

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

ANA CAROLINA SIAS FRANCO FRANZOSI

**EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO:
CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DE
ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL**

VITÓRIA - ES
2024

ANA CAROLINA SIAS FRANCO FRANZOSI

**EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO:
CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DE
ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito para o título de mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Letícia Nogueira da Gama de Souza.

VITÓRIA - ES
2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Se Sias Franco Franzosi, Ana Carolina, 1991-
EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO:
CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA E AVALIAÇÃO
DE ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL / Ana Carolina Sias
Franco Franzosi. - 2024.
39 f. : il.

Orientadora: Letícia Nogueira da Gama de Souza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Epidermólise Bolhosa. 2. Alterações Nucleares. 3. Aspectos
Citológicos. I. Nogueira da Gama de Souza, Letícia. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 616.314

ANA CAROLINA SIAS FRANCO FRANZOSI

**EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO: CARACTERIZAÇÃO
SOCIODEMOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas na área de concentração Etiopatogênese das doenças da boca

Aprovada em 26 de julho de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^a. Letícia Nogueira da Gama de Souza
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^ª. Dr^a. Karla Loureiro Almeida Coburn
Case Western Reserve University

Prof^ª. Dr^a. Flavia Imbroisi Valle
Universidade Federal do Espírito Santo





Documentos Defesa Ana Carolina Sias Fanco Franzosi

Data e Hora de Criação: 09/08/2024 às 16:06:16

Documentos que originaram esse envelope:

- Ata defesa Ana Carolina .pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)
- Folha de aprovação Ana Carolina.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: d483b6d00996a5163c96aa78c8ee2e56d71263c113ef3242baa470590715dc23

[SHA512]: 6acf70be0299e1673892448cdcb70ae175d7c30b8e2a91ff9578cf765bdec58d9740b5b14a62ee2d5669e3296e4bd79690248a6c6c7598cd120cc7bd68aeae92

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Flavia Imbroisi Valle (flavia.valle@ufes.br)

Data/Hora: 13/08/2024 - 14:46:12, IP: 200.137.65.109

[SHA256]: aa76a6263a2949af8fff6dfda5aa8776b14b981d8a2be3367c41f71908d09b4d



ASSINADO - Karla Loureiro Almeida Coburn (kxc775@case.edu)

Data/Hora: 09/08/2024 - 18:32:20, IP: 173.90.246.96, Geolocalização: [41.3732389, -81.360533]

[SHA256]: aafaf45b9391137c0e38c6419202136f77f96521bd073a3bbdfc98571e777158



ASSINADO - Leticia Nogueira Da Gama De Souza (leticia.souza@ufes.br)

Data/Hora: 09/08/2024 - 19:52:57, IP: 187.64.175.40

[SHA256]: 036f11419b169aef4b2cade00d6debd95ce11135a7a6ba9683f715c5397b007b

Histórico de eventos registrados neste envelope

13/08/2024 14:46:12 - Envelope finalizado por flavia.valle@ufes.br, IP 200.137.65.109

13/08/2024 14:46:12 - Assinatura realizada por flavia.valle@ufes.br, IP 200.137.65.109

12/08/2024 13:27:28 - Envelope visualizado por flavia.valle@ufes.br, IP 200.137.65.103

09/08/2024 19:52:57 - Assinatura realizada por leticia.souza@ufes.br, IP 187.64.175.40

09/08/2024 19:52:30 - Envelope visualizado por leticia.souza@ufes.br, IP 187.64.175.40

09/08/2024 18:32:20 - Assinatura realizada por kxc775@case.edu, IP 173.90.246.96

09/08/2024 18:32:12 - Envelope visualizado por kxc775@case.edu, IP 173.90.246.96

09/08/2024 16:07:03 - Envelope registrado na Blockchain por regina.sales@ufes.br, IP 187.36.174.6

09/08/2024 16:07:02 - Envelope encaminhado para assinaturas por regina.sales@ufes.br, IP 187.36.174.6

09/08/2024 16:06:17 - Envelope criado por regina.sales@ufes.br, IP 187.36.174.6

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EB	Epidermólise Bolhosa
EBS	Epidermólise Bolhosa Simples
EBD	Epidermólise Bolhosa Distrófica
EBDR	Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva
EBJ	Epidermólise Bolhosa Juncional
SK	Síndrome de Kindler
MEC	Matriz extracelular
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEc	Carcinoma de células escamosas cutâneo
MN	Micronúcleo
CR	Cariorrexe
CL	Cariólise
PN	Picnose
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES	Espírito Santo
FAESA	Faculdades Integradas Espírito Santenses
HEINSG	Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória
LBCDT	Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Tumorigênese
LHT	Laboratório Multiusuário de Histotécnicas
CCS	Centro de Ciências da Saúde
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
NaCl	Cloreto de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
DPX	Distrene Plastificante Xileno

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das camadas da pele associadas aos diferentes tipos de epidermólise bolhosa de acordo com o nível de clivagem da pele de acordo com Fine et al (2014).....	6
Figura 2 - Representação dos aspectos nucleares de esfregaços na mucosa oral segundo Bolognesi e colaboradores (2015).....	8
Figura 3 - Representação dos aspectos nucleares de esfregaços da mucosa jugal....	19
Figura 4 - Representação gráfica dos aspectos nucleares em pacientes EB e não EB.....	20
Figura 5 - Comparação intragrupo dos aspectos nucleares.....	22
Figura 6 - Comparação dos aspectos nucleares no grupo não EB x EBD+EBJ.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aspectos nucleares de acordo com os critérios descritos por Tolbert; Shy; Allen (1991)	8
Tabela 2 - Dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes EB.....	18
Tabela 3 - Quantificação dos aspectos nucleares de normalidade, citotoxicidade e mutagenicidade dos esfoliados orais da mucosa jugal nos grupos EB e não EB.....	21
Tabela 4 - Tabela dos casos com micronúcleo da amostra EB.....	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	6
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 RESULTADOS.....	11
3.1 ARTIGO.....	11
Resumo	12
Abstract.....	13
3.1.1 Introdução.....	14
3.1.2 Materiais e Métodos	15
3.1.2.1 Amostra	15
3.1.2.2 Coleta das células do epitélio oral.....	16
3.1.2.3 Análise do material coletado.....	17
3.1.2.4 Análise Estatística.....	18
3.1.3 Resultados	18
3.1.4 Discussão	23
3.1.5 Conclusão	26
Referências	27
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS GERAIS	31
APÊNDICE A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	33
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E DE ASSENTIMENTO.....	34
APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO.....	37
APÊNDICE D – FICHA DE LESÕES.....	38

APÊNDICE E – NORMAS DA REVISTA.....39

1 INTRODUÇÃO GERAL

A epidermólise bolhosa (EB) é uma doença mucocutânea rara, hereditária e caracterizada pela fragilidade da pele e membranas mucosas após leve trauma mecânico, resultando na formação contínua de bolhas (1). Os quatro principais tipos são EB simples (EBS), EB distrófica (EBD), EB juncional (EBJ) e síndrome de Kindler (SK), e mais de 30 subtipos foram reconhecidos, com base principalmente no plano de clivagem da pele (2), como mostra a Figura 1 (3).

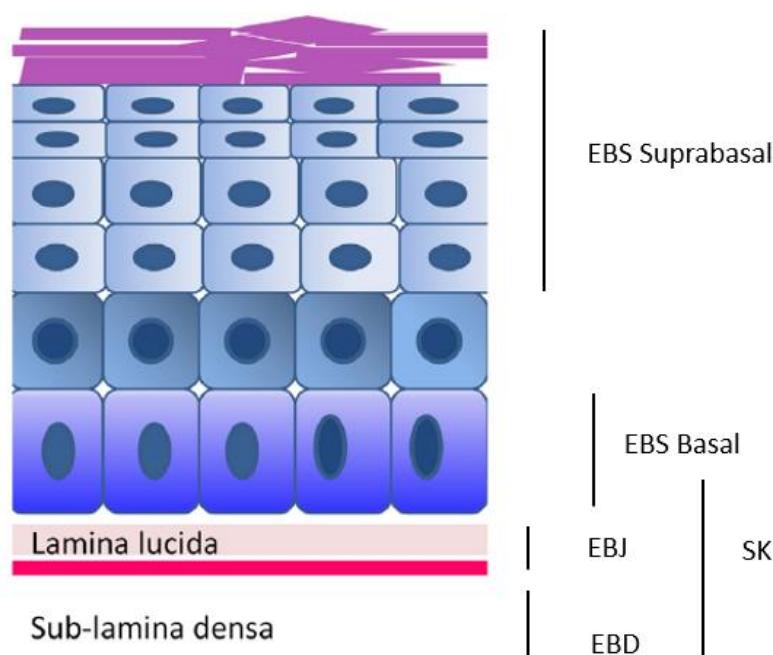


Fig 1. Representação das camadas da pele associadas aos diferentes tipos de epidermólise bolhosa de acordo com o nível de clivagem da pele. Na EB simples (EBS) suprabasal, as bolhas se formam nas camadas epidérmicas média/superior, dependendo de qual proteína está mutada. Na EBS basal, o plano de clivagem está dentro dos queratinócitos basais. Na EBJ, a separação ocorre dentro da lâmina lúcida, e na EBD, na região da sublâmina densa na derme superior. Na SK, a clivagem pode ocorrer dentro dos queratinócitos basais, ao nível da lâmina lúcida ou abaixo da lâmina densa de acordo com Fine et al., 2014 (3) (Figura e legenda modificadas pelo autor).

A EB tem ocorrência mundial, com distribuição igualitária entre sexo, raça e regiões geográficas (3). Cerca de 500.000 indivíduos vivem com a doença em todo o mundo, sendo a maioria crianças. A prevalência é de cerca de 11 casos por milhão de habitantes e a incidência é de aproximadamente 20 casos por milhão em nascidos vivos (5).

As formas mais graves da doença apresentam sinais clínicos considerados debilitantes, como mutilação de membros, inflamações, infecções recorrentes, dor

crônica e letalidade precoce (6). Diante da complexidade do tratamento e cuidado necessário para indivíduos EB, é imprescindível destacar a importância da abordagem multidisciplinar. Apesar dos desafios e riscos envolvidos no tratamento odontológico, o mesmo não deve ser negligenciado. Portanto, é fundamental que o profissional tenha conhecimento e extremo cuidado para evitar complicações, como traumas e ulcerações, o que envolve o estabelecimento de protocolos específicos (7).

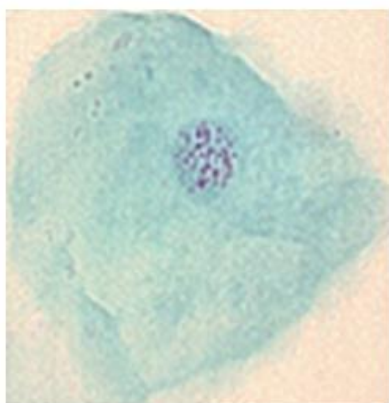
Os tecidos afetados e os fenótipos exibidos em indivíduos acometidos estão intimamente relacionados às proteínas específicas anormais e/ou ausentes, resultantes de mutações genéticas. No contexto específico da mucosa oral, qualquer subtipo de EB pode levar ao aparecimento de quatro lesões típicas, sendo elas eritema, úlceras, atrofia e bolhas. A extensão e gravidade podem variar de leve a extremamente grave (8,9). Em geral, as lesões da mucosa oral são vesiculobolhosas que variam de pequenas vesículas discretas a grandes bolhas. Essas lesões podem ser distribuídas em todas as superfícies mucosas. Os locais mais frequentes de formação na boca dos indivíduos com EB são a mucosa jugal, seguida da língua e dos lábios. O processo contínuo de formação da lesão, seguido de cicatrização recorrente, resulta em mudanças significativas na arquitetura oral. Com o tempo, o vestíbulo oral é obliterado por cicatrizes, adesão tecidual e comprometimento dos movimentos da língua. Anquiloglossia e microstomia, secundárias à cicatrização das comissuras, são frequentemente observadas. Outro aspecto é a superfície da língua tornando-se lisa e as papilas atrofiadas (10).

