exposto e Não exposto, também se verificou que estas não são significativas ($r(21)=0,303$ $p=0,181$, e $r(50)=0,141$ $p=0,328$, respetivamente). Assim, conclui-se que não existe uma correlação entre a frequência de células com MN e a idade dos indivíduos, Tabela 2.

Tabela 2 - Correlação de Spearman entre os valores médios de células com MN e a idade para a amostra total (Expostos e Não Expostos), grupo Exposto e grupo Não exposto. C representa o Coeficiente de correlação e p a significância.

Amostras	N	C	p
Expostos e Não Expostos	71	0,021	0,861
Expostos	21	0,303	0,181
Não expostos	50	0,141	0,328

4.4.2. Correlação entre os MN e as variáveis Sexo, Álcool, Fumo e Elixir

Após a utilização da Correlação de Pearson, não se observou uma associação significativa entre o sexo, incluindo os dois grupos juntos, e a frequência de células com MN ($r(71)=-0,079$ $p=0,514$). Ao testar esta associação dentro de cada grupo, também se verificou a inexistência de uma correlação significativa para o grupo Exposto, $r(21)=-0,067$ $p=0,774$ e para o grupo Não exposto, $r(50)=-0,142$ $p=0,324$, Tabela 3.

Para analisar a correlação da frequência de MN e o álcool, podemos verificar que nos dois grupos - Exposto e Não exposto, quer de forma individual, $r(21)=-0,206$ $p=0,369$ e $r(50)=-0,118$ $p=0,416$, respetivamente, como em conjunto, $r(71)=0,026$ $p=0,830$, que não existe uma associação entre os MN e a ingestão de álcool, Tabela 3.

Similarmente, também não se observaram correlações significativas entre a frequência de MN e consumo de tabaco, quer para os dois grupos individualmente (Exposto e Não exposto, $r(21)=-0,10$ $p=0,967$ e $r(50)=-0,053$ $p=0,717$, respetivamente) como em conjunto ($r(71)=-0,28$ $p=0,818$), Tabela 3.

No que concerne à variável Elixir, o conjunto dos dois grupos revela que para não existe associação entre os MN e a utilização de elixir, que para os dois grupos individualmente ($r(21)=-0,117$ $p=0,614$ e $r(50)=0,174$ $p=0,226$, respetivamente) como em conjunto ($r(71)=-0,041$ $p=0,734$), Tabela 3.

Tabela 3. Correlação de Pearson entre os valores médios de MN e Sexo, Álcool, Fumo de tabaco e uso de Elixir para a amostra total (Expostos e Não Expostos), grupo Exposto e grupo Não exposto. C representa o Coeficiente de correlação e p a significância.

	N	C	p
Sexo			
Exposto e Não Exposto	71	- 0,079	0,514
Exposto	21	- 0,067	0,774
Não exposto	50	- 0,142	0,324
Álcool			
Exposto e Não Exposto	71	0,026	0,830
Exposto	21	0,206	0,369
Não exposto	50	-0,118	0,416
Tabaco			
Exposto e Não Exposto	71	- 0,28	0,818
Exposto	21	- 0,10	0,967
Não exposto	50	- 0,053	0,717
Elixir			
Exposto e Não Exposto	71	0,041	0,734
Exposto	21	- 0,117	0,614
Não exposto	50	0,174	0,226

Em suma, pode-se afirmar que nenhuma das variáveis estudadas está associada à frequência de MN nos dois grupos deste estudo.

4.5 – Exposição ocupacional aos COV: avaliação de risco

A exposição aos COV revelou ser um fator significativo na determinação da frequência de células com MN. Após ajuste do modelo de regressão para o consumo de tabaco, consumo de álcool, uso de elixir, sexo e idade, foi verificado um risco significativo (cerca de 4x superior) para o aumento de células micronucleadas no grupo

de profissionais exposto ocupacionalmente aos COV (RR = 3,77; 95% IC, 2,52-5,65), $p < 0,001$; Tabela 4). A análise dos fatores de confundimento não mostraram efeitos significativos no modelo, exceto para a idade (Tabela 4).

Tabela 4. Ajuste da associação entre as características dos participantes no estudo expostas aos COV e a frequência de células com MN. ^a RR, Risco relativo, 95% IC, 95% intervalo de confiança.

<i>Regressão Poisson (GLZ)</i>	<i>Nº de amostras: 71 Prob > $\chi^2 < 0,05$</i>		
	<i>N (%)</i>	<i>RR (IC 95%)²</i>	<i>p-Value</i>
Idade	71	1,03 (1,01-1,04)	
Sexo			
Masculino	13 (18,3)	0,76 (0,48-1,20)	0,236
Feminino	58 (81,7)	1	
Consumo de tabaco			
Sim	15 (21,1)	1,24 (0,83-1,83)	0,293
Não	56 (78,9)	1	
Consumo de Álcool			
Sim	42 (59,2)	1,30 (0,88-1,93)	0,188
Não	29 (40,8)	1	
Uso de Elixir			
Sim	35 (49,3)	1,02 (0,71-1,47)	0,896
Não	36 (50,7)	1	
Grupo			
Exposto	21 (29,6)	3,77 (2,52-5,65)	<0,001*
Grupo Não exposto	50 (70,4)	1	

Um modelo linear generalizado (Regressão de Poisson), aplicado à variável frequência de células micronucleadas, com a exponencial b_K correspondente ao risco relativo para a variável dependente.

5. DISCUSSÃO

Com a finalidade de interpretar os resultados, serão abordadas e analisadas a seleção da melhor técnica citológica, a associação entre variáveis vs genotoxicidade e citotoxicidade, a frequência de células MN e células ONA, a correlação entre as variáveis e a análise do risco para os profissionais.

Seleção da melhor técnica citológica

A melhor técnica citológica encontrada para avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade foi a citologia em monocamada, neste estudo através da metodologia ThinPrep®, porque para além de ter grande número de células com boa preservação, evidenciou-se adequada para realizar a colheita, a coloração de Feulgen modificada e a digitalização.

Bussamia *et al.* (2018), fizeram um estudo comparativo com os dois tipos de citologia, esfoliativa e em camada fina através da citocentrifugação, em células da mucosa bucal e demonstraram que esta técnica tem vantagens quando comparada com a citologia convencional, já que a distribuição fina e uniforme de material celular permitiu uma observação mais precisa dos núcleos e das células, além disso, não existia sobreposição celular e apresentou-se benéfica em casos de hipossalivação. O inconveniente é em relação ao seu custo ser muito mais dispendioso.

Em contrapartida, a citologia convencional tem uma utilização de baixo custo, sobreposição celular e não é prática para a realização da colheita, não foi adequada para a coloração de Feulgen e também não seria possível a sua digitalização. Muitos foram os estudos realizados com a citologia convencional, como o de Ladeira *et al.* (2012), que utilizou um fixador à base de metanol (Mercofix®) ou outros estudos como o de Linhares *et al.* (2023) que recorreu ao metanol concentrado, para a fixação das lâminas.

Associação entre variáveis vs. genotoxicidade e citotoxicidade

São reconhecidos nos COV efeitos cancerígenos, mutagénicos e com efeitos para a reprodução (DRS, 2018), capazes de provocar alterações no DNA, como formação de MN e ONA, pelo que é exetável que estes efeitos se encontrem mais evidentes no grupo exposto ao ambiente dos laboratórios de Anatomia Patológica comparativamente com o grupo de referência.

Em relação às características demográficas, verificou-se que a idade média do grupo Exposto foi significativamente menor ($39,38 \pm 2,60$) do que a do grupo não exposto ($47,72 \pm 1,53$). Esta diferença pode-se dever ao fato da constituição de ambos os grupos ter sido aleatória e não foi alvo de emparelhamento.

Para as variáveis categóricas, como o sexo consumo de álcool, consumo de tabaco e uso de elixir não se obtiveram diferenças significativas entre ambos os grupos. Esta ausência de diferenças entre os dois grupos é considerada relevante, pois as variáveis podem afetar a frequência de MN nas células bucais e, por isso, devem ser controladas, tal como referem Holland et al., (2008); Bonassi et al., (2011); Ramos *et al.*, (2014).

Curiosamente, Nersesyan (2006), refere que a exposição das células da mucosa oral a agentes genotóxicos, como os contidos no fumo do tabaco, não leva a indução de micronúcleos nestas células.

Frequência de células com micronúcleos

Quanto à frequência de células com MN, verifica-se que no grupo exposto é de $3,62 \pm 0,86$ e no grupo não exposto é $1,14 \pm 0,16$ por 2000 células epiteliais bucais analisadas. Comparando estes resultados com os valores de referência da frequência espontânea de células com MN de Bonassi *et al.* (2011), onde $0,3-1,7$ MN/1000, significando um intervalo de $0,6-3,4$ por 2000 células e desvio padrão de $0,32$ e $1,70$, podemos observar que os nossos dados se enquadram nestes valores, quer sejam do grupo não exposto ou do grupo exposto, embora exista um aumento significativo da frequência de células micronucleadas no grupo exposto. Holland *et al.* (2008), refere que as frequências mais reportadas se situam entre $0,05-11,5$ por 1000 células ou seja $(0,10-23)$, com a maioria dos valores entre $0,5-2,5$ por 1000 células ou seja $1-5$ em 2000 células. Outros estudos apresentam resultados semelhantes como os de Akbar-Khanzadeh (1994), Thian *et al.* (2001), Ladeira *et al.* (2012), Ramos *et al.*, (2014). Apesar disso, valores superiores de MN foram observados no grupo dos indivíduos expostos, denotando a preponderância da exposição. Um exemplo onde a frequência de células micronucleadas foi significativamente maior no grupo exposto ($5,26$ vs. $1,33$ MN/2000 células), é referida por Torres *et al.* (2019).

Por outro lado, Sivasankari (2018), afirma que a frequência de MN é superior no grupo que teve mais de 15 anos de exposição ao formaldeído.

Frequência de células com outras anomalias nucleares

Os resultados revelaram também um aumento significativo na frequência de células com ONA, sendo para o grupo Exposto, de $74,81 \pm 8,56$ e para o grupo Não exposto de $48,96 \pm 3,92$. Os COV podem produzir efeitos sobre o organismo muito tempo depois de ter ocorrido a exposição, como refere a DGS (2018), este fato pode explicar o efeito citotóxico encontrado.

