

Betina do Rosário Pereira

**O Efeito de *Brackets* Metálicos e Cerâmicos nas Células
Epiteliais da Mucosa Bucal de Humanos**

Curitiba

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Betina do Rosário Pereira

O Efeito de *Brackets* Metálicos e Cerâmicos nas Células Epiteliais da Mucosa Bucal de Humanos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Ortodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Souza Camargo

Co-orientador Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima

Curitiba

2006

P436e
2006

Pereira, Betina do Rosário
O efeito de brackets metálicos e cerâmicos nas células epiteliais da mucosa bucal de humanos / Betina do Rosário Pereira ; orientadora, Elisa Souza Camargo ; co-orientador, Antônio Adilson Soares de Lima. – 2006.
x, 77 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2006
Inclui bibliografia

1. Braquetes ortodônticos. 2. Células epiteliais. 3. Mucosa bucal.
I. Camargo, Elisa Souza. II. Lima, Antônio Adilson Soares de. III. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

CDD 21. ed. – 617.643

À DEUS

“Grandes foram as lutas, maiores as vitórias. Sempre estiveste comigo. Muitas vezes, quis recuar, pensei que este momento nunca chegaria. No entanto, o Senhor sempre esteve presente, me dando coragem para prosseguir, fazendo da minha fraqueza uma força. Com sua ajuda, hoje estou aqui, não no fim, mas no início de uma grande caminhada. MUITO OBRIGADA”.

A minha mãe Eliete e ao meu pai Pereira, pelo exemplo de vida, coragem, simplicidade e persistência em suas metas. Por me ensinarem os mais belos gestos e as atitudes mais sinceras apenas com seus exemplos. Pelo amor, amizade, companheirismo, incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos. Por sempre acreditarem no meu potencial. Este momento não teria a menor importância se não pudesse dividi-lo com vocês. Vocês são os maiores mestres da minha vida. Tenho orgulho de ser filha de vocês. AMO VOCÊS.

A minha irmã Carol, pelas risadas, momentos alegres, festas, companheirismo e amizade a mim dedicada. Foram muitos os momentos que você me ajudou a sorrir e a continuar. Carol, você é uma pessoa maravilhosa, vou tê-la como amiga por toda minha vida. AMO VOCÊ.

Ao meu noivo Rafael, agradeço por sua presença na minha vida. Pelo amor, companheirismo, atenção, carinho e afeto nestes sete anos. Obrigada por entender a necessidade de eu me ausentar em alguns momentos. Rafa, você é mais que um noivo, é um amigo que eu quero ter comigo pelo resto da minha vida. Tenho a certeza de que iremos construir uma família maravilhosa. Em nenhum

momento da sua vida esqueça o quanto você representa para mim e o quanto eu sou apaixonada por você. AMO VOCÊ.

A minha querida avó Dina (*in memoriam*), por sua ternura, carinho e amor. Jamais esquecerei do seu colo nos momentos de alegria e de tristeza. Você foi minha segunda mãe. Sinto muitas saudades. AMO VOCÊ.

DEDICO

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Elisa Souza Camargo pela confiança em mim depositada. Minha admiração pela paciência, incentivo, competência e dedicação na orientação desta Dissertação. Por compartilhar o seu incontestável conhecimento. Admiro-a não só por ser uma excelente mestra, mas pelo exemplo de mulher e mãe que você é. Jamais esquecerei da sua amizade, carinho e companheirismo em todos os momentos do curso. Por estes dois anos maravilhosos de convívio. MUITO OBRIGADA.

AGRADECIMENTOS

Ao reitor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Prof. Dr. Clemente Ivo Juliatto e ao Diretor do Curso de Odontologia, Prof. Monir Tacla.

Ao Diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sérgio Vieira, pela atenção e amizade em todos os momentos do curso, e pelo incentivo para a realização do Mestrado em Odontologia.

À CAPES, pela bolsa de estudo que possibilitou a realização deste curso.

Ao prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima, co-orientador deste trabalho, pela dedicação, paciência e atenção a mim dedicadas. Pela disponibilidade em ensinar todos os passos laboratoriais e pelas excelentes contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Orlando Tanaka, pelo incentivo e dedicação na minha formação profissional. Pela iniciação científica, oportunidade e confiança em mim depositadas desde a graduação, sempre buscando ampliar os meus conhecimentos. Um exemplo de profissional e de mestre. Jamais esquecerei da sua amizade e de seu companheirismo.

Ao prof. José Henrique Gonzaga de Oliveira, pela incansável atenção dedicada no consultório e na clínica. Aprendi e ainda aprenderei muito da Ortodontia com você. Admiro-o como pessoa e profissional.

Ao prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pela amizade, companheirismo e dedicação. Pelos ensinamentos, alegria e risadas em todos os momentos, principalmente nas aulas de tyodont.

Ao prof. Dr. Hiroshi Maruo, pelos ensinamentos adquiridos nos seminários e na clínica, sempre ampliando os meus conhecimentos de Ortodontia.