A forma de EB que apresenta maior risco de desenvolver o carcinoma de células escamosas (CCE), sem dúvidas, é a EBD recessiva generalizada grave (10). A maioria das lesões se desenvolve na superfície cutânea e até o momento, alguns poucos casos foram descritos na cavidade da boca. A língua foi o sítio mais frequente, embora tumores no lábio e no palato duro também tenham sido relatados (11).

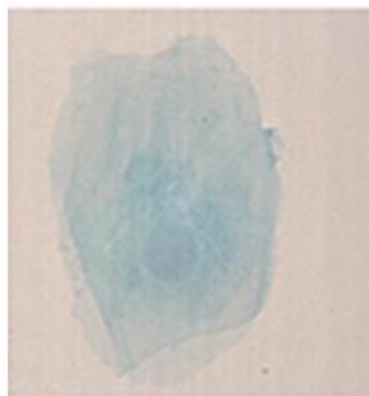
Diante do exposto, a análise de células obtidas a partir de esfoliados orais pode ser uma ferramenta de biomonitoramento no contexto da EB, pois as células são facilmente coletadas da boca por procedimentos não invasivos (12), além de produzir uma quantidade e qualidade suficiente de DNA (13). Dentre os aspectos nucleares viáveis para análise e interpretação, os fenótipos mais citados na literatura são cariorrexe (CR), cariólise (CL) e picnose (PN), bem como micronúcleo (MN), conforme mostra a Tabela 1 e a Figura 2 (14).

Tabela 1 - Aspectos nucleares de acordo com os critérios descritos por Tolbert; Shy; Allen (1991)

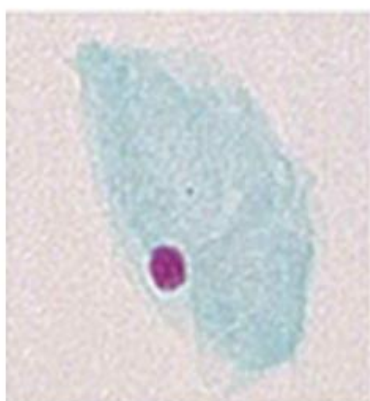
Aspecto Nuclear	Características Microscópicas
Cariorrexe	Desintegração nuclear envolvendo perda de integridade do núcleo
Cariólise	Dissolução nuclear
Picnose	Núcleos reduzidos
Micronúcleo	Corpos extranucleares compostos de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados aos núcleos filhos na mitose



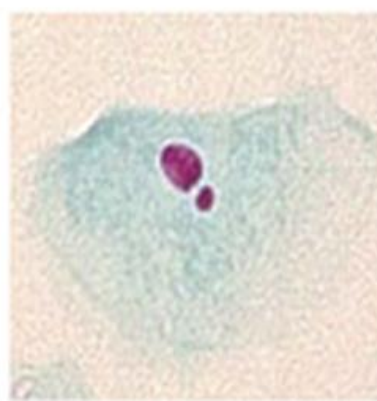
A) CARIORREXE



B) CARIÓLISE



C) PICNOSE



D) MICRONÚCLEO

Fig 2. Representação dos aspectos nucleares de esfregaços na mucosa oral. Em A, presença de cariorrexe, que é a fragmentação e dispersão do núcleo no citoplasma. Em B, kariólise, identificada pela digestão da cromatina do núcleo. Em C, picnose, caracterizada pelo núcleo reduzido e hiperchromático. Em D, presença de micronúcleo, que são pequenas massas de cromatina, com forma oval ou circular, localizadas próximas do núcleo segundo Bolognesi et al (2015) (14) (Legenda modificada pelo autor).

As anormalidades nucleares que caracterizam a citotoxicidade (CR, CL, PN) são importantes marcadores de morte celular. Já a identificação de células com MN pode indicar evento genotóxico, sendo o marcador de mutagenicidade mais utilizado (15). No estudo conduzido por Pinheiro e colaboradores (2016) (13), a técnica foi empregada na avaliação da mucosa nasal de estudantes da graduação expostos ao formaldeído durante as aulas de Anatomia Humana por cargas horárias diferentes. Os resultados indicaram que, mesmo por curto período, houve ação tóxica nas células epiteliais nasais. Similarmente, estudo de Lorenzoni et al. (2017) (16), revelou indução de mutagenicidade na mucosa oral pelo formaldeído em estudantes durante as aulas de Anatomia.

Há uma significativa necessidade de ampliar o empenho científico na compreensão dos mecanismos que envolvem o surgimento das manifestações clínicas da EB e que podem servir como base para o desenvolvimento de possíveis terapias. Além disso, a disponibilidade de ferramentas não invasivas, como a técnica do esfregaço da mucosa oral, representa opção viável e de baixo custo para análise e identificação de importantes alterações nucleares na mucosa oral, principalmente porque muitos pacientes são crianças ou jovens. Podemos destacar também a contribuição social, visto que a EB é considerada uma doença com morbidade e mortalidade consideráveis, interferindo de maneira relevante na qualidade de vida dos indivíduos.

Soma-se ao fato da literatura ainda ser escassa quanto às descrições microscópicas da mucosa oral em indivíduos que vivem com EB. Assim, este projeto teve como objetivo avaliar os aspectos nucleares de citotoxicidade e mutagenicidade a partir de esfregaços da mucosa jugal de residentes EB no Espírito Santo (ES). Até onde temos conhecimento, esse tipo de análise não foi empregado no contexto dessa doença rara, representando uma abordagem inédita e importante para diagnóstico precoce de alterações na mucosa oral nesse grupo de pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo epidemiológico e avaliar os aspectos nucleares de citotoxicidade e mutagenicidade a partir de esfregaços da mucosa jugal em indivíduos EB, independentemente do tipo e subtipo, residentes no ES.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento dos casos de EB no ES;
- Identificar e quantificar a frequência de micronúcleo em células epiteliais esfoliadas em áreas de mucosa jugal de pacientes EB e não EB (grupo controle) como critério de mutagenicidade;
- Identificar e quantificar a frequência do cariólise, cariorrexe e picnose em células epiteliais esfoliadas da região da mucosa jugal de pacientes EB e não EB (grupo controle) como critérios de citotoxicidade;
- Buscar associações entre os achados citológicos com os tipos/subtipos de EB;
- Criar um banco de dados da EB no ES, que possa servir como base epidemiológica para ações de promoção à saúde, com foco nas manifestações orais da doença.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO: Presença de eventos de citotoxicidade e mutagenicidade no epitélio oral em pacientes com Epidermólise Bolhosa¹

ÁREA TEMÁTICA: PATOLOGIA ORAL

Ana Carolina Sias Franco Franzosi^a, Lucas Fernandes Leal^b, Rosalie Matuk Fuentes Torrelío^c, Willian Grassi Bautz^d, Letícia Nogueira da Gama de Souza^e

^a Universidade Federal do Espírito Santo, Ufes, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900.

E-mail: anacarolinasfranco@hotmail.com

^b Faculdades Integradas Espírito Santenses (FAESA), Av. Jaír Etienne Dessaune, 110, Bento Ferreira, Vitória, ES, Brasil. CEP 29050-710.

E-mail: lucas.fernandes@faesa.br

^c Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Alameda Mari Ubirajara, 205, Santa Lúcia, Vitória, ES, Brasil. CEP 29056-030.

E-mail: rotorrelío@me.com

^d Universidade Federal do Espírito Santo, Ufes, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900.

E-mail: wgbautz@yahoo.com.br

^e Universidade Federal do Espírito Santo, Ufes, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900.

E-mail: leticia.souza@ufes.br

Autor de correspondência:

Letícia Nogueira da Gama de Souza

Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900.

E-mail: leticia.souza@ufes.br

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Brazilian Oral Research

Resumo

Introdução: A Epidermólise Bolhosa (EB) é uma doença genética grave, com formação contínua de bolhas na pele e mucosas, podendo apresentar alterações estruturais relevantes na boca. **Objetivo:** Analisar os aspectos nucleares de citotoxicidade e mutagenicidade obtidos a partir de esfoliados da mucosa jugal em pacientes EB. **Materiais e métodos:** Informações sociodemográficas e clínicas foram coletadas a partir de exame físico e questionário padronizado. Células da mucosa jugal foram obtidas a partir de esfoliados orais e avaliadas para determinação da frequência de micronúcleo, cariorrexe, cariólise e picnose. Os testes estatísticos utilizados foram Mann Whitney e Kruskal-Wallis. **Resultados:** 20 indivíduos EB foram selecionados e o grupo controle ($n=20$) foi pareado quanto ao sexo e idade com a amostra EB. Foi observada distribuição semelhante entre homens ($n=8$, 40%) e mulheres ($n=12$, 60%) e indivíduos com idade $\geq$ de 19 anos representaram a maioria ($n=13$, 65%). A análise quantitativa revelou que a maioria das células foi identificada como normal em ambos os grupos. Um número maior de cariorrexe ($p=0,0002$) e cariólise ($p<0,0001$) foi observado na amostra EB. Micronúcleos foram encontrados apenas nessa última. Na comparação entre pacientes não EB com os casos mais graves da doença, maior número de cariólise foi identificado na amostra EB ($p=0,0006$). **Conclusão:** Alterações nucleares de citotoxicidade foram mais frequentes no grupo EB. Já as relacionadas à mutagenicidade foram encontradas apenas neste grupo. Isso reforça a necessidade de constante acompanhamento médico-odontológico para evitar estabelecimento de quadros mais graves.

Palavras-chave: Epidermólise bolhosa; Citotoxicidade; Mutagenicidade; Mucosa oral.

Abstract

Introduction: Epidermolysis Bullosa (EB) is a severe genetic disease characterized by continuous blistering of the skin and mucous membranes, potentially presenting significant structural changes in the mouth. **Objective:** To analyze the nuclear aspects of cytotoxicity and mutagenicity obtained from exfoliated cells of the buccal mucosa in EB patients. **Materials and Methods:** Sociodemographic and clinical information were collected through physical examination and a standardized questionnaire. Buccal mucosa cells were obtained from oral exfoliations and evaluated to determine the frequency of micronuclei, karyorrhexis, karyolysis, and pyknosis. The statistical tests used were Mann-Whitney and Kruskal-Wallis. **Results:** 20 EB individuals were selected, and the control group ($n=20$) was matched for sex and age with the EB sample. A similar distribution was observed between men ($n=8$, 40%) and women ($n=12$, 60%), and individuals aged ≥ 19 years represented the majority ($n=13$, 65%). Quantitative analysis revealed that most cells were identified as normal in both groups. A higher number of karyorrhexis ($p=0.0002$) and karyolysis ($p<0.0001$) was observed in the EB sample. Micronuclei were found only in the latter group. When comparing non-EB patients with the most severe cases of the disease, a higher number of karyolysis was identified in the EB sample ($p=0.0006$). **Conclusion:** Nuclear alterations of cytotoxicity were more frequent in the EB group. Mutagenicity-related changes were found only in this group. This reinforces the need for constant medical and dental follow-up to prevent the establishment of more severe conditions.