Para analisar estes valores comparou-se a distribuição da frequência entre as células ONA estudadas, nomeadamente a Picnose, Cariólise e Cariorréxe. Em relação à Picnose obtivemos uma frequência de $38,90 \pm 5,25$ para o grupo exposto face a $28,56 \pm 3,79$; no grupo de referência. No que respeita à cariólise este valor foi praticamente o mesmo entre o grupo exposto e não exposto, ou seja, $10,76 \pm 1,79$ e $9,60 \pm 1,91$ respetivamente, não apresentando diferenças significativas entre estes dois grupos. Contudo, a cariorréxe destacou-se nas ONA, com uma frequência de $25,14 \pm 3,94$ no grupo exposto e $10,80 \pm 1,93$ para o grupo não exposto.

As células em cariorréxe aparecem em estadios avançados de necrose e apoptose (Bolognesi *et al.*, 2013; António *et al.*, 2017), geralmente associados a graves danos no DNA.

Correlação entre as variáveis

No que respeita à correlação entre a frequência de células com MN e outras variáveis, constatou-se que não existe uma associação significativa entre os MN e a idade dos participantes. Este facto contraria alguns estudos que apontam a idade como promotora de MN, Holland *et al.*, (2008) e junta-se a outros onde a frequência de MN não aumentou significativamente com a idade, como os estudos de Sarto *et al.*, (1987); Rodrigues *et al.*, (2012); Torres *et al.*, (2019). Citogeneticamente, o envelhecimento está associado a uma série de alterações celulares graves, incluindo o tamanho, morfologia e alterações na expressão e proliferação celular, (Bolognesi *et al.*, 1999; Zietkiewicz *et al.*, 2009), citados por Ladeira (2014). Apesar disso, valores superiores de MN foram observados no grupo exposto, denotando a preponderância da exposição ocupacional.

Ficou demonstrado que a variável sexo (masculino ou feminino), não foi significativa para a presença de MN. Em relação ao consumo de álcool, tabaco ou utilização de elixir bucal, também não estão associadas ao aumento destes. Resultados semelhantes, para estas variáveis de confundimento foram observados recentemente por Linhares *et al.* (2023) e Caponio *et al.* (2024).

Análise do risco para os profissionais

Neste estudo, a exposição aos COV revelou ter um efeito significativo na frequência de células com MN no modelo de regressão utilizado. Após ajuste para o consumo de álcool, tabaco e uso do elixir, foi verificado um aumento do risco de formação de células micronucleadas associadas à exposição aos COV, ou seja, no grupo de trabalhadores expostos (RR = 3,77; 95% IC, 2,52-5,65; $p < 0,001$).

Vários autores, referindo-se aos reagentes utilizados nos laboratórios de Anatomia Patológica, classificam-nos como graves potenciadores de risco para a saúde humana ao longo dos anos, em particular para o xileno (Morley *et al.* 1970, Ogata *et al.* 1971, Niaz *et al.* 2015), para o formaldeído e mostrando que o xileno não é considerado tóxico para os órgãos hematopoiéticos (Uchida *et al.* 1993, Akbar-Khanzadeh (1994), Songur *et al.* 2010, Ladeira *et al.* 2012, Rovira *et al.* 2016) e em estudos com os dois reagentes, como o de Agapito (2023).

A DGS (2018), refere-se aos COV em causa, em termos de carcinogenicidade e mutagenicidade, para o formaldeído, e toxicidade reprodutiva para o xileno, como sendo o maior número de exposições profissionais registado pelos estabelecimentos e particularmente em laboratórios de Anatomia Patológica, o que pode explicar o risco encontrado neste trabalho.

Torres *et al.* (2019), referem que a frequência de células com MN no epitélio bucal é um dosímetro biológico altamente sensível e pode ser utilizado para detetar danos precoces no DNA provocada pela exposição até mesmo a baixas doses.

6. CONCLUSÃO

Este estudo, permitiu responder à questão de investigação, através da escolha de uma técnica citológica eficaz e com qualidade avaliar o risco de genotoxicidade e citotoxicidade dos COV, nos profissionais de Anatomia Patológica existentes na ilha de S. Miguel. Concluiu-se que estes têm cerca de quatro vezes maior risco de carcinogénese do que o grupo de referência.

Verificou-se que a técnica de citologia em monocamada, ThinPrep® da Hologic, correspondia aos parâmetros de qualidade para uma boa observação das alterações nucleares, pelo que se completou todos os procedimentos com esta técnica. É de salientar que face às exigências pretendidas, nomeadamente fazer um elevado número de colheitas e em diversos locais (que poderiam ser em outras ilhas ou fora delas), realizar todos os procedimentos ao mesmo tempo para rentabilizar reagentes e recursos humanos, ser possível repetir lâminas no equipamento ThinPrep® (evitando repetições aos participantes), obter uma contagem das células mais eficiente pelo fato de que cada lâmina tem, entre 5000 a 10000 células e conseguir digitalizar as lâminas em equipamento automático, foram metas eficazes alcançadas com este trabalho. Para além disso não necessita da utilização de metanol concentrado na fixação, uma vez que a solução de colheita Preservcyt™, parte integrante do Kit da citologia ThinPrep®, contém este componente.

Sugere-se que outras investigações possam avançar neste âmbito. Através do ensaio do micronúcleo bucal, é possível orientar e validar indicadores de biomonitorização com qualidade e avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos nos laboratórios de Anatomia Patológica, não apenas do formaldeído e xileno, mas na totalidade dos COV utilizados. Todos os procedimentos podem ser agilizados e ultrapassados com processos de automatização. Seria interessante estudos com um maior número de participantes no grupo exposto, tal não foi possível, pelo fato de implicar colheitas na ilha Terceira, Madeira ou Continente, foram feitas diligências neste sentido, porém apresentou-se como uma limitação temporal.

Espera-se que este estudo possa contribuir essencialmente, para a melhoria da qualidade de vida deste grupo de profissionais e sirva como impulsionador de medidas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Agapito, C. P. G. D. S. (2023). *Assessment of working conditions in a pathological anatomy laboratory*. Master's Thesis in Health Education. School of Health Technology of Coimbra and School of Education (Polytechnic of Coimbra). 5-8.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). Toxicological Profile for Xylenes. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, *Public Health Services*.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2010). Addendum to the toxicological profile for formaldehyde. *Toxicological Profiles*.
- Alsarraf, A. H., Kujan, O., & Farah, C. S. (2018). The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47(2), 104-116.
- Akbar-Khanzadeh, F., Vaquerano, M. U., Akbar-Khanzadeh, M., & Bisesi, M. S. (1994). Formaldehyde exposure, acute pulmonary response, and exposure control options in a gross anatomy laboratory. *American Journal of Industrial Medicine*, 26(1), 61-75.
- Antonio, E. L., Nascimento, A. J. D., Lima, A. A. S. D., Leonart, M. S. S., & Fernandes, Â. (2017). Genotoxicity and cytotoxicity of x-rays in children exposed to panoramic radiography. *Pediatrics Paulist Magazine*, 35, 296-301.
- Arana, V., & Katchburian, E. (2017). *Oral Histology and Embryology: Text, Atlas and clinical correlations*. 4th edition, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Arul, P., Shetty, S., Masilamani, S., Akshatha, C., & Kumar, B. N. N. (2017). Evaluation of Micronucleus in Exfoliated Buccal Epithelial Cells Using Liquid-based Cytology Preparation in Petrol Station Workers. *Indian Journal of Medical and Pediatric Oncology*, 38(03), 273-276.
- Babshet, M., Nandimath, K., Pervatkar, S. K., & Naikmasur, V. G. (2011). Efficacy of oral brush cytology in the evaluation of the oral premalignant and malignant lesions. *Journal of cytology*, 28(4), 165-172.
- Bancroft, John D., and Marilyn Gamble (2013). *Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th edition, Churchill Livingstone Elsevier. Oxford.
- Basha, S., & Essawy, M. (2018). Genotoxic and cytotoxic effects of cone beam computed tomography on exfoliated buccal epithelial cells. *IOSR-Journal of Dental and Medical Sciences*, 17(3), 66-70.
- Belo, C. A. V. F. (2011). *Assessment of professional exposure to formaldehyde and xylene in the Pathological Anatomy service of the Hospitals of the University of Coimbra. Occupational Health*. Master Thesis Occupational health. Coimbra University College of Medicine, Coimbra. 25-42 pp.

- Biesterfeld, S., Beckers, S., Cadenas, M. D. C. V., & Schramm, M. (2011). Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry. *Anticancer research*, *31*(1), 53-58.
- Bolognesi, C., Lando, C., Forni, A., Landini, E., Scarpato, R., Migliore, L. & Bonassi, S. (1999). Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and Ageing*. *28* (4). 393–397.
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyanyan, A., Thomas, P., & Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay—An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *753*(2), 100-113.
- Bolognesi, C., Roggieri, P., Ropolo, M., Thomas, P., Hor, M., Fenech, M., ... & Knasmueller, S. (2015). Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra-and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*, *30*(4), 545-555.
- Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Burgaz, S., ... & HUMNXL Project Consortium. (2009). State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis*, *24*(4), 295-302.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., ... & Fenech, M. (2011). The HUman MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *728*(3), 88-97.
- Busamia, B., Gobbi, C., Albiero, E., & Yorio, M. (2018). Assessment of cytology techniques in oral mucosa of Sjögrens syndrome patients. *Mexican dental magazine*, *22*(1), 30-34.
- Caponio, V. C. A., e Silva, F. F. V., Popolo, F., Giugliano, S., Spizzirri, F., Lorenzo-Pouso, A. I., ... & López-Pintor, R. M. (2024). 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. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 108508.
- Cardoso, A. C. O. (2023). *Occupational Exhibition to Cancer Agents, Mutagens and/or Toxics for Hospital Context Reproduction*. Master's Thesis in Integrated Management of Quality, Environment and Security – Polytechnic Technology and Management High School. Porto. 16-67.
- Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., & Bonassi, S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *705*(1), 11-19.
- Chieco, P., & Derenzini, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and cell biology*, *111*(5), 345-358.
- Cobanoglu, H., Coskun, M., Coskun, M., & Çayir, A. (2019). Results of buccal micronucleus cytome assay in pesticide-exposed and non-exposed group. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*, 19676-19683.