A prof. Dra. Maria Ângela Naval Machado, pelas valorosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza, pela iniciação científica e ensinamentos adquiridos desde a graduação.

Ao prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pelo convívio, paciência e imensa competência na elaboração estatística deste trabalho.

A todos os professores das áreas conexas, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao ortodontista Vladimir Cerci, por acreditar no meu potencial, pela carta de recomendação para este curso.

Aos meus amigos do curso, que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando e me incentivando em todos os momentos. Estes dois anos de convívio foram simplesmente maravilhosos. Com certeza levarei esta amizade por toda minha vida.

À amiga Ariana Pulido Guerrero, com seu sotaque inconfundível. No início do curso quietinha, logo foi se soltando e se mostrando uma ótima pessoa, companheira e amiga. Ari, sentirei muita a sua falta. E pode esperar minha visita lá na Venezuela.

À amiga Camila Del Moro, sempre pronta para ajudar, dar conselhos ou simplesmente ouvir nos momentos em que precisei. Cá, continue tendo este jeito

amigo, meigo, sincero e querido. Tenho um enorme carinho por você. Você é uma grande amiga.

Ao amigo Ivan Toshio Maruo, quantas vezes você me auxiliou nas estatísticas e nos trabalhos. Teve que me agüentar durante estes dois anos, sentada na sua frente, perguntando todas as dúvidas que eu tinha. Ivan, admiro sua inteligência, sua garra e sua persistência em tudo que faz. Você é um grande amigo.

À amiga Karine Kimak Salmória Stevão, minha grande companheira não só de trabalho, mas também de quarto, festas, risadas e ótimos momentos. Ka, admiro muito a pessoa que você é. Inteligente, dedicada, amiga, sempre contagiando com este seu jeito alegre. Não vai esquecer de mim agora que já é “doutora”... Amiga, você sabe o quanto eu te adoro.

Ao amigo Leandro Teixeira de Souza, outro grande companheiro de trabalhos, baladas, Warungs, viagens e excelentes momentos. Sempre admirei sua habilidade, capacidade e inteligência. Lê, te admiro muito como pessoa, profissional e amigo. Jamais esquecerei destes dois anos de amizade.

Ao amigo Roger Thronicke Rodrigues, amigo de todas as horas. Com seu ótimo humor, sempre feliz, alegre e rindo até quando não podia. Roger, muitas vezes foi esta sua alegria que me fez levantar diante as dificuldades. Admiro você como pai, amigo e profissional. Quando precisar de uma mãozinha aqui em Curitiba, sempre estarei pronta para o que precisar. Gordinho, te adoro.

À amiga Thaís Gelatti Bortoly, calma, paciente, amiga, mas meio desastrada né? Thá, você, mais do que todos, foi um exemplo de persistência na sua Dissertação. Te admiro muito por isso, pela dedicação, pelo esforço, pela inteligência, pela capacidade e por ser uma grande amiga. Ainda mais agora que já virou parceira de Warung!! Te adoro muito amiga.

À amiga Maria de Fátima Gomes dos Santos e às minhas lindas Gabriela e Maria Júlia, pela atenção, apoio e dedicação nestes 23 anos de convivência. Vocês fazem parte da minha família. Amo vocês.

A minha sogra Mari Ângela Vaccari Gonçalves, a minha cunhada Daniele Vaccari Gonçalves Ogata e ao meu cunhado Guilherme Ogata, pelo amor e carinho.

À secretária Neide Reis Borges e às estagiárias Lucinéia Furtado, Maria Cláudia Guimarães Lopes e Aline Cristina Machado Wiens, sempre atendendo aos meus pedidos com atenção, dedicação e carinho.

À funcionária Silvana Casagrande Gabardo, pela atenção dispensada na clínica, contribuindo para a realização deste trabalho.

À amiga Ana Paula Camargo, do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, pela atenção e apoio demonstrado durante a realização deste trabalho.

Aos amigos das turmas de mestrado das Áreas de Concentração de Dentística, Estomatologia e Saúde Coletiva, pela ótima convivência durante estes dois anos.

Aos amigos e familiares que compartilharam comigo os momentos de angústia e de alegria, sempre me incentivando e apoiando.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1. ARTIGO EM INGLÊS	2
TITLE PAGE.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUCTION	5
MATERIAL AND METHODS	7
RESULTS.....	10
DISCUSSION.....	13
CONCLUSIONS	16
REFERENCES	17
TABLES.....	21
FIGURES	22
TERMS OF APPROVAL BY THE COMMITTEE OF ETHICS IN RESEARCH.....	25
2. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	26
PÁGINA DE TÍTULO.....	27
RESUMO	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
TABELAS	46
FIGURAS	47
TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	50
3. ANEXOS	51
ANEXO I – MATERIAL E MÉTODOS.....	52
ANEXO II – ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
ANEXO III - TABELAS E GRÁFICOS.....	68
ANEXO IV – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	74
ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	75
ANEXO VI - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO - AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS	76

1. ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE**EFFECT OF METAL AND CERAMIC BRACKETS ON HUMANS BUCCAL
MUCOSA EPITHELIAL CELLS****Betina do Rosário Pereira, DDS**

Graduate Dentistry Program - Orthodontics

Master of Science

Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Elisa Souza Camargo, DDS, MSD, PhD

Associate Professor, Graduate Dentistry Program – Orthodontics

Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Antônio Adilson Soares de Lima, DDS, MSD, PhD

Senior Professor, Graduate Dentistry Program – Stomatology

Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Corresponding author

Elisa Souza Camargo, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Mestrado em Odontologia - Ortodontia

Rua Imaculada Conceição, 1155

Cep: 80215-901 - Curitiba - Paraná – Brazil

Phone: 55 41 3271-1637

Fax number: 55 41 3271-1405

E-mail: elisa.camargo@pucpr.br

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to determine the effect of metal and ceramic brackets on the epithelial cells of the buccal mucosa. **Methods:** Two metal and two ceramic brackets were installed in 22 individuals of both sexes. With the use of liquid-based exfoliative cytology, morphometric and morphologic changes in buccal mucosa cells adjacent to these brackets were determined and compared at three time points: baseline (T0), 60 days after placement (T1) and 30 days after removal of the brackets (T2). **Results:** There was a decrease in nuclear area and an increase in cytoplasmic area in the buccal mucosa cells adjacent to the brackets at T1 ($p < 0.01$). At T2, this altered morphometry persisted only in cells adjacent to the metal brackets, although to a lesser degree than at T1 ($p < 0.01$). There was a greater decrease in nuclear area in cells adjacent to the metal brackets than those next to the ceramic brackets ($p < 0.01$). At T0, the proportion of surface and sub-surface cells was similar, while at T1 there was a predominance of surface cells ($p < 0.05$). At all time points, smears of cells appeared normal or normal with some inflammatory changes. **Conclusions:** The placement of metal and ceramic brackets in the buccal cavity induces cellular alterations that do not suggest malignancy.

INTRODUCTION

The placement of orthodontic appliances in the healthy oral cavity can induce a continuous accumulation of dental plaque,¹ alter the normal oral microbiota,^{2,3} cause lesions in the buccal mucosa,⁴ exacerbate periodontal diseases and consequently cause infections.⁵

The metal fixed orthodontic appliances decrease buccal mucosa cells viability, and the nickel and cobalt released from these appliances can induce DNA damage and cellular apoptosis.⁶

Mackenzie and Ettinger⁷ observed damage and areas of inflammation in the buccal mucosa of rats when subjected to friction, and that when this stimulus persisted there was no healing of the ulcerations. It is known that ulcerations in the buccal mucosa are one of the most frequent complaints of patients to the orthodontist due to the friction between the bracket and mucosa, thereby causing discomfort to the patient.^{8,9} Thus, when these ulcerations persist during treatment, the orthodontist refers the patient to another specialist who performs further tests such as taking biopsy and doing exfoliative cytology which can detect alterations in the buccal mucosa caused by this irritation.

The use of exfoliative cytology in the diagnosis of buccal lesions was more common in the period from 1955 to 1975. Since then, there has been a decline in its clinical application due to the subjective nature of its interpretation and because few abnormal cells could be identified in smears. However, this technique has stirred renewed interest because of the possibility of being complemented with other laboratory techniques such as molecular biology, cytomorphology and

immunohistochemical.¹⁰ In addition, it has the advantage of being minimally invasive and painless, not needing local anesthetic and being easy to perform.

Another major advance in the area of cytopathology was the development of liquid-based cytology which provides a series of advantages in relation to the conventional type, featuring better evidence of epithelial cells, slides with less inflammatory cells, red blood cells, cell debris and undesirable artifacts,¹¹ less cell overlapping and more representative samples for reading.¹² Since liquid-based cytology mixes the complete sample in the liquid, there are probably less false negatives, compared to conventional cytology where only 20% of the cells collected are transferred to the slide.¹¹

The necessity of offering patients a fixed orthodontic treatment with no significant risk of damage to buccal mucosa cells, and the lack of reports in the literature on the cytological analysis of the buccal mucosa adjacent to metal and ceramic brackets were the reasons for this study.

The aim of this investigation was to study and compare the epithelial cells of the buccal mucosa adjacent to metal and ceramic brackets at three time points: baseline, 60 days after placement and 30 days after removal of the brackets. These cells were examined for morphometric alterations in area of the nucleus and cytoplasm, alteration in nuclear/cytoplasmic ratio, morphologic alterations in nucleus and cytoplasm and alteration in the cytologic criteria for malignancy. Also examined in these cells was the sex influence on nucleus and cytoplasm morphometry.

MATERIAL AND METHODS

The individuals who were referred to the Dentistry Clinic of the Pontifical Catholic University of Paraná for dental treatment were invited to participate in this study before beginning their treatment. When there was agreement to participate in the study, individuals or their legal guardians signed an informed consent form.