Keywords: Epidermolysis Bullosa; Cytotoxicity; Mutagenicity; Oral mucosa.

3.1.1 Introdução

A Epidermólise bolhosa (EB) é uma doença genética caracterizada por bolhas e feridas resultantes da fricção na pele e mucosas, devido à ausência ou redução de proteínas que participam da adesão do epitélio ao conjuntivo (1). Além de bolhas, feridas abertas e cicatrizes, a EB pode produzir manifestações extracutâneas, incluindo anormalidades dos sistemas gastrointestinal, cardiovascular e geniturinário, bem como dos olhos e cavidade oral, e está associada ao aumento do risco de morte prematura (2).

Múltiplas mutações genéticas, que afetam proteínas responsáveis pela integridade da pele, incluindo queratinas (KRT5, KRT14), laminina-332 (LAMA3, LAMB3, LAMC2) e colágeno tipos VII e XVII (COL7A1, COL17A1) são relatadas como causadoras da doença (3). Essas mutações resultam em vários tipos e subtipos, classificados com base no plano de clivagem (4). Os quatro principais são EB simples (EBS), EB juncional (EBJ), EB distrófica (EBD) e Síndrome de Kindler (SK) (5).

As mutações nos genes envolvidos na patogênese da EB não alteram apenas a expressão de uma molécula específica da zona da membrana basal, mas também todo microambiente da matriz extracelular (MEC). Essas modificações apresentam consequências nos mecanismos de inflamação, cicatrização e fibrose, que favorecem o aumento de feridas e cronificação dessas, bem como possuem papel crucial no desenvolvimento de neoplasias como o carcinoma de células escamosas cutâneo (CCEc), sendo uma das principais causas de morte (6,7). Em relação à mucosa oral, alguns poucos casos de CCE foram descritos associados a EB, sendo a língua o sítio mais comum, com tumores no lábio e no palato duro também relatados (8).

A análise de aspectos citológicos, a partir de células epiteliais esfoliadas da mucosa oral, representa bom indicador para o estudo da extensão de danos ao DNA e detecção de transformações epiteliais, primeiramente pelo acesso facilitado ao tecido, como também a amostra coletada apresenta boa quantidade e qualidade de DNA (9). O exame citológico agrega benefícios à via diagnóstica, pois tem a capacidade de distinguir entre células benignas e malignas em referência às características morfológicas e celulares. Além disso, é uma técnica simples, rápida e não invasiva, bem aceita pelo paciente e que pode ser considerada uma modalidade promissora para fins de rastreamento em massa do câncer de boca (10). Os aspectos

citológicos geralmente analisados são presenças de micronúcleo (MN), cariorrexe (CR), cariólise (CL) e picnose (PN). O teste do MN é o mais largamente utilizado e indica mutagenicidade (11).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo analisar os aspectos nucleares de citotoxicidade e mutagenicidade obtidos a partir de esfoliados da mucosa jugal em pacientes que vivem com EB.

3.1.2 Materiais e Métodos

O delineamento da pesquisa caracterizou-se como um estudo clínico transversal prospectivo com amostra de conveniência, e foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki.

Este estudo foi desenvolvido junto ao Projeto Borboleta Azul da Faculdades Integradas Espírito Santenses (FAESA), projeto de extensão universitária que é o centro de referência odontológico para pacientes EB no Espírito Santo (ES), sob a coordenação do Prof. Lucas Fernandes Leal. Também foram convidados pacientes atendidos pela pesquisadora colaboradora Dra. Rosalie Torrelio no Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória (HEINSG, Vitória).

As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Tumorigênese (LBCDT) e no Laboratório Multiusuário de Histotécnicas (LHT) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do CCS-UFES – sob número do parecer 4.569.791.

3.1.2.1 Amostra

Participaram do estudo adultos e crianças, residentes no ES, diagnosticados com EB independentemente do tipo/subtipo. Ressaltamos que a análise do tecido oral desses pacientes já é parte da rotina de atendimento instituído no Projeto Borboleta Azul.

O grupo controle compreendeu indivíduos não EB, adultos e crianças, pareados em relação ao sexo e idade com a amostra EB, selecionados na Clínica de Interdisciplinaridade do Instituto de Odontologia da UFES (Vitória).

- Os critérios de inclusão adotados foram:

Grupo EB: pacientes com diagnóstico de EB independentemente do tipo/subtipo residentes no ES com ou sem lesões orais; assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e do Termo de Assentimento.

Grupo Controle: pacientes saudáveis; ausência de relato de doenças prévias e de uso contínuo de medicações; assinatura do TCLE e do Termo de Assentimento.

- Os critérios de exclusão adotados foram:

Pessoas com alguma doença de base, em uso contínuo de medicamentos e tabagistas.

Os dados sociodemográficos coletados foram: sexo, idade e hereditariedade (sendo esse último apenas para a amostra EB).

3.1.2.2 Coleta das células do epitélio oral

Para a coleta das amostras do epitélio oral, o participante ficou sentado em posição que varia de 70 a 90 graus na cadeira odontológica. Inicialmente foi realizado o exame clínico estomatológico para identificação de lesões orais e análise das características da EB.

Na sequência, foi realizada a coleta do material biológico conforme segue:

Anestesia da mucosa jugal com spray de xilocaína líquida a 10% (sendo borrifado de três a cinco vezes) e descartado após cinco segundos na cuspidadeira junto com a saliva; averiguação da sensibilidade das áreas anestesiadas com pinça de algodão de ponta romba e estéril; enxágue da boca com água para hidratar a mucosa e remover possíveis partículas presentes; escovado de uma região selecionada pelo pesquisador com o auxílio de escova tipo endocervical (Kolplast®) estéril (raspando a escova de forma gentil, porém firme).

O material biológico obtido foi acondicionado em tubo falcon com 1 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9% em água destilada). Para a fixação, foi adicionado 1 ml

de solução de metanol:ácido acético (3:1, v/v) com auxílio de pipeta Pasteur. Posteriormente, a solução resultante de cada coleta foi distribuída em 04 lâminas histológicas (500 microlitros/lâmina). Sob abrigo, as lâminas secaram por 24 horas ao ar livre e temperatura ambiente.

Para coloração, foi utilizada a técnica de Feulgen-Fast Green conforme descrito por Belien e Colaboradores (1995) (12), com pequenas modificações, como descrito a seguir: as lâminas foram imersas em solução de HCl 5N durante 15 minutos para hidrólise ácida das bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas; lavagem com água destilada por 15 minutos; imersão no reagente de Schiff (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) por 90 minutos. Após a remoção do reagente de Schiff, as lâminas foram mergulhadas no corante Fast Green 0,01% (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) durante 30 segundos; lavagem com água destilada; passagem por quatro baterias de álcool absoluto em sequência por 2 minutos em cada e três baterias de xilol (5 minutos em cada); e por fim, montagem das lâminas com DPX (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MI).

3.1.2.3 Análise do material coletado

As lâminas preparadas foram analisadas de forma cega e por um único investigador previamente calibrado. Para a leitura dos aspectos nucleares e aquisição de imagens, foi utilizado microscópio PrimoStar (Zeiss), com câmera digital acoplada Zeiss AxioCam ERC5s (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e programa de imagem Axio Vision 4.8 Release 4.8.2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) pertencentes ao LBCDT da UFES.

Com um aumento de 400X, um total de 1000 células epiteliais esfoliadas foram avaliadas diretamente no microscópio para determinação da frequência do MN (parâmetro de mutagenicidade) conforme Sarto e colaboradores (1987) (13), e de CL, CR e PN (parâmetros de citotoxicidade) de acordo com Tolbert; Shy; Allen (1992) (14).

Os critérios para inclusão da célula como normal na contagem final foram os seguintes: (1) citoplasma intacto e apresentando-se relativamente plano; (2) nenhuma ou pouca sobreposição às células adjacentes; (3) pouco ou nenhum debris; e (4) núcleo normal e intacto, com seu perímetro distinto e regular (14).

Já para caracterização da célula como micronucleada, os critérios descritos para célula normal estavam presentes, bem como identificação de micronúcleo com as seguintes características: (1) estrutura e intensidade de coloração da cromatina similar ou mais fraca que a do núcleo principal; (2) bordas distinguíveis, sugerindo a presença de membrana nuclear; (3) forma circular; e (4) incluído no mesmo citoplasma celular que o núcleo principal, o que significa estar no mesmo plano focal do núcleo principal. Acrescentam outras características importantes na caracterização do MN, como não estar sobreposto ou em contato com o núcleo principal, ser menor que 1/3 do diâmetro deste, além de possuir forma e coloração discernidas (14).

3.1.2.4 Análise Estatística

Para a análise quantitativa entre os grupos foi aplicado o teste Mann Whitney. Para comparação intragrupo foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Adotou-se nível de significância de 5%, com $p < 0,05$ indicando associação significativa entre as variáveis.

3.1.3 Resultados

Vinte indivíduos diagnosticados com EB foram selecionados. Em seguida foi definido o grupo controle ($n=20$), pareado quanto ao sexo e idade com a amostra EB.

Os dados sociodemográficos demonstraram distribuição semelhante da EB entre mulheres ($n=12$, 60%) e homens ($n=8$, 40%). Indivíduos com idade $\geq$ de 19 anos representaram a maioria ($n=13$, 65%). Quanto ao fator hereditário, 65% ($n=13$) relataram histórico familiar de EB, cinco (25%) eram os únicos com a doença e em um caso (5%) os genitores possuíam o gene, mas não a expressão da EB. A tabela 2 resume esses achados.

Tabela 2. Dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes EB

Voluntários	Sexo	Idade	Hereditariedade
01	Masculino	19 anos	Família com EB
02	Feminino	25 anos	Não sabe
03	Masculino	1 ano e 8 meses	Único com EB

04	Feminino	46 anos	Única com EB
05	Feminino	21 anos	Pais com gene, sem EB
06	Masculino	50 anos	Família com EB
07	Feminino	59 anos	Família com EB
08	Masculino	11 anos	Único com EB
09	Feminino	59 anos	Família com EB
10	Masculino	32 anos	Família com EB
11	Feminino	57 anos	Família com EB
12	Feminino	11 anos	Única com EB
13	Feminino	11 anos	Única com EB
14	Feminino	20 anos	Família com EB
15	Masculino	18 anos	Família com EB
16	Feminino	30 anos	Família com EB
17	Feminino	54 anos	Família com EB
18	Masculino	88 anos	Família com EB
19	Masculino	12 anos	Família com EB
20	Feminino	7 anos	Família com EB

Todos os aspectos nucleares foram identificados na amostra EB, conforme ilustra a Figura 3.