- Do Vale, J. M. B. (2019). *Toxicidade da exposição profissional a formaldeído e a xilol nos laboratórios de anatomia patológica e patologia forense: utilização de reagentes alternativos*. Tese de Mestrado em Medicina Legal. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, Porto. 16-42
- Do Vale, L. D. O., da Silva, V. H. P., de Almeida, F. R., Ribeiro, D. A., & da Silva, D. M. (2017). Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in buccal mucosa cells of welders in the cities of Cubatão and Santos, State of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Occupational Medicine*, 15(4), 303.
- Eloy, C., Bychkov, A., Fraggetta, F., Temprana-Salvador, J., Pantanowitz, L., & Vielh, P. (2024). How many more slides to go until we fully adopt digital cytology? *Cytopathology*.
- Federico, C., Vitale, V., La Porta, N., & Saccone, S. (2019). Buccal micronucleus assay in human populations from Sicily (Italy) exposed to pollutants from the petrochemical industry. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 7048-7054.
- Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1-2), 11-18.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084-1104.
- Fortin, M. F. (1999). *O Processo de investigação: Da concepção à realização*. Edições Técnicas e Científica, Lda. Lusociência. Loures.
- Franklin, S. D. L., Bettini, D. R., Mattos, U. A. D. O., & Fortes, J. D. N. (2009). Assessment of environmental conditions in the pathologic anatomy laboratory of a university hospital in Rio de Janeiro township. *Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine*, 45, 463-470.
- Garcia, P. V., Linhares, D., Amaral, A. F. S., & Rodrigues, A. S. (2012). Exposure of thermoelectric power-plant workers to volatile organic compounds from fuel oil: Genotoxic and cytotoxic effects in buccal epithelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(2), 197-201.
- Hayama, F. H., Motta, A. C., Silva, A. D. P. G., & Migliari, D. A. (2005). Liquid-based preparations vs. conventional cytology: Sample adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Surgery (Ed. print)*, 10(2), 115-122.
- Herbert, A., & Johnson, J. (2001). Personal view. Is it reality or an illusion that liquid-based cytology is better than conventional cervical smears? *Cytopathology*, 12(6), 383-389.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for

- biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1-2), 93-108.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2005). *Basic Histology text and atlas*. Illustrated edition, Mc Graw-Hill. New York.
- Kasten, F. H. (2003). Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA. *Biotechnic & histochemistry*, 78(1), 45-49.
- Kato, M., Garcia, E. G., & Wünsch Filho, V. (2007). Exposure to chemical agents and Worker Health. *Brazilian Journal of Occupational Health*, 32, 06-10.
- Kim, D., Thrall, M. J., Michelow, P., Schmitt, F. C., Vielh, P. R., Siddiqui, M. T., ... & Li, Z. (2024). The current state of digital cytology and artificial intelligence (AI): global survey results from the American Society of Cytopathology Digital Cytology Task Force. *Journal of the American Society of Cytopathology*.
- Kujan, O., Desai, M., Sargent, A., Bailey, A., Turner, A., & Sloan, P. (2006). Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncology*, 42(8), 810-818.
- Ladeira, C., Viegas, S., Carolino, E., Gomes, M., Prista, J., Gomes, M. C., & Brito, M. (2012). Occupational exposure to formaldehyde: assessment of exposure and genotoxic effects. *Health & Technology*, (07), 18-27.
- Ladeira, C. A. F. (2014). *Human Biomonitoring: Biomarkers, Individual Susceptibility, and Nutrigenetics*. Doctoral dissertation, University of Lisbon (Portugal). 183
- Linhares, D., Rocha, J., Rodrigues, A., Camarinho R., & Garcia, P. (2023). Evaluation of Respiratory, Genotoxic and Cytotoxic Effects from Occupational Exposure to Typographic Activities. *Atmosphere*, 14(3), 562.
- Lucena, E. E. D. S., Miranda, A. M., Araújo, F. A. D. C., Galvan, C. A. B., & Medeiros, A. M. C. D. (2011). Harvest method and the quality of oral mucosa smear. *Journal of Surgery and Traumatology Buco-maxillo-facial*, 11(2), 55-62.
- Mayocchi, K. A., Arcuri, M. O., Gimenez, J. I., Arcuri, A., Mayocchi, R. M., Blasetti, N., ... & De Vita, L. N. (2022). Diagnostic value of exfoliative cytology for buccal cancer. *Journal of the Faculty of Dentistry*.
- Mello, M. L. S., & de Campos Vidal, B. (2017). The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta histochemical*, 119(6), 603-609.
- Morley, R., Eccleston, D. W., Douglas, C. P., Greville, W. E. J., Scott, D. J., & Anderson, J. (1970). Xylene poisoning: a report on one fatal case and two cases of recovery after prolonged unconsciousness. *British Medical Journal*, 3(5720), 442-443.
- Nersesyan, A., Kundi, M., Atefie, K., Schulte-Hermann, R., & Knasmüller, S. (2006). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(10), 1835-1840.

- Niaz, K., Bahadar, H., Maqbool, F., & Abdollahi, M. (2015). A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLI journal*, 14, 1167.
- Ogata, M., Takatsuka, Y., & Tomokuni, K. (1971). Excretion of hippuric acid and m-or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m-or p-xylene in an exposure chamber and in workshops, with specific reference to repeated exposures. *Occupational and Environmental Medicine*, 28(4), 382-385.
- Oliveira, F. M. D., Carmona, M., & Ladeira, C. (2017). Genotoxicity assessment data for exfoliated buccal cells exposed to mobile phone radiation. *Data in Brief*, 15, 344-347.
- Ramos, M. A., Cury, F. D. P., Scapulatempo Neto, C., Marques, M., & Silveira, H. C. S. (2014). Micronucleus evaluation of exfoliated buccal epithelial cells using liquid-based cytology preparation. *Cytological Acta*, 58(6), 582-588.
- Rodrigues, A. S., & Garcia, P. V. (2012). Evidence of DNA damage in humans inhabiting a volcanically active environment: a useful tool for biomonitoring. *Environment International*, 49, 51-56.
- Rodrigues, M. A., Beaton-Green, L. A., Wilkins, R. C., & Fenech, M. F. (2018). The potential for complete automated scoring of the cytokinesis block micronucleus cytome assay using imaging flow cytometry. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 53-64.
- Rovira, J., Roig, N., Nadal, M., Schuhmacher, M., & Domingo, J. L. (2016). Human health risks of formaldehyde indoor levels: An issue of concern. *Journal of environmental science and health, part a*, 51(4), 357-363.
- Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, RLAG, & Levis, AG (1987). The micronucleus assay in exfoliated cells from the human oral mucosa. *Mutagenesis*, 2(1), 11-17.
- Seager, A. L., Shah, U. K., Brüsehafer, K., Wills, J., Manshian, B., Chapman, K. E., ... & Jenkins, G. J. (2014). Recommendations, evaluation, and validation of a semi-automated, fluorescent-based scoring protocol for micronucleus testing in human cells. *Mutagenesis*, 29(3), 155-164.
- Sivasankari, N. P., Sundarapandian, S., & Sakthivel, E. (2018). Micronucleus assay in formalin exposed individuals. *Indian Journal of Clinical Anatomy and Physiology*, 5(1), 81-4.
- Smith, J. H. (2011). Cytology, liquid-based cytology, and automation. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynecology*, 25(5), 585-596.
- Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1534.
- Songur, A., Ozen, O. A., & Sarsilmaz, M. (2010). The toxic effects of formaldehyde on the nervous system. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 105-118.

- Stich, H. F., San, R. H., & Rosin, M. P. (1983). Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 407(1), 93-105.
- Terradas, M., Martín, M., & Genescà, A. (2016). Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. *Archives of toxicology*, 90, 2657-2667.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., ... & Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 4(6), 825-837.
- Tomaz, B. C. A., da Silva Ferri, R. N., & Boschini Filho, J. (2016). Frequency of micronucleation and other nuclear changes in cells of the oral mucosa of anemic patients. *Journal of the Faculty of Medical Sciences of Sorocaba*, 18(4), 214-220.
- Tian, D., Ma, H., Feng, Z., Xia, Y., Le, X. C., Ni, Z., ... & Mumford, J. L. (2001). Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia, China. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 64(6), 473-484.
- Tolbert, P. E., Shy, C. M., & Allen, J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 69-77.
- Torres, L. A., dos Santos Rodrigues, A., Linhares, D., Camarinho, R., Rego, Z. M. N. P. S., & Garcia, P. V. (2019). Buccal epithelial cell micronuclei: Sensitive, non-invasive biomarkers of occupational exposure to low doses of ionizing radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838, 54-58.
- Uchida, Y., Nakatsuka, H., Ukai, H., Watanabe, T., Liu, Y. T., Huang, M. Y., ... & Ikeda, M. (1993). Symptoms and signs in workers exposed to xylenes. *International archives of occupational and environmental health*, 64, 597-605
- Valente, P. T., & Schantz, H. D. (2001). Cytology automation: An overview. *Laboratory medicine*, 32(11), 686-690.
- Viegas, S. P. C. (2010). *Estudo da exposição profissional a formaldeído em laboratórios hospitalares de Anatomia Patológica*. Universidade NOVA de Lisboa (Portugal).
- Wojcik, A., Bajinskis, A., Romm, H., Oestreicher, U., Thierens, H., Vral, A., ... & Jaworska, A. (2014). Multidisciplinary biodosimetric tools for a large-scale radiological emergency—the MULTIBIODOSE Project. *Radiation Emergency Medicine*, 3, 19-23.
- Yang, P., Xuan, B., Li, G., & Qi, S. (2023). Does cone-beam computed tomography examination increase the micronuclei frequency in the oral mucosa exfoliated cells? A systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*, 23(1), 127.
- Yao, K., Sadimin, E., Chang, S., Schmolze, D., & Li, Z. (2022). Current applications and challenges of digital pathology in cytopathology. *Human Pathology Reports*, 28, 300634.

Zietkiewicz, E., Wojda, A. & Witt, M. (2009). Cytogenetic perspective of ageing and longevity in men and women. *Journal of Applied Genetics*. 50 (3). 261–273.

LEGISLAÇÃO

Direção-Geral da Saúde. (2017). *Rede de referência hospitalar em anatomia Patológica*. Lisboa: Direção-Geral da saúde.

Direção-Geral da Saúde. (2018). Guia Técnico n.º 2 - Vigilância da saúde dos trabalhadores expostos a agentes químicos cancerígenos, mutagénicos ou tóxicos para a reprodução. Ministério da Saúde. Disponível em www.dgs.pt/saude-ocupacional.aspx

Decreto-lei nº 39/2018 de 11 de Junho. *Diário da República nº 111/2018 – I Série A*. Lisboa: Ministério do Ambiente.