The individuals selected had no related history of smoking, alcoholism, diabetes, anemia and debilitating diseases and were not being treated with antibiotic or steroids during the study period. They did not use alcohol-based mouthwashes, did not wear prostheses or have tooth restorations with sharp edges, and did not have any type of lesion on the buccal mucosa. The sample of this study comprised 22 Brazilian individuals aged 7.6 to 53.7 years, including 7 males and 15 females. The mean age of the individuals was 14 years.

The locations chosen for placement of the brackets were: second deciduous molar, second premolar, and first and second permanent molars, all on the upper arch. The teeth chosen varied according to stage of dentition for each at the time of placement of the brackets.

Four premolars brackets were bonded in each individual with Transbond XT[®] adhesive (3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, USA). Two were *standard edgewise* Dyna-lock[™] metal brackets (3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, USA) placed on the right side and two were *standard edgewise* Transcend[™] Series 6000 ceramic brackets (3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, USA) placed on the left side.

Liquid-based cytology

Epithelial cells were collected at three times by the same operator: baseline (T0), 60 days after placement (T1) and 30 days after removal of the brackets (T2). T0 was used as the control, where cells were collected from the clinically health buccal mucosa.

Before the cells collection, the individuals were orientated to rinse the mouth with water to remove possible debris. Cells were collected using a DNA-Citoliq[®] System kit (DIGENE BRASIL LTDA, São Paulo, Brazil), called *Universal Collection Medium* (UCM). Mucosa cells collected for study were obtained by the use of a brush where the larger bristles scraped the selected region gently and in clockwise rotating manner (five times). The collected material was immersed in liquid medium in the kit flask where it remained until histological process.

The material deposited on the slides was fixed by immersion in absolute ethyl alcohol for 20 min. Next, the slides were stained using the Papanicolaou technique modified according to the manufacturer recommendations of the DNA-CITOLIQU System (2002).

Cytomorphometric analysis

The slides were examined using a binocular light microscope (Olympus[®] BX50, Japão) adapted with WH 10X-H/22 oculars and PLAN 40X/0.65 objective (Olympus[®], Japan). Prior to reading, the identification number of the slides was covered to avoid bias. Fifty cells on each slide were selected randomly for examination.¹³⁻¹⁶ Areas with cells folded over and/or clumped were avoided,¹⁷ because of the difficulty in determining cell boundaries. The image of the cytologic fields was captured at a magnification of 400 times (Figs 1A, B, C, D and E) using

Sony CCD Iris Color Video camera, model DXC-107A (Sony Electronics Inc., USA). To measure nuclear (NA) and cytoplasmic (CA) area, an image analysis program was used to increase precision and speed of measurement.¹⁸ It was used the image analysis system *Image Pro Plus*, version 4.5.029 for Windows 98/NR/2000 (Media Cybernetics. Inc., USA). The nuclear and cytoplasmic delimitation were realized using the digital cursor and later, with the plate in the measurement mode, the NA and CA were measured,^{13,14} and the nuclear/cytoplasmic ratio (N/C) was then determined for each cell.^{13,16,19}

Cytomorphologic analysis

Cytomorphologic analysis was performed using the same binocular microscope adapted with WH 10X-H/22 oculars and PLAN 10X/0.25, 20X/0.40 and 40X/0.65 objectives (Olympus[®], Japan). The slide was scanned completely, and the smears were then classified based on the predominance of cells present, in accordance with Sugerman and Savage²⁰.

The smears were also evaluated qualitatively determining cytologic criteria of malignancy, where they were classified according to Papanicolaou²¹ as follows:

- Class 0 – material insufficient or inadequate for analysis;
- Class I - smear normal;
- Class II - smear normal with inflammatory changes;
- Class III – dysplastic changes – smear suspect;
- Class IV – strongly indicative but not conclusive for malignancy;
- Class V - smear malignant.

Statistical analysis

Two-way ANOVA ($p < 0.01$) with repeated measurements was used to determine if there was a significant difference for NA, CA and N/C between the different times, regardless of sex. When ANOVA accused difference between groups, Tukey HSD test was used ($p < 0.01$).

The data were compared to see if there were differences in the areas of the nucleus and cytoplasm and in the nuclear/cytoplasmic ratio, between the sexes for all time points, using Student's t-test for independent samples ($p < 0.05$).

For comparison of cell morphology for the different times and brackets, McNemar's test for significance of changes was used ($p < 0.05$).

RESULTS

Of the 22 individual who participated in this study, only one, a female, was excluded from the sample because the brackets accidentally debonded during the study period. Thus, 5250 cells were examined and measured, that is, 105 slides from 21 individuals.

Cytomorphometric analysis

Table I shows ANOVA mean and standard deviation of the NA, CA e N/C values according to bracket/time.

In relation to the variable NA, a significant difference was observed among all the groups regardless of sex ($p < 0.01$), with the exception of T0 versus T2 of buccal mucosa cells adjacent to the ceramic brackets (Fig 2).