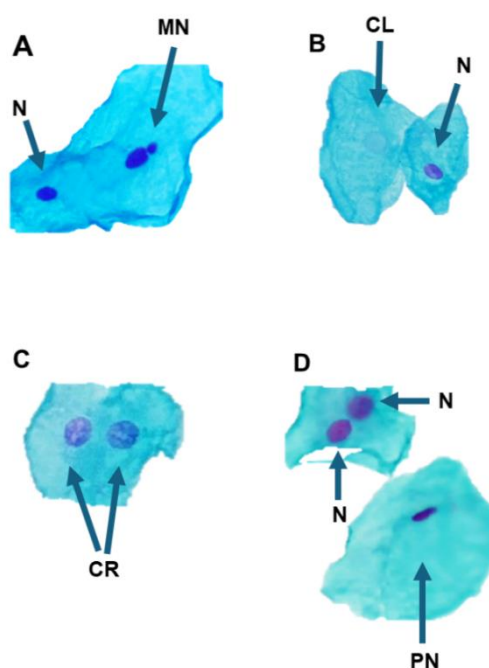


Fig. 3. Representação dos aspectos nucleares de esfregaços da mucosa jugal. Em A, a presença de célula normal (N) e micronucleada (MN). Em B, cariólise (CL) e célula normal (N). Em C, cariorrexe (CR). Em D, célula normal (N) e com picnose (PN). Aumento de 400x. Coloração pela técnica de Feulgen Fast-Green.

A análise quantitativa revelou que a maioria das células foi identificada como normal, sendo que o grupo controle apresentou maior número delas em relação ao EB (Figura 4, A. $p < 0,0001$). Já os achados de citotoxicidade mostraram que um número maior de CR (Figura 4, B. $p = 0,0002$) e CL (Figura 4, C. $p < 0,0001$) foi observado no grupo EB. Não houve diferença na PN entre as amostras (Figura 4, D. $p = 0,2336$).

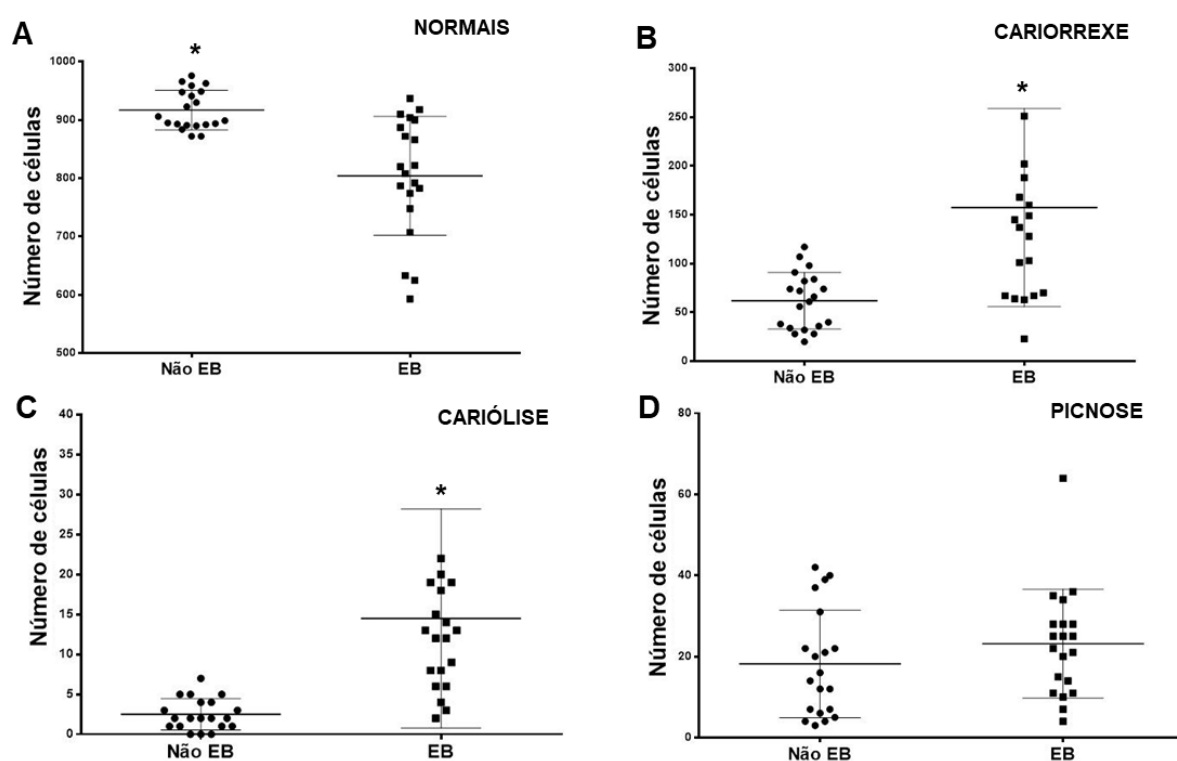


Fig 4. Representação gráfica dos aspectos nucleares em pacientes EB e não EB. Em A, maior número de células normais no grupo não EB ($p < 0,0001$; média=917,2; mediana=902,5; desvio padrão=33,82). B e C houve aumento do número de células com CR ($p = 0,0002$; média=157,4; mediana=141; desvio padrão=101,5) e CL ($p < 0,0001$; média=14,5; mediana=12,5; desvio padrão=13,71) respectivamente na amostra EB comparada a controle. O mesmo não foi detectado para PN (D) ($p = 0,2336$; média=23,15; mediana=23,5; desvio padrão=13,44). Teste realizado: Mann Whitney.

Ainda, células com MN foram encontradas apenas na amostra EB. A tabela 3 apresenta a quantificação de cada aspecto nuclear nos grupos EB e controle e a tabela 4 resume os aspectos clínicos e a quantidade de MN na amostra EB.

Tabela 3. Quantificação dos aspectos nucleares de normalidade, citotoxicidade e mutagenicidade dos esfoliados orais da mucosa jugal nos grupos EB e não EB

Voluntário	Normal		Picnose		Cariorrexe		Cariólise		Micronúcleo	
	EB	Não EB	EB	Não EB	EB	Não EB	EB	Não EB	EB	Não EB
01	937	930	25	12	23	56	14	2	1	0
02	904	976	10	4	67	20	19	0	0	0
03	918	966	11	4	63	28	8	2	0	0
04	808	872	28	7	145	117	19	4	0	0
05	774	941	7	20	202	38	12	1	0	0
06	820	872	28	42	128	82	22	4	2	0
07	866	895	20	37	101	66	13	2	0	0
08	593	963	14	7	380	28	13	2	0	0
09	900	890	34	14	64	91	2	5	0	0
10	887	949	36	16	67	34	8	1	2	0
11	748	892	25	3	160	98	67	7	0	0
12	625	948	15	12	342	40	18	0	0	0
13	633	894	22	22	339	74	6	5	0	0
14	783	891	64	22	149	84	3	3	1	0
15	707	923	35	40	251	32	6	5	1	0
16	787	899	21	39	188	61	4	1	0	0
17	822	959	28	5	137	36	12	0	1	0
18	910	884	11	6	70	107	9	3	0	0
19	872	906	4	21	103	72	20	1	1	0
20	792	893	25	31	168	74	15	2	0	0

Tabela 4. Tabela dos casos com micronúcleo da amostra EB

Voluntário	Sexo	Idade	Tipo de EB	Quantidade de micronúcleo
01	M	19	EBDR	1
06	M	50	EBS	2
10	M	32	EBS	2
14	F	25	EBDR	1
15	F	30	EBS	1

17	F	54	EBS	1
19	F	46	EBJ	1

Na análise intragrupo, considerando apenas os achados nucleares de citotoxicidade para a amostra controle e todos os parâmetros para a amostra EB, observamos que CR foi o aspecto nuclear encontrado em maior número (Figura 5, A. $p < 0,0001$ e Figura 5, B. $p < 0,0001$, controle e EB respectivamente).

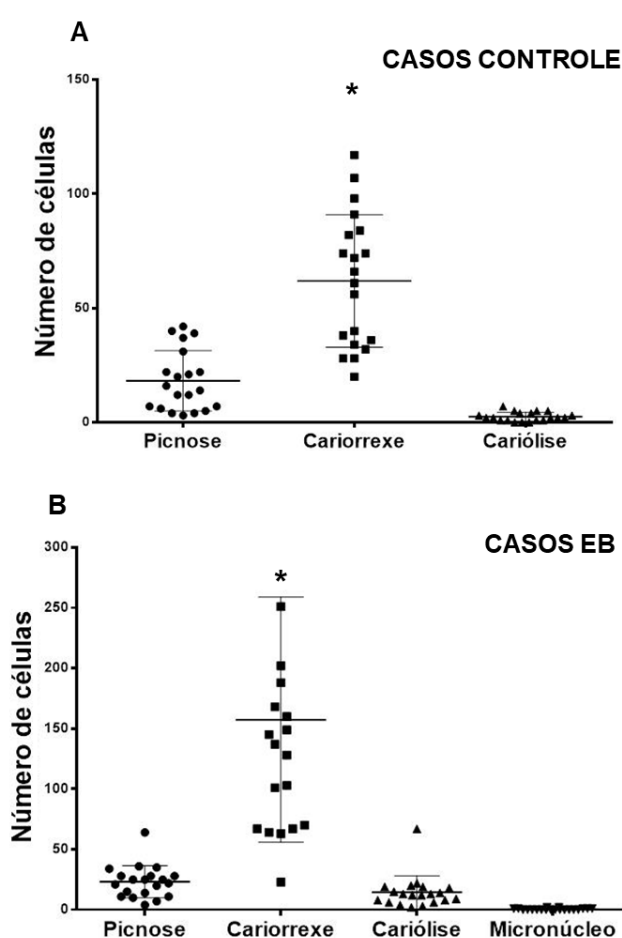


Fig 5. Comparação intragrupo dos aspectos nucleares. CR foi observado em maior frequência tanto no grupo controle (A, $p < 0,0001$), quanto no grupo EB (B, $p < 0,0001$). Teste realizado: Kruskal-Wallis. Casos controle: PN x CR: $p = 0,0044$, PN x CL: $p = 0,0012$, CR x CL: $p < 0,0001$. Casos EB: PN x CR: $p = 0,0079$, PN x CL: $p = 0,8952$, PN x MN: $p < 0,0001$, CR x CL: $p < 0,0001$, CR x MN: $p < 0,0001$, CL x MN: $p = 0,0039$. Casos controle: (PN: média: 18,2; mediana: 15,0; desvio padrão: 13,26), (CR: média: 61,90; mediana: 63,50; desvio padrão: 29,03), (CL: média: 2,50; mediana: 2,0; desvio padrão: 1,96). Casos EB: (PN: média: 23,15; mediana: 23,50; desvio padrão: 13,44), (CR: média: 157,4; mediana: 141,0; desvio padrão: 101,5), (CL: média: 14,50; mediana: 12,50; desvio padrão: 13,71), (MN: média: 0,45; mediana: 0; desvio padrão: 0,6863).

Por fim, ao compararmos o grupo não EB com apenas os casos mais graves (EBD+EBJ), observamos que o número de células normais foi maior no grupo controle (Figura 6, A. $p=0,0262$). Já a CL foi mais frequente na amostra EB (Figura 6, C. $p=0,0006$), seguido por CR e PN (Figura 6, B e D. Embora o valor de p tenha sido 0,0676 e 0,134 respectivamente). Os gráficos da figura 6 apresentam esses achados.