Instituto Português da Qualidade. (2014). Norma Portuguesa NP 1796:2014: Segurança e saúde do trabalho: Valores-limite e índices biológicos de exposição profissional a agentes químicos. Caparica: IPQ. <https://www.ipq.pt/servicos-ipq/consultar-o-catalogo-de-normas>

Jornal Oficial da União Europeia. (2004). Directiva 2004/37/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 relativa à proteção dos trabalhadores contra riscos ligados à exposição a agentes cancerígenos ou mutagénicos durante o trabalho. | <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004L0037>

Jornal Oficial da União Europeia. (2008). Directiva 2008/1272/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 relativa à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas. Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32008R1272>

Jornal Oficial da União Europeia. (2020). Regulamento (UE) 2020/878 da Comissão de 18 de junho de 2020 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.o 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH). Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32020R0878>

Sites:

<https://odontologistas.com.br/histologia-da-mucosa-oral>

<https://www.apopartner.pt/exposicao-ocupacional-ao-formaldeido-vle-e-sancoes/>

8. ANEXOS

Lista de Anexos

Anexo I - Questionário.....	52
Anexo II - Consentimento informado.....	53
Anexo III - Comissão de Ética da UAC.....	54
Anexo IV - Comissão de Ética da UAC (Mudança de título Tese).....	56
Anexo V - Comissão de Ética do HDES.....	58
Anexo VI - Autorização Diretor Serviço Anatomia Patológica HDES.....	59
Anexo VII - Autorização Diretor Serviço Anatomia Patológica LABAP.....	60
Anexo VIII - Autorização Diretor Serviço Anatomia Patológica Hospital CUF Açores.....	61
Anexo IX - Carta Pedido Patrocínio Enzifarma.....	62
Anexo X - Carta Pedido Patrocínio Hologic.....	64
Anexo XI - Carta Pedido Patrocínio Leica.....	66
Anexo XII - Solução PreservCyt™ ThinPrep®.....	68
Anexo XIII - Escovas Cervex-Brush®.....	72
Anexo XIV - <i>Check List</i> para as colheitas das células mucosa bucal.....	73
Anexo XV - Instruções Processamento citologia ThinPrep®.....	74
Anexo XVI - <i>Data Sheet</i> (DS) Ácido Clorídrico.....	77
Anexo XVII - DS Verde Luz.....	78
Anexo XVIII - DS Reagente Shiff.....	79
Anexo XIX - Protocolo Coloração de Feulgen Modificada.....	81
Anexo XX - <i>Mouting media</i> Leica® e equipamento montagem lâminas CV 5030.....	82

Anexo I - Questionário

QUESTIONÁRIO

IDENTIFICAÇÃO: _____ NOME: _____
(Apelido) (1º Nome)

Freguesia _____ Área _____

Morada _____

ENTREVISTADOR: _____ DATA DA ENTREVISTA: _____
MES DIA ANO

1. IDADE: _____ 2. Data nascimento: _____ 3. Local Nasc. _____

4. Sexo: 1. (M) _____ 2. (F) _____

5. Peso (kg): _____ 6. Altura (m): _____ 7. Qual é o seu grau escolar completo mais elevado? _____

CONSUMO DE ÁLCOOL

1.1. Consome bebidas alcoólicas? 1.S _____ 2.N _____

1.2. Que bebida alcoólica consome mais?
1. Cerveja _____ 2. Vinho _____ 3. Destiladas _____

1.3. Quantos copos bebe por dia? _____

CONSUMO DE TABACO (cigarro = cigarrilha = charuto = cachimbo)

2.1. Fuma? 1.S _____ 2.N _____

Se respondeu "Não" à anterior:

2.2. Já fumou mais de 1 cigarro por dia, por mais de 1 ano, ou mais de 20 maços, por mais de 1 ano?
1.S _____ 2.N _____

2.3. Com que idade parou de fumar? _____

Se respondeu "Sim" à 2.1.:

2.4. Quantos cigarros fuma por dia? _____

2.5. Quantos anos tinha quando começou a fumar? _____

2.6. Em sua casa há fumadores? 1.S _____ 2.N _____

OUTROS

3.1. Usa elixir bucal (p/ dentes)? 1.S _____ 2.N _____

3.2. Usa 'spray' para mau hálito? 1.S _____ 2.N _____

3.3. Fez radiografias à zona da boca nas últimas duas semanas? 1.S _____ 2.N _____

3.4. Toma alguma medicação? S _____ 2.N _____

Se respondeu "Sim" à 3.4.:

3.5. Qual? _____

OCUPAÇÃO PROFISSIONAL

4.1. Qual o local de trabalho? _____

4.2. Quantas horas trabalha por semana? _____

Se aplicável, responda às seguintes questões:

4.3. Em que valências do laboratório labora? Seleccione todas aquelas que se aplicam a si.

1. Macroscopia _____ 2. Histologia _____ 3. Citologia _____
4. Histoquímica _____ 5. Imunocitoquímica _____
6. Arquivos _____ 7. Outras _____

4.4. Há quantos anos exerce estas funções? _____

4.5. Qual o tipo de reagentes voláteis que julga estar mais exposto? _____

1. Formol _____ 2. Xilol _____ 3. Metanol _____
4. Descalcificadores _____ 5. Misturas de reagentes _____
6. Líquidos montagem lâminas (utilização manual) _____
4. Outros, quais? _____

4.6. Quantas horas, por semana, julga estar exposto aos compostos voláteis durante o exercício das suas funções? _____

4.7. Quando manipula estes reagentes costuma fazê-lo na hotte?
1.S _____ 2.N _____

4.8. Usa EPI? 1.S _____ 2.N _____

ESPAÇO

5.1- Qual é a Área do local? _____

5.2- Tem janelas? _____ Quantas? _____

5.3- Possui sistema de ventilação forçada? _____

Algumas questões baseadas em:

1. Ferris BG, 1979. Epidemiology standardization project 8. Am. Rev. Resp. Dis. 119(6):3-53.
2. Carquero EM et al., 2004. Genetic damage in isolated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. Mutat. Res. 562 (1-2): 111-7.

Anexo II - Consentimento informado

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO

Designação do estudo: Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade.
Âmbito do estudo: projeto de dissertação da estudante Maria de Fátima Baptista do Curso de Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade dos Açores (Orientadores: Doutores Armindo dos Santos Rodrigues (UAç), Patrícia Ventura Garcia (UAç) e Carina Ladeira (ESTESL)).
Investigador Responsável:
Doutor Armindo dos Santos Rodrigues, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, São Miguel
☎ 296 650 109 ✉ armindo.s.rodrigues@uaç.pt

Por favor, leia com atenção a seguinte informação.

Eu (nome completo), abaixo-assinado, _____, compreendi a explicação que me foi fornecida sobre o estudo que se pretende realizar, designado "Comparação de dois métodos de técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade".

- Compreendi que o estudo visa a obtenção de amostras do epitélio bucal para o estudo de biomarcadores de citotoxicidade e genotoxicidade, utilizando duas técnicas citológicas distintas.
- Compreendi que será recolhida uma amostra do meu epitélio bucal através de um método considerado não invasivo, a qual será exclusivamente utilizada para este estudo.
- Compreendi que este estudo inclui respostas a um breve questionário, as quais são confidenciais e serão unicamente utilizadas para este estudo.
- Tive a oportunidade de formular todas as perguntas que julguei necessárias, tendo obtido resposta satisfatória. Com vista a esclarecer qualquer dúvida que me possa surgir acerca da minha participação neste estudo, fui informado(a) do contacto da responsável pelo estudo, à qual me devo dirigir.
- Compreendi que serão recolhidos dados que serão codificados; apenas o responsável do projeto será capaz de estabelecer a ligação entre o código e a minha pessoa, quando necessário.
- Compreendi que todos os dados recolhidos serão guardados, em local de acesso reservado, comprometendo-se o responsável por zelar pela garantia da confidencialidade e proteção da privacidade. No final do estudo, os dados guardados serão destruídos.
- Foi-me garantida a possibilidade de desistir do estudo em qualquer momento da sua realização, sem fornecer motivos, bastando indicar esse desejo, de forma expressa ou tácita.
- Fui informado(a) de que, atendendo aos objetivos da investigação, não me serão comunicados resultados primários obtidos no projeto, uma vez que os mesmos não têm significado a nível individual. Os dados obtidos serão analisados, podendo os resultados ser divulgados, na sua forma agregada, nos canais científicos adequados (publicações científicas e/ou participação em reuniões científicas).

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

A preencher pelo participante no estudo:

Data: ___ / ___ / ____

Nome (legível) e assinatura: _____

Contacto telefónico: _____

A preencher pelo membro da equipa de investigação:

Data: ___ / ___ / ____

Confirmo ter informado, de forma adequada e compreensível o participante acima indicado, explicando-lhe os objetivos, métodos e procedimentos do estudo.

Nome e assinatura: Fátima Baptista _____ ☎ 930636977

ESTE DOCUMENTO É COMPOSTO DE 1 PÁGINA/S E FEITO EM DUPLICADO:

UMA VIA PARA O/A INVESTIGADOR/A, OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE

Anexo III - Comissão de Ética da UAC



PARECER 59/2023

Registo: Distribuição UAC/2023/23073 - Pedido de Parecer sobre Projeto de Dissertação de Mestrado

Requerente: Maria de Fátima Simas Ávila Baptista, estudante do Mestrado em Ciências Biomédicas, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade dos Açores

Título do Projeto: *Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade*

Enquadramento

O Código de Ética da Universidade dos Açores, aprovado pelo Despacho nº 9795/2015, publicado no Diário da República, 2ª série - nº 167, de 27 de agosto de 2015, prevê no nº2 do artigo 3º que "[á] Comissão de Ética compete a emissão de pareceres sobre as questões que forem remetidas à sua apreciação pela comunidade académica, a pronúncia sobre os aspetos éticos dos projetos de investigação submetidos pelos núcleos, centros ou investigadores individuais, bem como a produção de recomendações sempre que se considerarem necessárias."

Parecer

A análise da documentação remetida à Comissão permitiu verificar que os procedimentos adotados salvaguardam no geral os aspetos éticos da investigação.



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

COMISSÃO DE ÉTICA

Assim, a Comissão deliberou **aprovar** o projeto *Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade*, tal como submetido.