After placement of the bracket, there was a significant decrease in NA ($p < 0.01$), of buccal mucosa cells adjacent to either ceramic or metal brackets. Cells

adjacent to metal brackets did show a lower NA compared to those next to ceramic brackets ($p < 0.01$).

When the brackets were removed, NA of the mucosa cells adjacent to the ceramic brackets tended to return to the T0 value. On the other hand, NA of mucosa cells adjacent to metal brackets increased in relation to T1 values, but still remained lower than that at T0 ($p < 0.01$).

When evaluating the CA variable, a significant difference was seen with all the variables ($p < 0.01$), with the exception of T0 versus T2 of buccal mucosa cells adjacent to the ceramic brackets and T2 of buccal mucosa cells adjacent to ceramic versus metal brackets (Fig 3).

After placement of the brackets, there was a significant increase in CA ($p < 0.01$) of buccal mucosa cells adjacent to either ceramic or metal brackets. Cells adjacent to metal brackets did show a greater CA compared to those next to ceramic brackets, but this difference was not significant ($p > 0.05$).

When the brackets were removed, CA of the mucosa cells adjacent to the ceramic brackets tended to return to the T0 value. On the other hand, CA of mucosa cells adjacent to metal brackets decreased in relation to T1 values, but still remained higher than that at T0 ($p < 0.01$).

In relation to the variable N/C, a significant difference was observed among all the variables ($p < 0.01$), with the exception of T0 versus T2 of buccal mucosa cells adjacent to the ceramic brackets (Fig 5).

After placement of the bracket, there was a significant decrease in N/C ($p < 0.01$), of buccal mucosa cells adjacent to either ceramic or metal brackets. Cells

adjacent to metal brackets did show a lower N/C compared to those next to ceramic brackets ($p < 0.01$).

When the brackets were removed, N/C of the mucosa cells adjacent to the ceramic brackets tended to return to the T0 value. On the other hand, N/C of mucosa cells adjacent to metal brackets increased in relation to T1 values, but still remained significantly lower than that at T0 ($p < 0.01$).

The NA was statistically greater in males ($61.13\mu\text{m}^2$) than in females ($58.67\mu\text{m}^2$), when considering all the groups together ($p < 0.05$). Similarly, CA was statistically greater in males ($2278\mu\text{m}^2$) than in females ($2189\mu\text{m}^2$) ($p < 0.05$). However, there was no significant difference between sexes with regard to N/C.

Cytomorphologic analysis

With respect to the predominance of cells present in the smears, based on their staining, no slide was found with a predominance of cells of the spinosum and basale stratum.

Table I showed the slides distribution according to cellular predominance. In T0, the number of slides with a predominance of surface and subsurface cells was similar. While for T1 and T2 there were more slides with a predominance of surface cells. A statistically significant difference was found between T0 and T1 of buccal mucosa cells adjacent to the ceramic and metal brackets, and T0 and T2 of buccal mucosa cells adjacent to the ceramic brackets ($p < 0.05$) (Table II).

In the smears examined there were no instances of Papanicolaou Classes 0, III, IV and V, when determining the cytological criteria for malignancy. Classes I and II were observed at all time points, where there was no significant difference among the groups ($p > 0.05$).

DISCUSSION

In the individuals of this study, the ceramic and metal brackets were bonded without the presence of arches, ligatures or rubber bands, since these materials could bias the findings.²² However, it is known that these accessories are routinely utilized in the treatment, and can protect the buccal mucosa from direct friction due to the bracket. The ulcerations in the buccal mucosa are frequent complaints in orthodontic patients. Studies indicate that approximately 76%⁸ to 95%⁹ of patients report ulcers in the buccal mucosa during treatment, where only between 16.5%⁹ and 21.1%⁸ of patients report ulcers only once. Therefore, since the epithelium of the buccal covering is exposed to aggressive agents, as in the case of brackets which are capable of causing alterations at various times during treatment, the use of exfoliative cytology can be an effective tool in the diagnosis to detect and evaluate these alterations, if its limitations are well elucidated and applied.^{23,24} The clinician should be knowledgeable of this technique, since the cells are studied individually and cannot be evaluated with regard to tissue conformation as in a biopsy.²³ In addition, only the most surface cells of the epithelium are collected for exfoliative cytology.²⁵ Therefore, the use of brushes to collect epithelial cells allows the collection of samples that include cells of all the buccal mucosa stratified squamous epithelium,^{11,26,27} in addition to providing a thinner and more dispersed, homogeneous distribution of the cells on the slides.²⁸

In the present study, was observed that the placement of brackets in the buccal cavity caused diminution of the nucleus, increase in the cytoplasm and a lower nuclear/cytoplasm ratio of the buccal mucosa cells that were in contact with the brackets. These results corroborate the findings of Shabana et al²⁹ who also

found a statistically significant increase in the size of cells of traumatic keratosis lesions when compared with normal cells of the buccal mucosa.