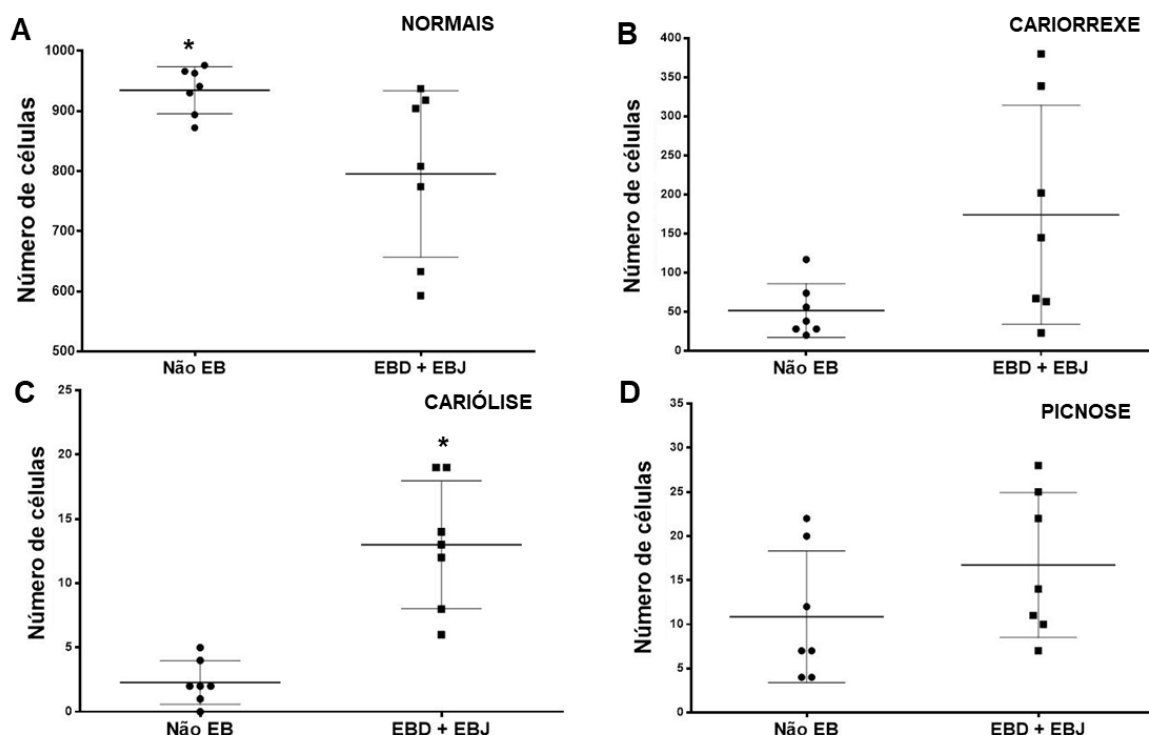


Fig 6. Comparação dos aspectos nucleares no grupo não EB x EBD+EBJ. Células normais foram mais frequentes no grupo controle (A, $p=0,0262$; média=934,6; mediana=941; desvio padrão=39,02). CL foi observada em maior frequência no grupo EB (C, $p=0,0006$; média=13; mediana=13; desvio padrão=4,967; B, $p=0,0676$; média=174,1; mediana=145; desvio padrão=140,2; D, $p=0,134$; média=16,71; mediana=14; desvio padrão=8,2 respectivamente). Teste realizado: Mann Whitney.

3.1.4 Discussão

A EB é uma doença rara, grave, com diferentes características clínicas, e que apesar dos avanços recentes nas pesquisas terapêuticas, ainda não possui cura. No contexto específico da mucosa oral, qualquer subtipo de EB pode levar ao aparecimento de quatro lesões típicas, sendo elas eritema, úlceras, atrofia e bolhas. A extensão e gravidade podem variar de leve a extremamente grave (15,16). A obtenção de células epiteliais da mucosa oral, a partir de esfoliados, representa

importante ferramenta para estudo da extensão de danos ao DNA e detecção de transformações epiteliais no contexto da EB já que a amostra apresenta boa quantidade e qualidade do material genético e é um procedimento não invasivo (17).

Nossos dados demonstraram que a EB possui distribuição semelhante entre os sexos, conforme já afirma a literatura (18). Em relação à faixa etária, a maioria da amostra se enquadrou no grupo de adultos com alguns casos de crianças, o que difere de outros levantamentos (5,19).

Quanto ao fator hereditário, a maioria relatou histórico familiar de EB. O que seria esperado, uma vez que, essa condição tem sua natureza hereditária e geneticamente determinada, conforme já evidenciado (20). Por outro lado, um quarto da amostra relatou ser os únicos afetados em suas linhagens familiares. Isso pode ser explicado por variação genética, em que casos raros de EB seriam resultantes de novas mutações espontâneas que ocorrem nas células reprodutoras ou nas primeiras células embrionárias (21).

No contexto das alterações macroscópicas que ocorrem na boca, o processo contínuo de formação de lesões, seguido de cicatrização recorrente, resulta em mudanças significativas na arquitetura oral. Com o tempo, o vestíbulo é obliterado por cicatrizes, adesão tecidual e comprometimento dos movimentos da língua. Anquiloglossia e microstomia, secundárias à cicatrização das comissuras, são frequentemente observadas. Outro aspecto é a superfície da língua tornando-se lisa e as papilas atrofiadas (22).

Na avaliação microscópica do epitélio da mucosa jugal, observamos maior frequência de células com cariorrexe e cariólise no grupo EB. A presença e intensificação dessas alterações sugerem danos celulares, o que poderia ser atribuído à formação recorrente de bolhas na cavidade oral, um achado bastante comum nesses indivíduos (23). Em contrapartida, as feridas crônicas surgem como consequência do processo de cicatrização deficiente e causam alterações estruturais e funcionais significativas, resultando em um processo inflamatório constante. O resultado é um microambiente favorável para o desenvolvimento de fibrose, que por sua vez realimenta a má cicatrização da ferida. Em conjunto, todas essas alterações podem favorecer o surgimento de desordens com potencial de malignização (24).

Especificamente sobre o teste do micronúcleo, o mesmo foi descrito para aplicação no biomonitoramento humano pela primeira vez a partir de células

esfoliadas da mucosa oral (25). Segundo os autores, esse teste poderia ser usado para o estudo de efeitos genotóxicos em todos os tecidos humanos, a partir de esfoliados. Corroborando com esses achados, Bloching e colaboradores (2000) (26), afirmaram que o micronúcleo nas células da mucosa oral é utilizado para estudar os efeitos pré-neoplásicos, coletando as células diretamente dos tecidos afetados. A ocorrência deles pode servir como um indicador de risco para o desenvolvimento de câncer no trato aerodigestivo superior, incluindo estágios pré-malignos, como a leucoplasia oral.

Nossa análise demonstrou que o grupo controle apresentou apenas achados nucleares relacionados à citotoxicidade, com predominância de cariorrexe. Já no grupo EB, além desses achados, foi detectada presença de células micronucleadas, aspecto largamente relacionado à eventos de mutagenicidade (27,28). Sabemos que a cariorrexe pode representar uma fase avançada de apoptose, embora essa associação ainda não esteja totalmente esclarecida. Já picnose e cariólise podem representar células mortas (27).

Por fim, ao compararmos o grupo não EB com os casos mais graves da doença (EBD+EBJ), observamos que a frequência de cariólise foi maior na amostra EB, sugerindo um estágio avançado de morte celular (27). Cariorrexe e picnose também estiveram presentes, embora sem diferenças estatísticas com o grupo controle. Um aspecto que requer atenção é que os pacientes que vivem com EBDR apresentam risco aumentado para desenvolvimento do CCE em idade muito mais jovem em comparação com pacientes não EB. A maioria das lesões se desenvolve na superfície cutânea. Até o momento, alguns poucos casos do CCE na cavidade da boca foram relatados associados a EB. A língua foi o sítio mais comumente descrito, embora tumores no lábio e no palato duro também tenham sido relatados na literatura (29). Outro aspecto é que a maioria das lesões aparece em locais de feridas crônicas com comportamento agressivo e invasivo e altas taxas de metástase (30).

Diante do exposto, podemos afirmar que as células da mucosa oral não apenas oferecem oportunidades para diagnóstico precoce, mas também fornecem um modelo único para pesquisa de mutações que permite correlacionar alterações genéticas com alterações histopatológicas (28).

Por ser uma doença rara e grave, e esse estudo ter se limitado a população de apenas um local, a amostra EB obtida foi de 20 voluntários. Entendemos que os

achados representam dados iniciais relevantes, mas que devem ser replicados em números maiores de casos, particularmente nas manifestações mais graves da doença. Sabemos que nesses últimos, as alterações da pele e mucosas envolvem processos recorrentes de inflamação, cicatrização e fibrose, favorecendo o desenvolvimento de neoplasias malignas em idades precoces.

3.1.5 Conclusão

As alterações nucleares em células epiteliais orais relacionadas à citotoxicidade foram mais frequentes no grupo EB e as de mutagenicidade foram encontradas apenas neste grupo. Isso reforça a necessidade de constante acompanhamento médico-odontológico desses pacientes para minimizar as possibilidades das lesões recorrentes evoluírem para casos graves, como o carcinoma.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de financiamento.

Declaração de interesse concorrente

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Projeto Borboleta Azul (FAESA), em especial o professor Lucas Fernandes Leal, ao Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória, representado pela médica Rosalie Matuk Fuentes Torrelio, à Universidade Federal do Espírito Santo e ao Laboratório Multiusuário de Histotécnicas (LHT) pelo

apoio durante as etapas clínicas desta pesquisa. Nosso sincero agradecimento às famílias que se solidarizaram em nos ajudar nas coletas dos pacientes EB, que mesmo mediante à tantas dificuldades, não mediram esforços para colaborarem com a pesquisa. Nossa gratidão também às técnicas Raquel Spinassé Dettogni e Viviane Coutinho Meneguzzi pelo auxílio nos processamentos histológicos.

Referências

- 1 Lucky A, Whalen J, Rowe S, Marathe K, Gorell E. Diagnosis and care of the newborn with epidermolysis bullosa. *Neoreviews* 2021; 22(7):e438-51.
- 2 Tabor A, Pergolizzi JV Jr, Marti G, Harmon J, Cohen B, Lequang JA. Raising awareness among healthcare providers about epidermolysis bullosa and advancing toward a cure. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2017; 10(5):36–48.
- 3 Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 70:1103–26.
- 4 Ma JE, Hand JL. What's new with common genetic skin disorders? *Minerva Pediatr*. 2017; 69(4):288–97.
- 5 Has C, Bauer JW, Bodemer C, Bolling MC, Bruckner-Tuderman L, Diem A, Fine JD, Heagerty A, Hovnanian A, Marincovick MP, Martinez AE, Mcgrath JA, Moss C, Murrell DF, Palisson F, Schwieger-Briel A, Sprecher E, Tamai K, Uitto J, Woodley DT, Zambruno G, Mellerio JE. Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol*. 2020 Oct; 183(4):614-27.
- 6 Condorelli A, Dellambra E, Logli E, Zambruno G, Castiglia D. Epidermolysis Bullosa-Associated Squamous Cell Carcinoma: From Pathogenesis to Therapeutic Perspectives. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20(22):5707.
- 7 De azevedo B, Roni G, Torrelío R, Gama-de-souza L. Fibrosis as a Risk Factor for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Systematic Review. *J Pediatr Genet*. 2023; 12(2):97-104.
- 8 Martinez L, Goodman P, Crow WN. Squamous cell carcinoma of the maxillary sinus and palate in epidermolysis bullosa: CT demonstration. *J Comput Assist Tomogr*. 1992; 16(2):317-9.
- 9 Borthakur G, Butryee C, Stacewicz-sapuntzakis M, Bowen P. Exfoliated Buccal Mucosa Cells as a Source of DNA to Study Oxidative Stress. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008; 17(1):212-18.