Ponta Delgada, 22 de novembro de 2023

Os Membros da Comissão de Ética que deliberaram,

Assinado por: **Vitor Manuel da Costa Gonçalves**
Num. de identificação: 08585092
Data: 2023.11.23 00:22:09 -0100



Assinado por: **Magda Eugénia Pinheiro Brandão da Costa Carvalho Teixeira**
Num. de identificação: 10893748
Data: 2023.11.27 06:27:07 -0100



Assinado por: **André Ricardo Rodrigues**
Num. de identificação: 01111111
Data: 2023.11.23 08:11:11 -0100

Assinado por: **Alberto Carlos Marques Duarte**
Num. de identificação: 07089520
Data: 2023.11.27 07:48:14 -0100



Assinado por: **Maria Luísa Silva Rocha**
Num. de identificação: 11895289
Data: 2023.11.23 10:39:59 -0100



Anexo IV - Comissão de Ética da UAC (Pedido mudança de título Tese)

UNIVERSIDADE DOS AÇORES

Confirmação de Receção

O seu formulário foi submetido com sucesso!

UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Reitoria

ALTERAÇÃO DE REGISTO DO TRABALHO FINAL

Referência MSc/ARGT_TI/RG/2024/015

Submetida 29/07/2024 16:25:17 por Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Introdução

O presente pedido de alteração de registo do trabalho final é realizado nos termos do disposto no artigo 30.º do Regulamento Geral dos Mestrados da Universidade dos Açores.

Recomendamos a leitura atenta do Regulamento Geral dos Mestrados da Universidade dos Açores para um necessário e devido conhecimento do enquadramento regulamentar do pedido.

Identificação

Nome Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Nº de aluno 2022101583

Telefone/Telemóvel 932638977

Morada Rua Canada da Abelheira, nº12 - 9545 - 106 Capelas

Código postal 9545

E-mail 2022101583@uac.pt

Observações Pedido de autorização do Título da Tese de Mestrado

Identificação do Curso

Faculdade/Escola Faculdade de Ciências e Tecnologia

Curso Mestrado em Ciências Biomédicas

Parecer(es)

Orientador Principal

Nome Armindo dos Santos Rodrigues

Parecer [Parecer_alteração título tese_signed_Prof Armindo dos Santos Rodrigues.pdf](#)

Outro(s) Orientador(es)

Nome Patrícia Ventura Garcia

Paracer	Paracer alteração de título ,signed_Prof. Patricia Ventura Garcia.pdf
Nome	Carina Ladeira
Paracer	Paracer alteração de título-Prof. Carina Ladeira.pdf
Nome	
Paracer	
Alteração do registo	
Selecione os campos que pretende alterar:	
Título do trabalho final	
Título do trabalho final	Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade em profissionais de anatomia patológica através do ensaio dos micronúcleos em células bucais.

Anexo V - Comissão de Ética do HDES



Região Autónoma dos Açores
Secretaria Regional da Saúde
Direção Regional da Saúde
Hospital Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, EPER

V/Referência ▾

DATA:

N/Referência ▾

S-HDES/2024/29

DATA: 11/01/2024

Ex.^{ma} Senhor(a)

Dra. Maria de Fátima Baptista

Assunto: Pedido de parecer para a realização do projeto de investigação "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade"

Encarrega-me a Senhora Presidente do Conselho de Administração do HDESPD, EPER, de informar a V. Exa. de que foi autorizada a realização do projeto de investigação "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade" no Hospital do Divino Espírito Santo solicitado por V. Exa., após parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde deste Hospital.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente do Conselho de Administração do HDES, EPER

Dra. Manuela Menezes

Anexo VI - Autorização Diretor Serviço Anatomia Patológica HDES

PARECER DO DIRETOR DO SERVIÇO

Eu, Vítor Manuel Dias Carneiro, abaixo assinado, na qualidade de Diretor do Serviço de Anatomia Patológica, declaro que o Projeto de investigação "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade", é relevante e oportuno, tendo o Serviço de Anatomia Patológica as condições necessárias para a sua realização.



Declaro que a sua realização não requer condições especiais e ocorrerá sem prejuízo da atividade assistencial do Serviço.



Declaro que a sua realização deverá ocorrer com as seguintes condições:

Ponte Delgada, 03 de Novembro 2023

Vítor Manuel Dias Carneiro

Anexo VII - Autorização Diretor LABAP

Exmo. Senhor Dr. José Cabral
Diretor do LABAP

A signatária está, no âmbito do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade dos Açores, a desenvolver o trabalho de investigação "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade", sob a orientação do Doutor Armindo Rodrigues, Professor Catedrático da Universidade dos Açores, Doutora Patrícia Garcia, Professora Associada da Universidade dos Açores, e Doutora Carina Ladeira, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa do Instituto Politécnico de Lisboa. É imprescindível para este trabalho proceder à realização de inquéritos e recolha de material para estudo na população alvo. A signatária compromete-se a manter toda a confidencialidade inerente ao tratamento dos dados em apreço.

Neste sentido, venho solicitar autorização ao LABAP, para participar no estudo, com os profissionais que voluntariamente o queiram fazer.

Aproveito ainda para referir que apresento total disponibilidade para qualquer esclarecimento adicional.

Com os melhores cumprimentos,

Ponta Delgada, 19 de Janeiro de 2024

Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

*Autorizo que o LABAP
participe neste estudo.
M. de Fátima Simas Ávila Baptista*

Anexo VIII - Autorização Diretor Serviço Anatomia Patológica Hospital CUF Açores



DECLARAÇÃO

Rui Pedro Caetano Moreira de Oliveira, Médico titular da cédula OM nº 53516, na qualidade de Diretor Técnico do Centro de Anatomia Patológica Germano de Sousa, declaro para os devidos efeitos aceitar a realização do trabalho da aluna Maria de Fátima Simas Ávila Baptista, intitulado "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade" em profissionais e nas instalações do nosso laboratório.

Coimbra, 18 de janeiro de 2024

Rui Caetano Oliveira



Assinado por Rui Pedro
Caetano Moreira de Oliveira
Identificação: 862714275
Data: 2024-01-18 às 09:58:58

Anexo IX - Carta Pedido Patrocínio Enzifarma

Exma. Sr. (Sra.) Diretor (a)
Empresa Enzifarma

A signatária está, no âmbito do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade dos Açores, a desenvolver o trabalho de investigação "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade", sob a orientação do Doutor Armindo Rodrigues, Professor Catedrático da Universidade dos Açores, Doutora Patrícia Garcia, Professora Associada da Universidade dos Açores, e Doutora Carina Ladeira, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa do Instituto Politécnico de Lisboa.

Nos Laboratórios de Anatomia Patológica são frequentemente utilizadas substâncias/reagentes que contêm compostos orgânicos voláteis, como por exemplo, o formaldeído e o xilol. Estas substâncias são reconhecidas como genotóxicas e citotóxicas, pelo que a sua manipulação apresenta riscos para a saúde humana. A análise das anomalias nucleares em células bucais esfoliadas, através do teste dos micronúcleos, é um método não invasivo útil e simples para avaliar estes efeitos em indivíduos expostos a este tipo de substâncias.

O projeto a desenvolver tem como objetivos: comparar duas técnicas citológicas, uma convencional e outra líquida em monocamada, em termos de qualidade, número de células a visualizar, durabilidade da coloração, sensibilidade e custo, e avaliar o risco de genotoxicidade e citotoxicidade em profissionais de laboratórios de anatomia patológica, através da quantificação de micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares (ONA) em células da mucosa bucal.

O procedimento experimental compreende a realização da técnica citológica em dois grupos distintos, sendo 50 indivíduos expostos a Compostos Orgânicos Voláteis (COV) em contexto ocupacional (profissionais de Anatomia Patológica) e 50 não expostos a este ambiente (grupo de referência), partilhando dados semelhantes em relação a outros determinantes como a idade, o sexo, o tempo e tipo de exposição. Em simultâneo com a técnica convencional, será realizada a citologia líquida em monocamada para a demonstração dos efeitos comparativos. A totalidade das lâminas será submetida à coloração de Feulgen modificada. As anomalias nucleares serão visualizadas/quantificadas ao microscópio ótico, sendo observadas 2000 células por indivíduo na metodologia convencional e a citologia em monocamada, que será processada em equipamento automático e submetida a leitura em scanner. Com este trabalho, pretende-se avaliar qual a técnica citológica mais vantajosa em termos de qualidade, sensibilidade e custo para avaliar os riscos genotóxicos e citotóxicos e dar um contributo, em contexto ocupacional, aos profissionais de Anatomia Patológica.

É imprescindível para este trabalho proceder à realização da coloração de Feulgen modificada e a escolha sugere o Kit de coloração de DNA da Bio-óptica para proceder à coloração de todas as lâminas utilizadas no estudo que se prevê ser cerca de 300 na população alvo. A signatária compromete-se a manter todas as recomendações do fabricante inerentes ao processo histoquímico das amostras.

Neste sentido, venho solicitar à Enzifarma o patrocínio do Kit que compreende os reagentes necessários à realização da técnica de Feulgen, para todas as amostras.

Aproveito ainda para referir que apresento total disponibilidade para qualquer esclarecimento adicional e comprometo-me a colaborar com a empresa na apresentação dos resultados obtidos.

Com os meus cumprimentos,

Porta Delgada, 18 de Outubro de 2023



Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Anexo X - Carta Pedido Patrocínio Hologic

Exma. Sr. (Sra.) Diretor (a)
Empresa Hologic

A signatária está, no âmbito do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade dos Açores, a desenvolver o trabalho de investigação "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade", sob a orientação do Doutor Armindo Rodrigues, Professor Catedrático da Universidade dos Açores, Doutora Patrícia Garcia, Professora Associada da Universidade dos Açores, e Doutora Carina Ladeira, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa do Instituto Politécnico de Lisboa.

Nos Laboratórios de Anatomia Patológica são frequentemente utilizadas substâncias/reagentes que contêm compostos orgânicos voláteis, como por exemplo, o formaldeído e o xilol. Estas substâncias são reconhecidas como genotóxicas e citotóxicas, pelo que a sua manipulação apresenta riscos para a saúde humana. A análise das anomalias nucleares em células bucais esfoliadas, através do teste dos micronúcleos, é um método não invasivo útil e simples para avaliar estes efeitos em indivíduos expostos a este tipo de substâncias.

O projeto a desenvolver tem como objetivos: comparar duas técnicas citológicas, uma convencional e outra líquida em monocamada, em termos de qualidade, número de células a visualizar, durabilidade da coloração, sensibilidade e custo, e avaliar o risco de genotoxicidade e citotoxicidade em profissionais de laboratórios de anatomia patológica, através da quantificação de micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares (ONA) em células da mucosa bucal.