However, in the buccal cells of individuals with malignant lesions^{13,15} or smokers^{14,17}, alterations distinct of the present study were found. In individuals with a tobacco-chewing habit and in those with smoking and tobacco-chewing habits combined, there was an increase in nuclear diameter and a decrease in cell diameter,¹⁷ as seen in samples of individuals with tumors in the mouth floor.¹⁵ Cowpe et al¹³ did not find size changes in the nucleus in samples of suspicious lesions of the buccal mucosa and the mouth floor, but did observe a decrease in cytoplasmic area in lesions of the buccal mucosa. Ogden et al¹⁴ only observed an increased nuclear area in the buccal mucosa cells of smokers and did not note an alteration in cytoplasmic area. Normal cells of the buccal mucosa have abundant cytoplasm and a single, small centralized nucleus, while malignant cells have a broad, enlarged nucleus which occupies a large area of the cytoplasm, with well-stained chromatin and an irregular nuclear membrane.²³ Therefore, the cell changes that occurred in the buccal mucosa adjacent to the metal and ceramic brackets in the present study do not suggest malignancy, where this diagnosis was confirmed by the evaluation of cytological criteria for malignancy showing smears of only Classes I and II of Papanicolaou.

The alterations in the sizes of the nucleus and cytoplasm demonstrated here, suggest hyperkeratinosis of the stratified squamous epithelium of the buccal mucosa adjacent to the brackets, which would cause an increase in the number of cells of the corneum stratum of the epithelium, which show abundant cytoplasm and smaller nuclei than cells from deeper layers. This hyperkeratinosis can be

confirmed by the increase in the number of slides with a predominance of surface cells at T1 and T2.

In this study, it was also observed greater alterations in the nucleus in buccal mucosa cells adjacent to the metal brackets than on those adjacent to the ceramic brackets. Thirty days after removal of the brackets, it was also noted that buccal mucosa cells that were in contact with the metal brackets still showed a smaller nucleus and larger cytoplasm with a lower nuclear/cytoplasm ratio, although with less alteration than at T1. However, the buccal mucosa cells adjacent to the ceramic brackets had already returned to the initial size.

The greater cell alterations on the side with the metal brackets suggest that the bracket used in this study, of 17-4 stainless steel, may have been caused by more traumatism to the buccal mucosa due to its physical characteristics, that is, the wings being less rounded than those of the ceramic brackets, or due to the cytotoxicity of the stainless steel, which has been observed in other studies.^{6,30-33}

In this study, the buccal mucosa cells were evaluated only 30 days after removal of the brackets, since Jones et al²⁴ recommend that if a lesion still persists for longer than 14 days after removal of the etiological factors, a biopsy should be performed immediately. Therefore, in 30 days, cells should have returned to the initial size. It is believed that in future studies, the buccal mucosa cells should be analyzed after longer periods to determine if these alterations persist in the buccal mucosa.

In the present study was also found that the size of the nucleus and cytoplasm of the buccal mucosa cells was larger in males compared to females, contrary to the findings of Cowpe et al¹⁹ who did not find a difference between the

sexes. However, this author utilized conventional exfoliative cytology, which can explain contradictory results such as those in the present study, since liquid-based cytology was used which enhances visualization of cell morphology.¹²

This is the first study to describe cellular changes in the buccal mucosa adjacent to metal and ceramic brackets. Prior to this finding, orthodontists had no way of defending against allegations linking the use of brackets to oral cancer. Since brackets are essential components of fixed orthodontic appliances, there is a need for biocompatibility to prevent irreversible deleterious damage to tissues. Although the results of this investigation suggest that brackets do not cause any malignant changes in the buccal mucosa, the etiology of the observed changes still remains uncertain. Future studies in this regard will help find ways to prevent these alterations.

CONCLUSIONS

- The buccal mucosa cells adjacent to the metal and ceramic brackets show a decrease in nuclear size, increase in cytoplasmic size and decrease in nuclear/cytoplasmic ratio not suggesting malignancy.
- The buccal mucosa cells adjacent to the metal brackets show greater changes in the nucleus than those adjacent to the ceramic brackets.
- The buccal mucosa cells adjacent to the metal brackets remain altered 30 days after removal of the brackets.
- The buccal mucosa cells adjacent to the metal and ceramic brackets tend to return to the initial size after removal of the brackets.

- There is a predominance of surface cells in smears of the buccal mucosa adjacent to the metal and ceramic brackets 60 days after placement, and of the buccal mucosa adjacent to ceramic brackets 30 days after their removal.
- The smears of buccal mucosa adjacent to metal and ceramic brackets are classified as normal or normal with inflammatory changes.
- The size of the nucleus and cytoplasm of the buccal mucosa cells is larger in males.

REFERENCES

1. Sukontapatipark W, El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001;23:475-84.
2. Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Gluca MR, Gabriele M, Campa M, Senesi S. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonization by mutans streptococci in children. *Eur J Orthod* 2001;109:388-92.
3. Hägg U, Kaveewatchranont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. *Eur J Orthod* 2004;26:623-9.
4. Bishara SE. Oral lesions caused by an orthodontic retainer: a case report. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;108:115-7.
5. Atack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontics appliances. A review. *J Periodontol* 1996;67:78-85.

6. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:687-94.
7. Mackenzie IC, Ettinger RL. Differences in the response of rodent oral mucosa and skin repeated surface trauma. *J Prosthet Dent* 1975;34:666-74.
8. Kvam E, Gjerdet NR, Bondevik O. Traumatic ulcers and pain during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987;15:104-7.
9. Kvam E, Bondevik O, Gjerdet NR. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989;17:154-7.
10. Macluskey M, Ogden GR. An overview of the prevention of oral cancer and diagnosis markers of malignant change: 2 Markers of value in tumour diagnosis. *Dent Update* 2000;27:148-52.
11. Kahn MA. Oral exfoliative cytology procedures: conventional, brush biopsy and thintrep. *J Tenn Dent Assoc* 2001;81:17-20.
12. Hayama FH, Motta ACF, Silva APG, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:115-22.
13. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J R Soc Med* 1988;81:509-13.
14. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-5.
15. Mollaoglu N, Cowpe JG, Walker R. Cytomorphologic analysis of Papanicolaou stained smears collected from floor of the mouth mucosa in patients with or without oral malignancy. *Turk J Med Sci* 2001;31:225-8.

16. Alberti S, Spadella CT, Francischone TRCG, Assis GF, Cestari TM, Taveira LAA. Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* 2003;32:538-43.
17. Ramaesh T, Mendis BRRN, Ratnatunga N, Thattil RO. The effect of tobacco smoking and of betel chewing with tobacco on the buccal mucosa: a cytomorphometric analysis. *J Oral Pathol Med* 1999;28:385-8.
18. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med* 1997;26:201-5.
19. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: na age, site and sex-related survey. *J R Soc Med* 1985;78:995-1004.
20. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent J* 1996;41:71-4.
21. Lange DE, Meyer M, Hahn W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bollous lesions. *J Periodontol* 1972,43:433-7.
22. Kluemper GT, Hiser DG, Rayens MK, Jay MJ. Efficacy of a wax containing benzocaine in the relief of oral mucosal pain caused by orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002;122:359-65.
23. Bernstein ML, Miller RL. Oral exfoliative cytology. *JADA*, 1978;96:625-9.
24. Jones AC, Migliorati CA, Stewart CM. Oral cytology: indications, contraindications, and technique. *Gen Dent* 1995;Jan-Feb:74-7.
25. Folsom TC, White CP, Bromer L, Canby HF, Garrington GE. Oral exfoliative study. Review of the literature and report of a three-year study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33:61-74.

26. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. J Am Dent Assoc 1999;130:1445-57.
27. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. Mol Cancer 2006;23:5-11.
28. Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The cytobrush plus cell collector in oral cytology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994;77:101-4.
29. Shabana AHM, El-Labban NG, Lee KW, Kramer IRH. Morphometric analysis of suprabasal cells in oral white lesions. J Clin Pathol 1989;42:264-70.
30. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A, Kullmann A. Cytotoxic effect of orthodontic appliances. Eur J Orthod 1992,14:47-53.
31. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A. Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. Scand J Dent Res 1993; 101:229-31.
32. David A, Lobner D. *In vitro* cytotoxicity of orthodontic archwires in cortical cell cultures. Eur J Orthod 2004;26:421-6.
33. Oh KT, Choo SU, Kim KM, Kim KN. A stainless steel bracket for orthodontic application. Eur J Orthod 2005;27:237-44.

TABLES

Table I - ANOVA mean and standard deviation according to bracket/time

Variables	NA	CA	N/C
T0	63.39 $\mu\text{m}^2 \pm 19.23$	2015.05 $\mu\text{m}^2 \pm 696.75$	0.03 ± 0.01
T1 Ceramic	57.92 $\mu\text{m}^2 \pm 19.79$	2406.09 $\mu\text{m}^2 \pm 642.18$	0.03 ± 0.01
T1 Metal	53.00 $\mu\text{m}^2 \pm 17.37$	2473.93 $\mu\text{m}^2 \pm 621.03$	0.02 ± 0.01
T2 Ceramic	63.68 $\mu\text{m}^2 \pm 20.89$	2041.44 $\mu\text{m}^2 \pm 639.44$	0.03 ± 0.01
T2 Metal	59.4 $\mu\text{m}^2 \pm 20.30$	2155.40 $\mu\text{m}^2 \pm 677.04$	0.03 ± 0.01

Table II - Number of slides according to cell predominance

Variables	Superficial	Sub-superficial	Spinosum	Basale
T0	10	11	0	0
T1 Ceramic	17	4	0	0
T1 Metal	19	2	0	0
T2 Ceramic	18	3	0	0
T2 Metal	16	5	0	0