- 10 Haj-Hosseini N, Lindblad J, Hasséus B, Kumar V, Subramaniam N, Hirsh JM. Early detection of oral potentially malignant disorders: a review on prospective screening methods with regard to global challenges. *J Maxillofac Oral Surg.* 2022; 23(1):23-32.
- 11 Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research.* 1975; 31(1):9-15.
- 12 Beliën J, Copper M, Braakhuis BJ, Snow G B, Baak JP. Standardization of counting micronuclei, definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis.* 1995; 16(10):2395-2400.
- 13 Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987; 2(1):11-7.
- 14 Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992; 271(1):69-77.
- 15 Fortuna G, Lozada-Nur F, Pollio A, Aria M, Cepeda-Valdes R, Marinkovich M, Bruckner A, Salas-Alanís J. Patterns of oral mucosa lesions in patients with epidermolysis bullosa: comparison and agreement between oral medicine and dermatology. *J Oral Pathol Med.* 2013; 42(10):733-40.
- 16 Wright JT, Fine JD, Johnson LB. Oral soft tissues in hereditary epidermolysis bullosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71:440-6.
- 17 Borthakur G, Butryee C, Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE. Exfoliated Buccal Mucosa Cells as a Source of DNA to Study Oxidative Stress. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2008; 17(1):212-8.
- 18 Fine JD. Epidemiology of inherited Epidermolysis Bullosa based on incidence and prevalence estimates from the national Epidermolysis Bullosa registry. *JAMA Dermatol.* 2016; 152(11):1231-8.
- 19 Uitto J, Bruckner-Tuderman L, Christiano AM, McGrath JA, Has C, South A P, Robinson EC. Progress toward treatment and cure of epidermolysis bullosa: Summary of the DEBRA International Research Symposium EB 2015. *Journal of Investigative Dermatology.* 2016; 136(2): 352-8.
- 20 Bardhan A, Bruckner-Tuderman L, Chapple IL, Fine JD, Harper N, Has C, Magin TM, Marinkovich MP, Marshall JF, Mcgrath JA, Mellerio JE, Polson R, Heagerty AH. Epidermolysis Bullosa. *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Sep; 6(1):78.
- 21 Uitto J, Vahidnezhad H, Youssefian L. Genotypic heterogeneity and the mode of inheritance in Epidermolysis Bullosa. *Jama Dermatol.* 2016; 152(5):517-20.
- 22 Wright JT. Oral Manifestations in the Epidermolysis Bullosa Spectrum. *Clin Dermatol.* 2010; 28(1):159-64.

- 23 Feijoo JF, Bugallo J, Limeres J, Penarrocha D, Penarrocha M, Diz P. Inherited epidermolysis bullosa an update and suggested dental care considerations. *J Am Dent Assoc.* 2011; 142:1017–25.
- 24 Cianfarani F, Zambruno G, Castiglia D, Odorisio T. Pathomechanisms of altered wound healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Am J Pathol.* 2017; 187(7):1445-53.
- 25 Stich H, Curtis J, Parida B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer.* 1982; 30(5):553-9.
- 26 Bloching M, Hofmann A, Lautenschlager C, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncol.* 2000; 36:550-5.
- 27 Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna M, Nava A, Flores-Gracia A, Ramos-Ibarra M. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Disease markers.* 2014; 2014(7):1-15.
- 28 Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke, GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cells mutations and their association with cancer – A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1061-77.
- 29 Martinez L, Goodman P, Crow WN. Squamous cell carcinoma of the maxillary sinus and plaque in epidermolysis bullosa: CT demonstration. *J Comput Assist Tomogr.* 1992; 16:317-9.
- 30 Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Li KP, Suchindran C. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: the National EB Registry experience, 1986-2006. *JAMA Dermatology.* 2009; 60(2):203-11.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Células com aspectos de citotoxicidade foram mais frequentes em indivíduos EB e, dessas alterações, a mais encontrada foi a cariorrexe. Micronúcleos foram identificados exclusivamente na amostra EB. Consideramos que todos esses achados podem servir como biomarcadores de eventos celulares para monitoramento em pacientes EB, uma vez que a obtenção de esfregaços ocorre por procedimentos pouco invasivos e que oferecem boa qualidade e quantidade de DNA, principalmente para rastreamento de desordens potencialmente malignas.

REFERÊNCIAS GERAIS

- 1 Fortuna G, Aria M, Cepeda-Valdes R, Pollio A, Moreno-Trevino M, Salas-Alan J. Clinical features of gingival lesions in patients with dystrophic epidermolysis bullosa: a cross-sectional study. *Aust Dent J*. 2015; 60(1):18–23.
- 2 Bardhan A, Bruckner-Tuderman L, Chapple IL, Fine JD, Harper N, Has C, Magin TM, Marinkovich MP, Marshall JF, Mcgrath JA, Mellerio JE, Polson R, Heagerty AH. Epidermolysis Bullosa. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Sep; 6(1):78.
- 3 Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 70:1103–26.
- 4 Fine JD. Epidemiology of inherited Epidermolysis Bullosa based on incidence and prevalence estimates from the national Epidermolysis Bullosa registry. *JAMA Dermatol*. 2016; 152(11):1231-38.
- 5 Wu Y, Sun F, Lee P. Family caregivers' lived experiences of caring for epidermolysis bullosa patients: A phenomenological study. *J Clin Nurs*. 2020; 29(9-10):1552-60.
- 6 Mariath L, Santin J, Schuler-Faccini L, Kiszewski A. Inherited epidermolysis bullosa: update on the clinical and genetic aspects. *An Bras Dermatol*. 2020; 95(5):551-69.
- 7 Oliveira T, Sakai VT, Candido LA, Silva S, Machado MA. Clinical management for epidermolysis bullosa dystrophica. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(1):81-5.
- 8 Fortuna G, Lozada-Nur F, Pollio A, Aria M, Cepeda-Valdes R, Marinkovich MP, Bruckner AL, Salas-Alanís JC. Patterns of oral mucosa lesions in patients with epidermolysis bullosa: comparison and agreement between oral medicine and dermatology. *J Oral Pathol Med*. 2013; 42(10):733-40.
- 9 Wright JT, Belas JD, Johnson LB. Oral Soft Tissues in Hereditary Epidermolysis Bullosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991; 71(4):440-6.
- 10 Wright JT. Oral Manifestations in the Epidermolysis Bullosa Spectrum. *Clin Dermatol*. 2010; 28(1):159-64.
- 11 Martinez L, Goodman P, Crow WN. Squamous cell carcinoma of the maxillary sinus and plaque in epidermolysis bullosa: CT demonstration. *J Comput Assist Tomogr*. 1992; 16:317-9.
- 12 Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*. 1999; 428(1-2):271-83.
- 13 Pinheiro L, Nascimento H, Menegardo C, Gerhardt R, Lorenzoni D, Gama-De-Souza L. Nuclear alterations in nasal mucosa epithelial cells of students exposed to formaldehyde. *Med. segur. trab*. 2016; 62(242):4-14.

- 14 Bolognesi C, Roggieri P, Ropolo M, Thomas P, Hor M, Fenech M, Nersesyan A, Knasmueller D. Buccal micronucleus cytome assay: results of na intra and inter laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*. 2015; 30(4): 545-55.
- 15 Wunnapak K, Ruangyuttikarn W, Anusri Y, Prapamontol T. Increase in epithelial buccal cell micronuclei in students exposed to embalming solution vapour. *Chiang Mai Med J*. 2008; 47(3): 115–23.
- 16 Lorenzoni DC, Pinheiro LP, Nascimento HS, Menegardo CS, Silva RG, Bautz WG, Henriques JF, Almeida-Coburn KL, da Gama-de-Souza LN. Could formaldehyde induce mutagenic and cytotoxic effects in buccal epithelial cells during anatomy classes? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017; 22(1):e58-63.

APÊNDICE A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: LEVANTAMENTO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL E SALIVA ASSOCIADAS A EPIDERMÓLISE BOLHOSA RESIDENTES NO ESPÍRITO SANTO

Pesquisador: Leticia Nogueira da Gama de Souza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 41764921.4.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.569.791

Apresentação do Projeto:

Este estudo é um estudo clínico transversal prospectivo com uma amostra que será de adultos e crianças diagnosticados com EB a partir dos serviços vinculados ao Projeto Borboleta Azul da Faculdade Integradas Espírito Santenses (FAESA) sob a coordenação do Prof. Dr. Lucas Fernandes Leal. Serão coletados dados demográficos, socioeconômicos, diagnósticos, de práticas de cuidado e dos impactos da doença. A amostra será composta por pacientes que vivem com EB e que apresentam manifestações orais, e que são regularmente atendidos na Clínica Odontológica da Faesa. Além do diagnóstico clínico das lesões na mucosa, será feita a análise histopatológica e imuno-histoquímica para diferentes biomarcadores com potencial de envolvimento na patogênese. Em relação à saliva, serão analisados a taxa de fluxo salivar, pH, biomarcadores. Como controles serão utilizadas amostras normais de pele humana obtidas a partir de cadáveres do Setor de Anatomia da UFES. Imagens serão obtidas com câmera digital acoplada a microscópio de luz. A expressão das moléculas poderá ocorrer de forma qualitativa ou quantitativa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar amplo estudo dos pacientes do ES que vivem com EB e apresentem manifestações orais

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: SN
UF: ES
Município: VITÓRIA
Telefone: (27)3335-7211
CEP: 29.040-091
E-mail: cep.ufes@hotmail.com

Página 01 de 03

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 4.569.791

com levantamento de dados sociodemográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Também serão realizadas análises da expressão de diferentes moléculas potencialmente envolvidas na sua patogênese e aspectos relacionados à saliva.

Objetivo Secundário:

a) Coletar dados demográficos, socioeconômicos e clínicos dos pacientes com EB;

b) Realizar análise microscópica em amostras de lesões da mucosa oral processadas com a técnica de hematoxilina e eosina;

c) Analisar a expressão da cadeia gama-2 da laminina-332, MMP-9, Ki-67, VEGF, COL-4,6,7 e 17, integrina $\alpha 6 \beta 4$, MMP 7, 9 e 13, SMADs, α -SMA de miofibroblastos, citoqueratinas e desmogleínas em amostras de lesões orais benignas e malignas da mucosa oral;

d) Correlacionar a expressão do biomarcador com a progressão tumoral em CCE oral; e) Criar um banco de dados da EB no ES, que possa servir como base epidemiológica para ações de promoção à saúde;

f) Comparar os padrões de expressão das moléculas em lesões de CCE de pacientes EB e pacientes não EB;

g) Analisar componentes salivares para identificação das alterações de sua composição, pH e fluxo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esta pesquisa apresenta um risco pequeno aos participantes, uma vez que você pode se sentir cansado ao longo da pesquisa, o que tentaremos diminuir ao máximo conforme o seu desejo e sugestão. Durante a realização da consulta e coleta de saliva você poderá sentir dor, que será minimizada através da utilização de um spray anestésico antes da realização do exame e poderá desenvolver bolhas, que será prevenida com um tratamento cuidadoso. Nos procedimentos cirúrgicos, caso haja necessidade, há o risco de formação de bolhas que serão minimizados com a realização de cortes firmes e seguros como forma de prevenção e com aplicação do anestésico de forma lenta e profunda. Você poderá sentir dor após o procedimento, mas será prescrito um remédio para amenizar a dor. Há um risco de quebra de sigilo por parte dos pesquisadores da pesquisa, que serão minimizados através da assinatura do termo de sigilo e confidencialidade por parte dos mesmos.