O procedimento experimental compreende a realização da técnica citológica em dois grupos distintos, sendo 50 indivíduos expostos a Compostos Orgânicos Voláteis (COV) em contexto ocupacional (profissionais de Anatomia Patológica) e 50 não expostos a este ambiente (grupo de referência), partilhando dados semelhantes em relação a outros determinantes como a idade, o sexo, o tempo e tipo de exposição. Em simultâneo com a técnica convencional, será realizada a citologia líquida em monocamada para a demonstração dos efeitos comparativos. A totalidade das lâminas será submetida à coloração de Feulgen modificada. As anomalias nucleares serão visualizadas/quantificadas ao microscópio ótico, sendo observadas 2000 células por indivíduo na metodologia convencional e a citologia em monocamada, que será processada em equipamento automático e submetida a leitura em scanner. Com este trabalho, pretende-se avaliar qual a técnica citológica mais vantajosa em termos de qualidade, sensibilidade e custo para avaliar os riscos genotóxicos e citotóxicos e dar um contributo, em contexto ocupacional, aos profissionais de Anatomia Patológica.

É imprescindível para este trabalho proceder à realização da técnica em citologia líquida e a escolha sugere o Kit de citologia não ginecológica da Hologic para obter os efeitos comparativos desejados na recolha e processamento de material para estudo na população alvo. A signatária compromete-se a manter todas as recomendações do fabricante inerentes ao tratamento das amostras e processamento no equipamento da Hologic.

Neste sentido, venho solicitar a V. Exª. o patrocínio de um kit de 100 amostras que compreende 100 frascos, 100 filtros e 100 lâminas, para a realização da técnica.

Aproveito ainda para referir que apresento total disponibilidade para qualquer esclarecimento adicional e comprometo-me a colaborar com a empresa na apresentação dos resultados obtidos.

Com os meus cumprimentos,

Ponte Delgada, 18 de Outubro de 2023



Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Anexo XI - Carta Pedido Patrocínio Leica

Exma. Sr. (Sra.) Diretor (a)
Empresa Leica

A signatária está, no âmbito do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade dos Açores, a desenvolver o trabalho de investigação "Comparação de duas técnicas citológicas para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade", sob a orientação do Doutor Armindo Rodrigues, Professor Catedrático da Universidade dos Açores, Doutora Patrícia Garcia, Professora Associada da Universidade dos Açores, e Doutora Carina Ladeira, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa do Instituto Politécnico de Lisboa.

Nos Laboratórios de Anatomia Patológica são frequentemente utilizadas substâncias/reagentes que contêm compostos orgânicos voláteis, como por exemplo, o formaldeído e o xilol. Estas substâncias são reconhecidas como genotóxicas e citotóxicas, pelo que a sua manipulação apresenta riscos para a saúde humana. A análise das anomalias nucleares em células bucais esfoliadas, através do teste dos micronúcleos, é um método não invasivo útil e simples para avaliar estes efeitos em indivíduos expostos a este tipo de substâncias.

O projeto a desenvolver tem como objetivos: comparar duas técnicas citológicas, uma convencional e outra líquida em monocamada, em termos de qualidade, número de células a visualizar, durabilidade da coloração, sensibilidade e custo, e avaliar o risco de genotoxicidade e citotoxicidade em profissionais de laboratórios de anatomia patológica, através da quantificação de micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares (ONA) em células da mucosa bucal.

O procedimento experimental compreende a realização da técnica citológica em dois grupos distintos, sendo 50 indivíduos expostos a Compostos Orgânicos Voláteis (COV) em contexto ocupacional (profissionais de Anatomia Patológica) e 50 não expostos a este ambiente (grupo de referência), partilhando dados semelhantes em relação a outros determinantes como a idade, o sexo, o tempo e tipo de exposição. Em simultâneo com a técnica convencional, será realizada a citologia líquida em monocamada para a demonstração dos efeitos comparativos. A totalidade das lâminas será submetida à coloração de Feulgen modificada. As anomalias nucleares serão visualizadas/quantificadas ao microscópio ótico, sendo observadas 2000 células por indivíduo na metodologia convencional e a citologia em monocamada, que será processada em equipamento automático e submetida a leitura em scanner. Com este trabalho, pretende-se avaliar qual a técnica citológica mais vantajosa em termos de qualidade, sensibilidade e custo para avaliar os riscos genotóxicos e citotóxicos e dar um contributo, em contexto ocupacional, aos profissionais de Anatomia Patológica.

É imprescindível para este trabalho proceder à realização da técnica em citologia líquida de monocamada com o Kit de citologia não ginecológica da Hologic para obter os efeitos comparativos desejados na recolha e processamento de material para estudo na população alvo. Contudo, devido à exigência do método convencional ser necessário observar cerca de 2000 células (por participante) e não ser possível utilizar o scanner para o efeito, para a citologia em monocamada já se torna viável esta leitura.

Neste sentido, venho solicitar a V. Ex^{sa}. o patrocínio, para a realização da leitura de 100 lâminas de citologia Thin Prep, no Vosso equipamento, para este estudo.

Aproveito ainda para referir que apresento total disponibilidade para qualquer esclarecimento adicional e comprometo-me a colaborar com a empresa na apresentação dos resultados obtidos.

Com os meus cumprimentos,

Porto Delgada, 18 de Outubro de 2023



Maria de Fátima Simas Ávila Baptista

Anexo XII - Solução PreservCyt™ ThinPrep®

Instruções de utilização



UTILIZAÇÃO PREVISTA

A Solução ThinPrep™ PreservCyt™ consiste num meio de transporte, conservação e antibacteriano para amostras não ginecológicas e é utilizada para preparar lâminas de citologia utilizando um ThinPrep™ Processor como parte do Sistema ThinPrep™. Para utilização profissional.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A Solução PreservCyt destina-se a ser utilizada com o ThinPrep Processor, um dispositivo de preparação citológica que produz lâminas para exame ao microscópio. A Solução PreservCyt permite o transporte e conservação de células por um período de até três semanas à temperatura ambiente.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

A Solução PreservCyt é um meio utilizado para a colheita e conservação de células e ADN de amostras de pacientes. Quando utilizada no ThinPrep Processor, permite a transferência de células para uma lâmina de microscópio, facultando uma camada fina e uniforme de células, adequada à avaliação citológica.

COMPOSIÇÃO

Solução tampão conservante à base de metanol. 35–55% de metanol. CAS 67-56-1

ADVERTÊNCIAS

Perigo. Inflamável. Contém metanol.

H302. Tóxico por ingestão.

H311. Tóxico em contacto com a pele.

H331. Tóxico por inalação.

H373. Afeta os órgãos.

H226. Líquido e vapor inflamáveis.

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Não se destina a utilização externa nem interna em seres humanos ou animais. Impossível tomar não tóxica. Utilizar com ventilação adequada.

PRECAUÇÕES

P210. Manter afastado de calor/falasca/chama aberta/superfícies quentes.

P260. Não respirar as poeiras/fumos/gases/nevoas/vapores/aerossóis.

P280. Usar luvas de proteção/roupa de proteção/proteção ocular/proteção facial.

P301 + P310. EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P303 + P361 + P353. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.

Solução ThinPrep PreservCyt
Instruções de utilização
Português AW-22939-802 Rev. 001 3-2021

1/4



Solução ThinPrep™ PreservCyt™

P305 + P351 + P338. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

P308 + P313. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P370 + P378. Em caso de incêndio: para a extinção utilizar areia seca, pó químico seco ou espuma resistente a álcool.

P403 + P233. Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.

P501. Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.

Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.

Não utilizar se o selo de inviolabilidade do frasco estiver quebrado ou não existir, bem como se a embalagem principal estiver danificada.

Certifique-se de que o frasco da Solução PreservCyt com células está bem fechado antes de o transportar. Alinhar a marca existente na tampa com a marca existente no frasco para evitar fugas. (Ver Figura 1)



A linha na tampa e a linha no frasco devem unir ou sobrepôr-se ligeiramente.

Figura 1



Figura 2

A Solução PreservCyt foi testada com uma série de organismos microbianos e virais. A Tabela 1 apresenta as concentrações iniciais de organismos viáveis e o número de organismos viáveis detetados após 15 minutos na Solução PreservCyt. É também apresentada a redução logarítmica de organismos viáveis. Tal como com todos os procedimentos laboratoriais, devem seguir-se as precauções universais.

TRATAMENTO PRÉVIO

Não é necessário proceder à reconstituição, mistura ou diluição.

CONSERVAÇÃO

Conserve a Solução PreservCyt, sem amostras citológicas, a temperaturas entre os 15 °C e os 30 °C. Não utilize a Solução PreservCyt para além do prazo de validade indicado no recipiente. Tape o frasco de 948 ml após cada utilização.

ASPETO E INTEGRIDADE

Solução transparente não estéril.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Proceda à colheita de amostras não ginecológicas da forma usual e consulte as instruções de preparação no Manual do Utilizador do ThinPrep Processor. Registe as informações necessárias sobre a paciente no espaço facultado. (Ver Figura 2.)

Substâncias interferentes conhecidas

A utilização de lubrificantes (por ex., KY® Jelly) deverá ser reduzida ao mínimo antes da colheita das amostras. Os lubrificantes poderão aderir à membrana do filtro e provocar uma transferência deficiente das células para a lâmina.

Conservação e manuseamento

A Solução PreservCyt conserva as células por um período de até três semanas a temperaturas entre 4 °C e 37 °C.

INSTRUÇÕES PARA O PROCESSAMENTO

As amostras citológicas colhidas numa Solução PreservCyt devem ser processadas num ThinPrep Processor em conformidade com as instruções apresentadas no manual do utilizador do ThinPrep Processor.

Solução ThinPrep™ PreservCyt™

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A Solução PreservCyt não pode ser substituída por qualquer outra solução para a colheita, preparação ou processamento de amostras em qualquer ThinPrep Processor.

CARACTERÍSTICAS DE SEGURANÇA E DE DESEMPENHO

Consulte o Manual do Utilizador do ThinPrep Processor.

Se ocorrer um incidente grave relacionado com este dispositivo ou quaisquer componentes utilizados com este dispositivo, comunique-o à Assistência técnica da Hologic e à autoridade competente local em relação à paciente e/ou utilizador.

ELIMINAÇÃO

Elimine em conformidade com todos os regulamentos aplicáveis.

MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Consulte a Ficha de Dados de Segurança completa em www.hologicusa.com.