Benefícios:

Um grande benefício será a possibilidade de saber o real número de casos de Epidermólise

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: SN
UF: ES
Município: VITÓRIA
Telefone: (27)3335-7211
CEP: 29.040-091
E-mail: cep.ufes@hotmail.com

Página 02 de 03

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 4.569.791

Bolhosa e fornecer informações para os pacientes e familiares para que todos possam entender, prevenir ou aliviar os diversos problemas que afetam o bem-estar das pessoas envolvidas com a Epidermólise Bolhosa. Buscaremos também treinar os pacientes e responsáveis, nos cuidados corretos com as lesões e a higiene oral. Ainda, esperamos conseguir informações que poderão ajudar a entender como ocorre o processo de formação do câncer em pacientes com Epidermólise Bolhosa, e poderemos propor a criação de terapias mais eficazes voltadas para prevenção e tratamento nesse grupo.

Riscos e benefícios atendem a resolução 466/2012

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: apresentada e adequada

- Projeto detalhado: apresentado e adequado

- Riscos e benefícios apresentados e adequados

- TCLE: apresentado e adequado- Termo de assentimento

- apresentado e adequado- Termo de Sigilo e Confidencialidade: dispensado

- Termos de anuências da instituições onde a pesquisa será realizada: apresentado e adequada.

- Cronograma: apresentado e adequado

- Orçamento: apresentado e adequado

- Biorrepositório - apresentado e adequado

- Ata com aprovação do Biorrepositório - apresentada e adequada

Recomendações:

Toda pesquisa deve seguir a resolução 466/2012 do CNS para conferência utilize o manual de pendências contido no site do CEP - <http://www.ccs.ufes.br/cep>

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: SN
UF: ES
Município: VITÓRIA
Telefone: (27)3335-7211
CEP: 29.040-091
E-mail: cep.ufes@hotmail.com

Página 03 de 03

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 4.569.791

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P	01/03/2021	16:51:59		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P	01/03/2021	16:49:37		Aceito
Outros	Termo_Faesa.pdf	01/03/2021	16:47:49	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Outros	Carta_Resposta3.pdf	01/03/2021	16:45:07	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Outros	Carta_resposta2.pdf	27/02/2021	15:01:22	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento2.pdf	27/02/2021	14:58:48	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2.pdf	27/02/2021	14:58:35	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado2.pdf	27/02/2021	14:58:12	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Declaração de concordância	Declaração_Faesa.pdf	06/01/2021	13:35:42	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Outros	Ata_biorrepositorio.pdf	06/01/2021	13:32:58	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	06/01/2021	13:28:33	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biotanco	Regulamento_biorrepositorio.pdf	29/10/2020	11:06:44	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	29/10/2020	10:59:56	Leticia Nogueira da Gama de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: SN
UF: ES
Município: VITÓRIA
Telefone: (27)3335-7211
CEP: 29.040-091
E-mail: cep.ufes@hotmail.com

Página 04 de 03

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 4.559.791

VITÓRIA, 02 de Março de 2021

Assinado por:
Maria Helena Monteiro de Barros Miotto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: SN CEP: 29.040-091
UF: ES Município: VITÓRIA
Telefone: (27)3335-7211 E-mail: cep.ufes@hotmail.com

Página 01 de 05

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E DE ASSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Sr(a) _____, (ou seu responsável legal) _____, está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa chamada "EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO: CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA, AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL", sob a responsabilidade da pesquisadora Ana Carolina Sias Franco Franzosi e sob a coordenação professora Leticia Nogueira da Gama de Souza.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A Epidermólise Bolhosa é uma doença que faz com que apareçam bolhas na pele causadas por qualquer contato e que dependendo do tipo pode causar muitos problemas de saúde, prejudicando muito o bem-estar das pessoas com essa doença. Esta pesquisa é importante porque irá trazer informações sobre a Epidermólise Bolhosa no estado em que você mora, porque ainda não temos essas informações e ela poderá ajudar os governantes a tomarem decisões que poderão auxiliar no tratamento. Ela também ajudará a entender como divulgar as informações sobre os cuidados com higiene oral, bolhas e feridas para poder melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Esse estudo vai ajudar os pesquisadores a entender melhor como surgem os diversos problemas na boca causados pela Epidermólise Bolhosa. A pesquisa terá pessoas que vivem com Epidermólise Bolhosa e pessoas que não tem. Isso é importante, pois nos ajudará a entender como a de Epidermólise Bolhosa pode influenciar nas mudanças que acontecem na boca.

OBJETIVO DA PESQUISA

Realizar um grande estudo da Epidermólise Bolhosa com os pacientes e seus parentes sobre suas condições de vida e sobre sua saúde oral. Iremos também melhorar as formas como agir com os pacientes, e estudar as feridas que surgem na boca e suas características, e as possíveis mudanças no epitélio oral a partir da coleta de esfregaços na mucosa oral. Também utilizaremos equipamentos para avaliar a relação de estruturas da mucosa e o desenvolvimento de bolhas, feridas e até problemas mais sérios, como o câncer.

PROCEDIMENTO

Para os participantes que vivem com Epidermólise Bolhosa, será feita uma entrevista com você e seu responsável (quem cuida de você) no ambulatório em que você se consulta e serão feitas algumas perguntas sobre sua vida e a Epidermólise Bolhosa. Os encontros acontecerão sempre nos mesmos dias em que você vai se consultar. É bom lembrar que não serão feitos procedimentos adicionais aos quais já se farão necessários para seu tratamento. Toda a amostra analisada será aquela obtida pelo profissional responsável pelo tratamento, sem intervenção de outros dentistas. Essa parte da pesquisa será realizada em amostras de pacientes com e sem Epidermólise Bolhosa. Serão feitas análises das amostras de tecido coletadas por meio da análise em microscópio. As análises serão realizadas no Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento e Tumorigênese e; no Laboratório Multiusuário de Histotécnicas, que são coordenados pela Profa. Dra. Leticia Nogueira da Gama de Souza. É importante lembrar que não ocorrerão procedimentos cirúrgicos ou qualquer tipo de intervenção.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa será desenvolvida em conjunto com Projeto Borboleta Azul da Faculdades Integradas Espírito Santenses (FAESA) e do Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSIG). Os procedimentos realizados terão a duração de aproximadamente 01h. Os laboratórios de pesquisa serão o Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Tumorigênese e o Laboratório Multiusuário de Histotécnicas, localizados no Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

RISCO E DESCONFORTOS

Esta pesquisa apresenta risco mínimo aos participantes, uma vez que os mesmos podem se sentir cansados ao longo da aplicação dos instrumentos da pesquisa, que tentaremos minimizá-los ao máximo conforme desejo e sugestão do participante. Durante a realização do exame clínico e realização do esfregaço você poderá sentir dor, que será minimizada através da utilização de um spray anestésico de lidocaína a 10% previamente ao exame e poderá desenvolver bolhas, que será prevenida com uma manipulação cuidadosa. Há um risco de quebra de sigilo por parte dos pesquisadores da pesquisa, que serão minimizados através da assinatura do termo de sigilo e confidencialidade por parte dos mesmos.

BENEFÍCIOS

Um grande benefício será a possibilidade de saber o real número de casos de Epidermólise Bolhosa e fornecer informações para os pacientes e familiares para que todos possam entender, prevenir ou aliviar os diversos problemas que afetam o bem-estar das pessoas envolvidas com a Epidermólise Bolhosa. Buscaremos também treinar os pacientes e responsáveis, nos cuidados corretos com as lesões e a higiene oral. Ainda, esperamos conseguir informações que poderão ajudar a entender o processo de mutagenicidade em pacientes com Epidermólise Bolhosa, e poderemos propor a criação de terapias mais eficazes voltadas para prevenção e tratamento nesse grupo.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Você participará deste estudo, por sua própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa, que não envolve remuneração. Você será acompanhado durante toda a duração da pesquisa pela equipe que compõe o projeto e será assistido pela equipe médica/odontológica que o acompanha nas consultas caso ocorra alguma intercorrência durante os atendimentos.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

Você não é obrigado (a) a participar da pesquisa, podendo deixar de participar dela em qualquer momento que desejar, sem que haja penalidades ou prejuízos por causa disso. Caso decida retirar seu consentimento, você não será mais contatado (a) pelos pesquisadores.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Os pesquisadores se comprometem a preservar sua identidade durante todas as fases da pesquisa, inclusive após publicação, mediante a assinatura do termo de sigilo e confidencialidade.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO FINANCEIRO

A princípio, a realização dos procedimentos da pesquisa não promoverá despesas financeiras aos participantes, tendo em vista que os encontros presenciais acontecerão nos mesmos dias em que os pacientes já vão se consultar com o médico

que o acompanha, mas a você será garantido o ressarcimento com eventual despesa para participação na pesquisa.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

O participante tem direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa por parte do pesquisador responsável.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, o(a) Sr.(a) pode contatar as pesquisadoras Ana Carolina Sias Franco Franzosi no telefone (27) 999882868, no endereço Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe. Centro de Ciências da Saúde, Vitória, ES, Brasil. CEP 29.040-090 e Leticia Nogueira da Gama de Souza no telefone (27) 988482454, no endereço Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe. Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES, Brasil. CEP 29.040-090. O(A) Sr.(a) também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES) através do telefone (27) 3335-7211, email cep.ufes@hotmail.com ou correio: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Prédio Administrativo do CCS, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP 29.040-090, Vitória - ES, Brasil. O CEP/CCS/UFES tem a função de analisar projetos de pesquisa visando à proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h. Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pelo(a) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

Vitória, __/__/__

Participante da pesquisa/Responsável legal

Na qualidade de pesquisadora da pesquisa "EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO: CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA, AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL", eu, Ana Carolina Sias Franco Franzosi, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Ana Carolina Sias Franco Franzosi

Na qualidade de pesquisador responsável pela pesquisa "EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO: CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA, AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL", eu, Leticia Nogueira da Gama de Souza, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Leticia Nogueira da Gama de Souza

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa chamada "EPIDERMÓLISE BOLHOSA NO ESPÍRITO SANTO: CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA, AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA MUCOSA ORAL", sob a responsabilidade da pesquisadora Ana Carolina Sias Franco Franzosi e sob a coordenação professora Leticia Nogueira da Gama de Souza.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A Epidermólise Bolhosa é uma doença que faz com que apareçam bolhas na pele causadas por qualquer contato e que dependendo do tipo pode causar muitos problemas de saúde, prejudicando muito o bem-estar das pessoas com essa doença. Esta pesquisa é importante porque irá trazer informações sobre a Epidermólise Bolhosa no estado em que você mora, porque ainda não temos essas informações e ela poderá ajudar os governantes a tomarem decisões que poderão auxiliar no tratamento. Ela também ajudará a entender como divulgar as informações sobre os cuidados com higiene oral, bolhas e feridas para poder melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Esse estudo vai ajudar os pesquisadores a entender melhor como surgem os diversos problemas na boca causados pela Epidermólise Bolhosa. A pesquisa terá pessoas que vivem com Epidermólise Bolhosa e pessoas que não tem. Isso é importante, pois nos ajudará a entender como a de Epidermólise Bolhosa pode influenciar nas mudanças que acontecem na boca.

OBJETIVO DA PESQUISA

Realizar um grande estudo da Epidermólise Bolhosa com os pacientes e seus parentes sobre suas condições de vida e sobre sua saúde oral. Iremos também melhorar as formas como agir com os pacientes, e estudar as feridas que surgem na boca e suas características, e as possíveis mudanças no epitélio oral a partir da coleta de esfregaços na mucosa oral. Também utilizaremos equipamentos para avaliar a relação de estruturas da mucosa e o desenvolvimento de bolhas, feridas e até problemas mais sérios, como o câncer.

PROCEDIMENTO

Será feita uma entrevista com você e seu responsável (quem cuida de você) no ambulatório em que você se consulta e serão feitas algumas perguntas sobre sua vida e a Epidermólise Bolhosa. Os encontros acontecerão sempre nos mesmos dias em

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Você participará deste estudo, por sua própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa, que não envolve remuneração. Você será acompanhado durante toda a duração da pesquisa pela equipe que compõe o projeto e será assistido pela equipe médica/odontológica que o acompanha nas consultas caso ocorra alguma intercorrência durante os atendimentos.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

Você é quem decide se quer ou não participar da pesquisa, e caso em algum momento não queira mais participar, você poderá deixá-la, sem nenhum problema.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Os pesquisadores se comprometem a preservar sua identidade durante toda a pesquisa.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

O participante tem direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa por parte do pesquisador responsável.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, o(a) Sr(a) pode contatar as pesquisadoras Ana Carolina Sias Franco Franzosi no telefone (27) 999882868, no endereço Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe. Centro de Ciências da Saúde, Vitória, ES. Brasil. CEP 29.040-090 e Leticia Nogueira da Gama de Souza no telefone (27) 988482454, no endereço Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe. Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES. Brasil. CEP 29.040-090. O(A) Sr(a) também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES) através do telefone (27) 3335-7211, email cep.ufes@hotmail.com ou correio: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Prédio Administrativo do CCS, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP 29.040-090, Vitória - ES, Brasil. O CEP/CCS/UFES tem a função de analisar projetos de pesquisa visando à proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e

que você vai se consultar. É bom lembrar que não serão feitos procedimentos adicionais aos quais já se farão necessários para seu tratamento. Toda a amostra analisada será aquela obtida pelo profissional responsável pelo tratamento, sem intervenção de outros dentistas, e serão armazenadas e poderão ser utilizadas em outras pesquisas, se necessário.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa será desenvolvida em conjunto com Projeto Borboleta Azul da Faculdades Integradas Espírito Santenses (FAESA) e do Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG). Os procedimentos realizados terão a duração de aproximadamente 01h. Os laboratórios de pesquisa serão o Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Tumorigênese e o Laboratório Multiusuário de Histotécnicas, localizados no Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

RISCO E DESCONFORTOS

Esta pesquisa apresenta risco mínimo aos participantes, uma vez que os mesmos podem se sentir cansados ao longo da aplicação dos instrumentos da pesquisa, que tentaremos minimizá-los ao máximo conforme desejo e sugestão do participante. Durante a realização do exame clínico e realização do esfregaço você poderá sentir dor, que será minimizada através da utilização de um spray anestésico de lidocaína a 10% previamente ao exame e poderá desenvolver bolhas, que será prevenida com uma manipulação cuidadosa. Há um risco de quebra de sigilo por parte dos pesquisadores da pesquisa, que serão minimizados através da assinatura do termo de sigilo e confidencialidade por parte dos mesmos.

BENEFÍCIOS

Um grande benefício será a possibilidade de saber o real número de casos de Epidermólise Bolhosa e fornecer informações para os pacientes e familiares para que todos possam entender, prevenir ou aliviar os diversos problemas que afetam o bem-estar das pessoas envolvidas com a Epidermólise Bolhosa. Buscaremos também treinar os pacientes e responsáveis, nos cuidados corretos com as lesões e a higiene oral. Ainda, esperamos conseguir informações que poderão ajudar a entender o processo de mutagenicidade em pacientes com Epidermólise Bolhosa, e poderemos propor a criação de terapias mais eficazes voltadas para prevenção e tratamento nesse grupo.

internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h. Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pelo(a) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Aceito participar deste estudo de forma voluntária e recebi uma via deste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido assinado pela pesquisadora.

Assinatura do (a) menor

Pesquisador
Ana Carolina Sias Franco Franzosi

Pesquisador responsável
Leticia Nogueira da Gama de Souza

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA



NOME DO PACIENTE: _____

DATA: ____/____/____

Questionário sobre a Saúde Bucal na Epidermólise Bolhosa

Por favor, responda às questões sobre como a Epidermólise Bolhosa (EB) afeta a sua saúde bucal. Escolha a opção que mais se aproxima da sua situação e anote, no final, quanto tempo você levou para preencher esse questionário.

- Qual o seu tipo de EB?
 - ☐ Simples
 - ☐ Juncional
 - ☐ Distrófica – () Recessiva () Dominante
 - ☐ Síndrome de Kindler
 - ☐ Não sabe
- Além da EB você apresenta outro tipo de doença?
 - ☐ Não () sim. Qual? _____
- Quais medicamentos você faz uso diariamente? Cite todos.

- Qual o seu nível de escolaridade?
 - ☐ Ensino fundamental completo
 - ☐ Ensino fundamental incompleto
 - ☐ Ensino médio completo
 - ☐ Ensino médio incompleto
 - ☐ Ensino superior completo
 - ☐ Ensino superior incompleto



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA



- Você acredita que a sua saúde bucal pode influenciar a sua qualidade de vida?
 - ☐ Sim () Não
- Você faz acompanhamento odontológico?
 - ☐ Sim () Não
- Quantas vezes ao dia você realiza a escovação dentária?
 - ☐ 1 vez ao dia
 - ☐ 2 a 3 vezes ao dia
 - ☐ 1 vez a cada 2 dias
 - ☐ Outro _____
- Qual o tipo de cerdas possui a sua escova?
 - ☐ Macia () Ultra macia () Média () Dura
- Você utiliza creme dental fluorado?
 - ☐ Sim () Não
- Você apresenta alguma dificuldade para realização de higienização oral?
 - ☐ Sim () Não
- Você sente dificuldade em abrir a boca?
 - ☐ Sim () Não
- Você percebeu alguma diminuição da sua abertura da boca?
 - ☐ Sim () Não
- Você percebe o surgimento de bolhas na boca com qual frequência?
 - ☐ Todos os dias



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA



- ☐ Uma vez na semana
 - ☐ Uma vez a cada 15 dias
 - ☐ Não surge bolhas na boca
 - ☐ Outro _____
- Na maioria das vezes, qual o local mais frequente de surgimento das bolhas na boca?
 - ☐ Lábios
 - ☐ Bochechas
 - ☐ Gengivas
 - ☐ Língua
 - ☐ Céu da boca
 - ☐ Outro _____
 - Em quanto tempo as lesões da boca costumam cicatrizar?
 - ☐ Até 14 dias
 - ☐ Mais de 14 dias
 - ☐ Outro _____
 - Como você trata a feridas da boca?
 - ☐ Cicatrizam sozinhas
 - ☐ Uso medicamentos ou pomadas para auxiliar a cicatrização. Qual? _____
 - ☐ Outro _____
 - Você costuma fazer ingestão de açúcar? Qual a frequência?
 - ☐ 1 vez ao dia
 - ☐ 2 vezes na semana
 - ☐ Não consumo açúcar
 - ☐ Outro _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA



- Você percebe a sua boca seca durante as refeições?
 - ☐ Nunca () Sempre () Às vezes
- Você percebe seus lábios secos?
 - ☐ Nunca () Sempre () Às vezes
- Tem dificuldade para engolir certos alimentos?
 - ☐ Nunca () Sempre () Às vezes
- Levanta-se à noite para beber água?
 - ☐ Nunca () Sempre () Às vezes
- Percebe seus olhos ressecados?
 - ☐ Nunca () Sempre () Às vezes
- Você sente dificuldade para mastigar algum alimento?
 - ☐ Nunca () Às vezes () Sempre
- Você já percebeu se prefere mastigar apenas de um lado?
 - ☐ Sim () Não
- Se positivo a questão anterior, qual o lado que você prefere?
 - ☐ Direito () Esquerdo

Quanto tempo você levou para preencher este questionário? minutos

APÊNDICE D – FICHA DE LESÕES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA



FICHA DE EXAME FÍSICO

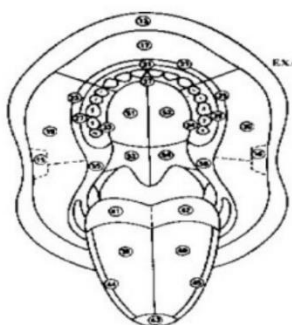
Nome: _____

Idade: _____ Tipo EB: _____

Data: ____/____/____

Lesões de mucosas:

() Úlceras () Bolhas () Nódulos () Manchas () Outras _____



Microstomia:

() Ausente () Presente

Abertura de boca: _____ mm.

Anquiloglossia:

() Ausente () Presente

Necessidade de tratamento odontológico:

APÊNDICE E – NORMAS DA REVISTA

NORMAS DA REVISTA BRAZILIAN ORAL RESEARCH

Apresentação do manuscrito:

- O texto do manuscrito deverá ser fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).
- Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.
- Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.
- Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico

FOLHA DE ROSTO

- Indicação da área temática da pesquisa enfocada no manuscrito.
- Áreas Temáticas: Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia - Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatría; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.
- Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.
- Nomes completos e por extenso de todos os autores, incluindo os respectivos e-mails

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou XLS (podem estar reunidas em um único arquivo).

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Conclusões: devem ser apresentadas concisamente e estar estritamente fundamentadas nos resultados obtidos na pesquisa. O detalhamento dos resultados, incluindo valores numéricos etc., não deve ser repetido.

Agradecimentos: as contribuições de colegas (por assistência técnica, comentários críticos etc.) devem ser informadas, e qualquer vinculação de autores com firmas comerciais deve ser revelada. Esta seção deve descrever a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa, incluindo os respectivos números de processo.

Referências: só serão aceitas como referências as publicações em periódicos revisados por pares. As citações de referências devem ser identificadas no texto por meio de números arábicos sobrescritos. A lista completa de referências deve vir após a seção de "Agradecimentos", e as referências devem ser numeradas e apresentadas de acordo com o Estilo Vancouver, em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, conforme apresentadas em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*. Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*. A correta apresentação das referências é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Figuras: fotografias, micrografias e radiografias devem ter uma largura mínima de 10 cm, resolução mínima de 500 dpi, e devem ser fornecidas em formato TIFF. Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais devem ser fornecidos em formato PDF. Todas as figuras devem ser submetidas, individualmente, em arquivos separados (Figure 1a, Figure 1b, Figure 2...) e não

TEXTO PRINCIPAL

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (sem sub-divisões em seções), contendo objetivo, metodologia, resultados e conclusões.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <https://meshb.nlm.nih.gov/search> (não serão aceitos sinônimos).

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Os manuscritos que relatem estudos em humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (*World Medical Association*). O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado.

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção "Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Inseridas no arquivo de texto. As figuras devem ser numeradas e citadas consecutivamente no corpo do texto, em algarismos arábicos. As legendas das figuras devem ser inseridas todas juntas no final do texto, após as referências.

Características e formatação dos tipos de manuscritos:

PESQUISA ORIGINAL

Devem ser limitados a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Será aceito um máximo de 8 (oito) figuras e 40 (quarenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação:

- Folha de rosto (*Title Page*)
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Referências - máximo de 40 referências
- Legendas de figuras
- Figuras - máximo de 8 (oito) figuras, conforme descrito acima
- Tabelas.