TABELA 1

Organismo	Concentração inicial	Redução logarítmica após 15 minutos
<i>Candida albicans</i>	5.5×10^8 CFU/ml	≥4,7
<i>Candida auris</i>	2.6×10^8 CFU/ml	≥5,4
<i>Aspergillus niger</i>	4.8×10^8 CFU/ml	≥2,7
<i>Escherichia coli</i>	2.8×10^8 CFU/ml	≥4,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.3×10^8 CFU/ml	≥4,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5×10^8 CFU/ml	≥4,4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	9.4×10^6 CFU/ml	4,9**
Poxvirus do coelho	6.0×10^7 PFU/ml	5,5***
VIH-1	3.2×10^7 TCID ₅₀ /ml	≥10***
Vírus da hepatite B†	2.2×10^8 TCID ₅₀ /ml	≥4,25
Vírus SARS-CoV-2	1.8×10^8 TCID ₅₀ /ml	≥3,75

* do fim de 1 hora, redução logarítmica de 4,7

† do fim de 1 hora, redução logarítmica de 6,7

** Os dados correspondem a 5 minutos.

†† Os organismos foram testados com organismos semelhantes do mesmo género para avaliar a eficácia antimicrobiana.

Nota: Todos os valores de redução logarítmica com uma designação > representam uma presença microbiana indetectável após a exposição à Solução PreservCyt. Os valores indicados representam a redução mínima permitida dada a concentração inicial e o teste de deteção do método quantitativo.

Histórico de revisões

Revisão	Data	Descrição
AW-22939-602 Rev. 001	3-2021	Esclarecimento de instruções. Adição de instruções relativas à comunicação de incidentes graves.

Solução ThinPrep™ PreservCyt™

Fabricante



Consultar as instruções de utilização



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Número de catálogo



Usar até



Código do lote



Limites de temperatura



Fabricado nos EUA



Não reutilizar



Inflamável



Toxicidade aguda



Sensibilizante respiratório, toxicidade em órgãos alvo



Quantidade

Hologic, Inc. - 290 Campus Drive - Marlborough, MA 01752 EUA
Tel.: +1 (508) 263-2900 - www.hologic.com

Hologic BV - De Vinciaan 5 - 1930 Zaventem - Bélgica - Tel.: +32 2 711 46 80

Patrocinador australiano: Hologic (Australia and New Zealand) Pty Ltd - Suite 302, Level 3 - 2 Lyon Park Road
Macquarie Park NSW 2113 - Austrália - Tel.: +02 9888 8000Solução ThinPrep PreservCyt
Instruções de utilização
Português AW-22939-602 Rev. 001 3-2021

4/4



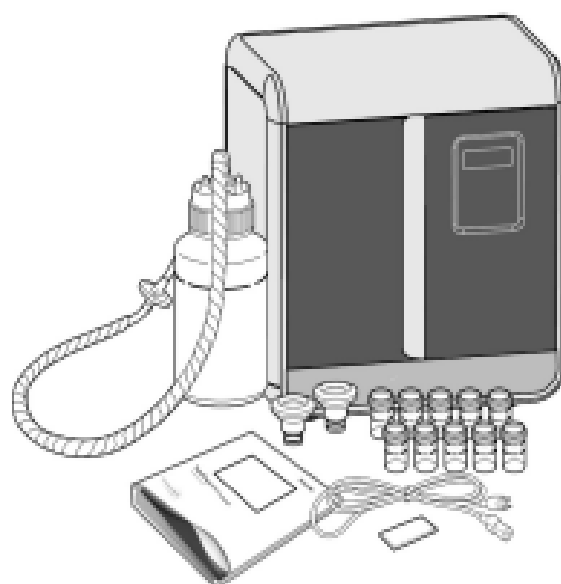
Anexo XIV - Check List para as colheitas das células mucosa bucal

PROCEDIMENTO DAS COLHEITAS PARA CITOLOGIA DA MUCOSA BUCAL

1. Consentimento informado (X2) e questionário
2. Dar duas escovas (num involucro individual preparado pelo serviço de esterilização do HDES), em que com uma delas o participante faz um movimento rotativo numa das bochechas 5x e vira a escova, que no mesmo lado roda novamente 5x. Retira a segunda escova para repetir o mesmo procedimento na bochecha oposta e vai colocando as escovas no involucro. Entrega imediatamente a colheita das duas amostras.
3. Com a amostra de uma das escovas deslizo de lado por um dos lados da lâmina, repito o procedimento pelo outro lado da escova e outro lado da lâmina e utilizo o fixador Mercofix à base de metanol (com a finalidade de facilitar o transporte e assegurar o tempo que for necessário uma fixação adequada). Realizadas os esfregaços convencionais mergulho as duas escovas no frasco da citologia líquida Thin prep (Hologic), que contem uma solução fixadora e estabilizadora composta essencialmente pelo Metanol. Por fim as escovas são descartadas no respetivo involucro.
4. As citologias podem ficar neste passo o tempo que for necessário (até um mês ou mais)
5. As lâminas da citologia convencional estão prontas, no entanto é necessário processar a citologia líquida num equipamento da Hologic dando origem a uma lâmina, por meio de uma tecnologia de imprint.
6. Todas as lâminas são colocadas em Álcool a 96%
7. Segue a coloração citoquímica de DNA Feulgen

Elaborado por: Fátima Baptista

ThinPrep 2000 System



Instruções de Utilização

CE



APLICAÇÃO

O Sistema ThinPrep® 2000 destina-se a ser utilizado em substituição do método convencional de testes de esfregaço de Papanicolaou para detecção da presença de células atípicas, cancro cervical ou respectivas lesões precursoras (lesões intra-epiteliais pavimentosas de baixo grau, lesões intra-epiteliais pavimentosas de alto grau), bem como todas as outras categorias citológicas, conforme definido por *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses*¹.

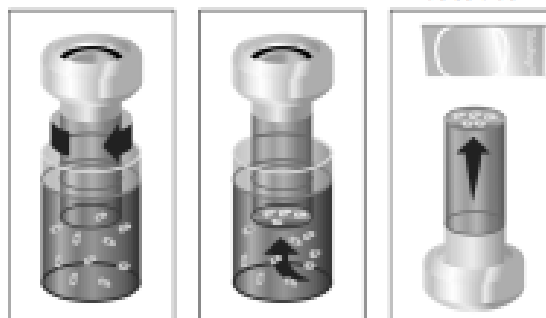
RESUMO E EXPLICAÇÃO DO SISTEMA

O processo ThinPrep inicia-se com a colheita da amostra ginecológica da paciente pelo médico, utilizando um dispositivo de amostragem cervical. Em vez de ser espalhada numa lâmina de microscópio, a amostra é mergulhada e entaguada num frasco com 20 ml de Solução PreservCyt® (PreservCyt). O frasco com a amostra ThinPrep é seguidamente tapado, rotulado e enviado para um laboratório equipado com um Processador ThinPrep 2000.

No laboratório, o frasco de amostra PreservCyt é colocado num Processador ThinPrep 2000 que, numa ligeira operação de dispersão, procede à separação do sangue, muco e detritos não diagnósticos e mistura cuidadosamente a amostra de células. A seguir, é efectuada a colheita das células num Filtro ThinPrep Pap Test, concebido especificamente para a colheita de células de diagnóstico. O Processador ThinPrep 2000 controla permanentemente a taxa de fluxo através do Filtro ThinPrep Pap Test durante o processo de colheita, para evitar que a apresentação celular seja demasiado escassa ou demasiado densa. Uma fina camada de células é então transferida para uma lâmina de vidro num círculo com 20 mm de diâmetro e a lâmina é automaticamente depositada numa solução de fixação.

Processo de preparação de amostras ThinPrep

1. Dispersão 2. Colheita de células 3. Transferência de células



(1) Dispersão

O Filtro ThinPrep Pap Test roda dentro do frasco da amostra, criando correntes no fluido suficientemente fortes para separar os detritos e dispersar o muco, mas não tão agressivas que possam afectar o aspecto das células.

(2) Colheita de células

É criado um ligeiro vácuo dentro do Filtro ThinPrep Pap Test, o qual permite colher as células na superfície exterior da membrana. A colheita de células é controlada pelo software do Processador ThinPrep 2000, que controla a taxa de fluxo através do Filtro ThinPrep Pap Test.

(3) Transferência de células

Após a colheita das células na membrana, o Filtro ThinPrep Pap Test é invertido e ligeiramente pressionado contra a Lâmina de microscópio ThinPrep. A atracção natural e uma ligeira pressão positiva do ar fazem com que as células adiram à Lâmina de microscópio ThinPrep, resultando numa distribuição regular das células numa área circular definida.

Tal como com os testes de colheita de Papanicolaou convencionais, as lâminas preparadas com o Sistema ThinPrep 2000 são examinadas no contexto do histórico clínico da paciente e da informação fornecida por outros procedimentos diagnósticos, tais como a colposcopia, a biópsia e o teste ao papilomavírus humano (HPV), para determinar de tratamento a administrar à paciente.

A componente Solução PreservCyt® do Sistema ThinPrep 2000 constitui um meio alternativo de colheita e de transporte para amostras ginecológicas testadas com os ensaios HPV DNA do Sistema Digene Hybrid Capture™ e Hologic APTIMA COMBO 2® CTNG. Consulte os folhetos informativos do respetivo fabricante para obter instruções de utilização da Solução PreservCyt para a colheita, transporte, armazenamento e preparação de amostras para utilização com estes sistemas.


A componente Solução PreservCyt do Sistema ThinPrep 2000 constitui igualmente um meio alternativo de colheita e transporte para amostras ginecológicas testadas com o ensaio COBAS AMPLICOR™ CTNG da Roche Diagnostic. Consulte o rótulo de Hologic (documento n.º MAN-02853-001) para obter as instruções de utilização da Solução PreservCyt para a colheita, transporte, armazenamento e preparação de amostras, assim como o folheto informativo de embolagem do ensaio COBAS AMPLICOR CTNG da Roche Diagnostic para obter instruções de utilização deste sistema.

LIMITAÇÕES

- As amostras ginecológicas que são ser preparadas com o Sistema ThinPrep 2000 devem ser colhidas com dispositivos de colheita de tipo vasocon ou combinados (peneira endocervical/capítulo de plástico).
- A preparação das lâminas de microscópio utilizando o Sistema ThinPrep 2000 deve ser efectuada apenas por pessoal que tenha recebido formação por parte do Hologic ou de organizações ou indivíduos designados pelo Hologic.
- A avaliação das lâminas de microscópio produzidas com o Sistema ThinPrep 2000 deve ser efectuada apenas por citotécnicos e patologistas que tenham recebido formação para avaliação das Lâminas ThinPrep preparadas por parte do Hologic ou de organizações ou indivíduos designados pelo Hologic.
- Os componentes utilizados no Sistema ThinPrep 2000 são os designados e fornecidos pelo Hologic especificamente para o Sistema ThinPrep 2000. Estes incluem frascos de Solução PreservCyt, Filtros ThinPrep-Pap Test e Lâminas de microscópio ThinPrep. Estes componentes são necessários para um desempenho correcto do sistema e não podem ser substituídos. O desempenho do produto ficará comprometido se forem utilizados outros componentes. Após a utilização, os componentes devem ser eliminados de acordo com os regulamentos locais e nacionais.
- Os Filtros ThinPrep Pap Test devem ser utilizados apenas uma vez e não podem ser reutilizados.
- O desempenho dos ensaios HPV DNA e CTNG em frascos de amostras representados não foi avaliado.

Anexo XVI - "Data Sheet" (DS) Ácido Clorídrico

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA		Honeywell Fluka		
de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006, e emendas				
Hydrochloric acid				
07102-2.5L				
Versão 1.6		Data de revisão 30.11.2023		
P302 + P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com água.			
P304 + P340	EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.			
P305 + P351 + P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.			
P308 + P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.			
2.3. Outros perigos				
Resultados da avaliação PBT e mPmB, veja o capítulo 12.5. A substância/mistura não contém componentes considerados como tendo propriedades desreguladoras do sistema endócrino de acordo com o artigo 57(f) do REACH ou o Regulamento Delegado da Comissão (UE) 2017/2100 ou o Regulamento da Comissão (UE) 2018/605 a níveis de 0,1% ou superiores. A substância/mistura não contém componentes considerados persistentes, bioacumuláveis e tóxicos (PBT) ou muito persistentes e muito bioacumuláveis (vPvB) a níveis de 0,1% ou superior.				
SECÇÃO 3: Composição/informação sobre os componentes				
3.1. Substâncias				
Nome Químico	No. CAS No. de índice Número de registo REACH No. CE	Classificação 1272/2008	Concentração	Observações
ácido clorídrico	7647-01-0 017-002-01-X 01-2119484862-27 231-025-7	Skin Cor. 1A; H314 STOT SE 3; H335; Sistema respiratório	37 %	Eye Dam. 1; H319 1 % STOT SE 3; H335
Página 3 / 18				



www.sigmaaldrich.com

Número 1.1
Data de validade: 04.04.2023
Data de expiração: 21.08.2023

FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO

SEÇÃO 1: Identificação do produto e da empresa

1.1 Identificadores do produto
Nome do produto : **Light Green SF Yellowish**

Referência do Produto : L1885
Marca : Sigma-Aldrich
Número REACH :
A que a substância ou os seus usos estão inscritos no registo, o seu número de registo ou o seu número de autorização (se aplicável) :
Número de registo : 5141-20-8

1.2 Usos Identificados da substância ou mistura e usos não recomendados
Usos Identificados : Produtos químicos de laboratório, Manufatura de substâncias

1.3 Detalhes do fornecedor da ficha de informação de Segurança de Produto Químico - REACH
Empresa :
1.4 Número de telefone de emergência
Número de Telefone de Emergência : +1(313)-36660173 (DIEMEREC)

SEÇÃO 3: Composição e Informação sobre os Ingredientes

3.1 Substâncias
Substância : Acid Green 5

Fórmula molecular : C₁₇H₁₄N₂O₅
Peso molecular : 326,30 g/mol
Nº CAS : 5141-20-8
Nº CE : 225-286-5

De acordo com a norma aplicável não é necessário dividir nenhum dos componentes.

SEÇÃO 4: Medidas de primeiros socorros

4.1 Descrição das medidas de primeiros-socorros

Recomendação geral
Consultar um médico. Procurar esta FISPQ ao médico de plantão.

Se inalado
Se a vítima tiver respirado a substância, movê-la para o ar livre. Se não houver respiração, aplicar respiração artificial. Consultar um médico.

Em caso de contacto com a pele
Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

Em caso de contacto com o olho
Lavar os olhos com água como precaução.

Se ingerido
Não dar nada pelo boca a uma pessoa inconsciente. Lavar a boca com água corrente. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, agudos e retardados
Os sintomas e efeitos mais importantes deverão ser na etiqueta (ver secção 2.2) e / ou na secção 11.

4.3 Indicação do atestado médico imediato e do tratamento especial necessário
Dados não disponíveis

SEÇÃO 2: Identificação de perigos

2.1 Classificação da substância ou mistura
Substância ou mistura não perigosa de acordo com o Regulamento Europeu 1272/2008 (EC).

2.2 Elementos de rotulo
Substância ou mistura não perigosa de acordo com o Regulamento Europeu 1272/2008 (EC).

2.3 Outros Perigos
Esta substância/mistura não contém componentes que podem ser considerados persistentes, bioacumulativos e tóxicos (PBT), ou muito persistentes e muito bioacumulativos (vPvB) em níveis a partir de 0,1%.

Sigma-Aldrich L1885
Emprego/destino: 00010 (Data de validade: 08/2023)
The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the US and Canada

SEÇÃO 5: Medidas de combate a incêndio

5.1 Meios de extinção
Meios adequados de extinção
Usar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

5.2 Riscos especiais resultantes da substância ou da mistura
Riscos de carbono
Óxido de nitrogênio (NOx)
Óxido de enxofre
Óxido de sódio

5.3 Precauções para bombeiros
Usar equipamentos de respiração autónoma para combater a incêndios, se necessário.

Sigma-Aldrich L1885
Emprego/destino: 00001 (Data de validade: 08/2023)
The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the US and Canada

Anexo XVIII - DS Reagente de Schiff

Reagente de Schiff Feulgen



Dispositivo médico-diagnóstico in vitro

BASIC UDI: 080339762W01030708X8

IVD na Classe A, Reg. UE 2017/745



Código	Corte/unidade de venda	UDI-DI
05-M07007	500 ml	08033976234768

Packaging Recipiente primário: frasco em polietileno de alta densidade (PEHD). Capacidade útil 500 ml. Cor branca de recobrimento. Tampa em PEHD com selo de vedação total.

Rótulo em PVC resistente ao desgaste e à água, álcool, solventes. Tinta anti-riscos resistente à água e ao álcool.

Finalidade prevista Preparado para o processamento de amostras histológicas a examinar em microscopia ótica.

Aplicação Coloração do DNA.

Método

- 1) Secções em água
- 2) Hidrólise em ácido clorídrico 50% à temperatura ambiente, 40 minutos
- 3) Lave em água destilada
- 4) Reagente de Schiff Feulgen, 10 minutos
- 5) Tiosulfato de sódio 0,5%, 2 minutos (por três vezes)
- 6) Lave em água corrente, 10 minutos
- 7) Desidratação
- 8) Diafanização e bálsamo

Resultados ADN : vermelho púrpura

Componentes	CAS	EI	Index
Pararosanilina c.l. 42500	569-61-8	2092113	641-001-00-8
Ácido clorídrico 37%	7647-09-0	2145967	007-003-00-2
Metabisulfito de potássio	16731-02-9	2487963	-
Água desionizada			

Características funcionais A eventual coloração rosa da solução não prejudica a sua funcionalidade.

Advertências e precauções O produto destina-se à utilização profissional de laboratório para profissionais de saúde. O produto é classificado como perigoso.

Leia atentamente as informações contidas na etiqueta (símbolos de perigo, frases de risco e de segurança) e consulte sempre a ficha de segurança. Não utilize caso a embalagem primária esteja danificada.

É recomendável, em caso de incidente grave, de informar imediatamente a Bio-Optica Milano spa e as autoridades competentes.

Conservação	Conserve o preparado a 2-8°C. Mantenha as embalagens devidamente fechadas. A permanência por tempos prolongados em recipientes não perfeitamente fechados acelera a degradação do reagente.
Estabilidade	Após a primeira abertura, o reagente deve considerar-se válido e reutilizável até à data de validade indicada, desde que seja corretamente conservado. Validade do produto: 1 ano.
Eliminação	Resíduo perigoso; entregue-o a empresas especializadas e autorizadas, segundo a legislação vigente.
Bibliografia	-

REVISÃO Nº	MOTIVAÇÃO	DATA DE PUBLICAÇÃO
001	Conformidade com o Regulamento 746 IVOR	16/05/2022

Anexo XIX – Protocolo Coloração de Feugen Modificada

PROTOCOLO COLORAÇÃO FEULGEN MODIFICADA

- 1 – Hidratação das lâminas (1)
- 2 – Ácido Clorídrico 5 N – 10 min.
- 3 – Reagente de Shiff (cora o núcleo) – 45 min.
- 4 – Lavagem com Água corrente morna para ação do reagente de shiff– 3 min.
- 5 – Light green a 0.25% (cora o citoplasma) – 10 segundos
- 6 – Diferenciação Álcool a 96% x2
- 7 – Desidratação com Álcool 100% x2
- 8 – Clarificação/Diafanização – Xilol x2
- 9 – Montagem Automática com Mouting média Leica

Preparação das soluções

Ácido Clorídrico 5 N (Normalidade=Molaridade=1 mole=84 ml)

Logo 5 moles = 5 N - Significa 5X84 ml de HCL e completar até 1000 ml de Água destilada

420 ml e completa até 1000 ml de Água destilada

210 ml e completa até 500 ml de Água destilada

Reagente de Shiff

Pronto a usar da marca Biooptica

Light green a 0.25%

Verde Luz0.25 gr

Água Destilada100 ml

Resultados

Nucleos (DNA) – rosa

Citoplasma - verde

Legenda

(1) – As lâminas estavam fixadas em álcool a 96% (quer a citologia convencional que foi colocada diretamente quer a citologia em camada fina que foi processada e colocada em álcool a 96%).

Elaborado por Fátima Baptista

Anexo XX - Mounting media Leica® e equipamento montador de lâminas CV5030



[Produtos](#) ▾ [Ciências da Vida](#) ▾ [Formação](#) [Assistência](#) [Contacto](#)

[Início](#) • [Consumíveis de histologia](#) • [Mounting Media & Adhesives](#) • [Leica CV Mount](#)



Leica CV Mount

A solução CV Mount é adequada para todos os **dispositivos robóticos para colocação de lâminulas**, assim como para procedimentos de aplicação manual de lâminulas.

Este reagente para lâminulas não contém nenhum solvente orgânico perigoso.

Montador de Lâminas CV5030 - Leica



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Rua da Mãe de Deus
9500-321 Ponta Delgada
Açores, Portugal