FIGURES

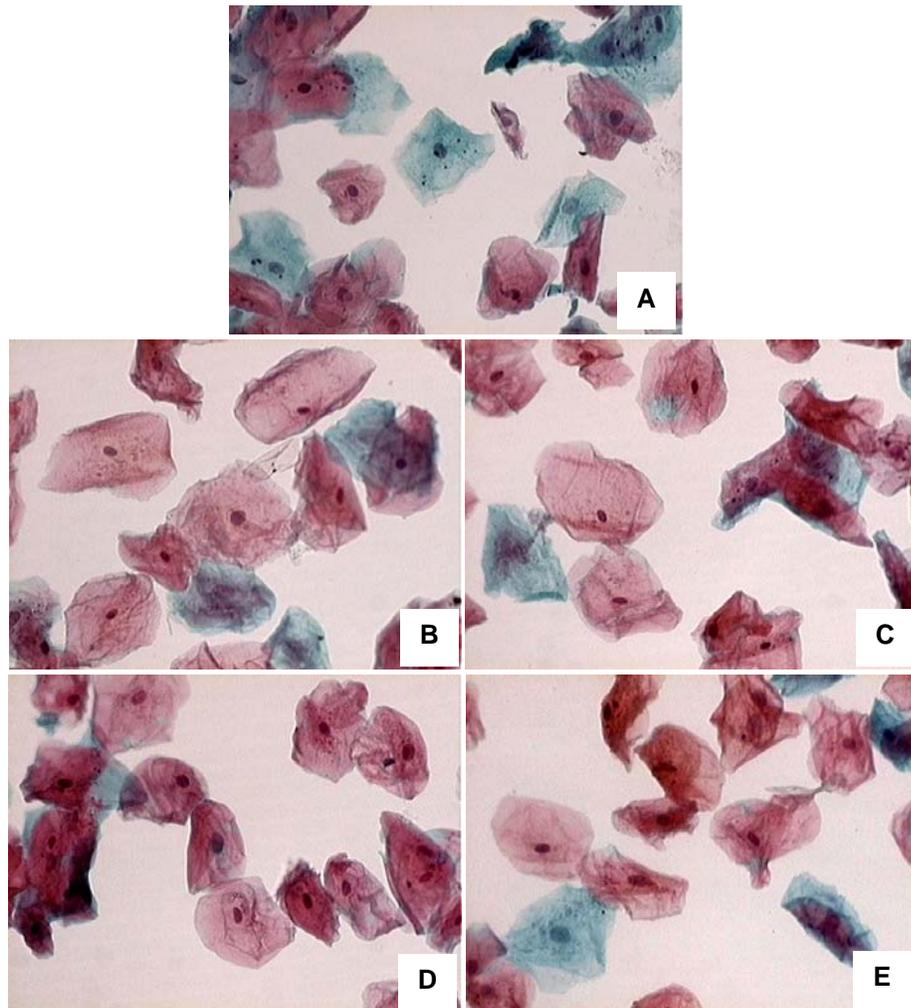


Fig 1 **A.** Epithelial cells of the clinically health buccal mucosa at T0. **B.** Epithelial cells of the buccal mucosa adjacent to the metal brackets at T1. **C.** Epithelial cells of the buccal mucosa adjacent to the ceramic brackets at T1. **D.** Epithelial cells of the buccal mucosa adjacent to the metal brackets at T2. **E.** Epithelial cells of the buccal mucosa adjacent to the ceramic brackets at T2. (Papanicolaou-400X)

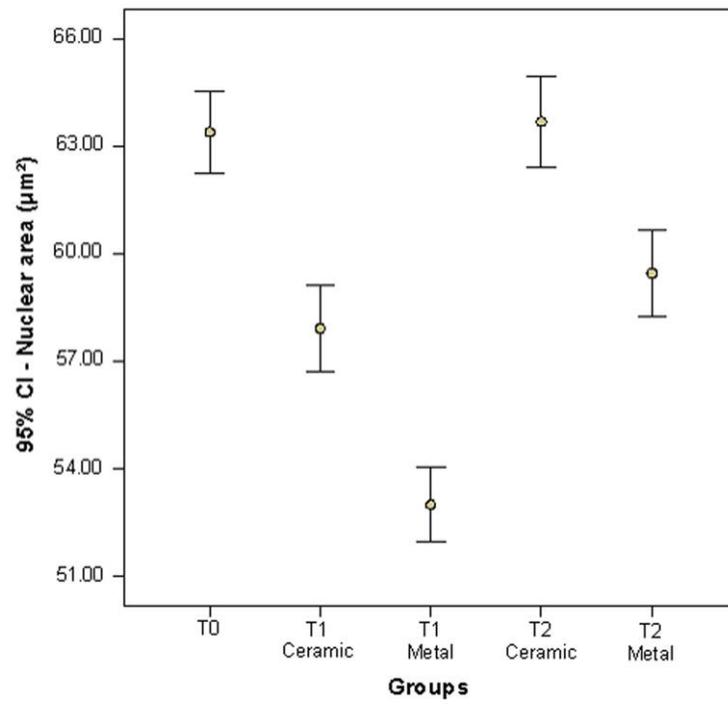


Fig 2. Mean values of nuclear area according to bracket/time.

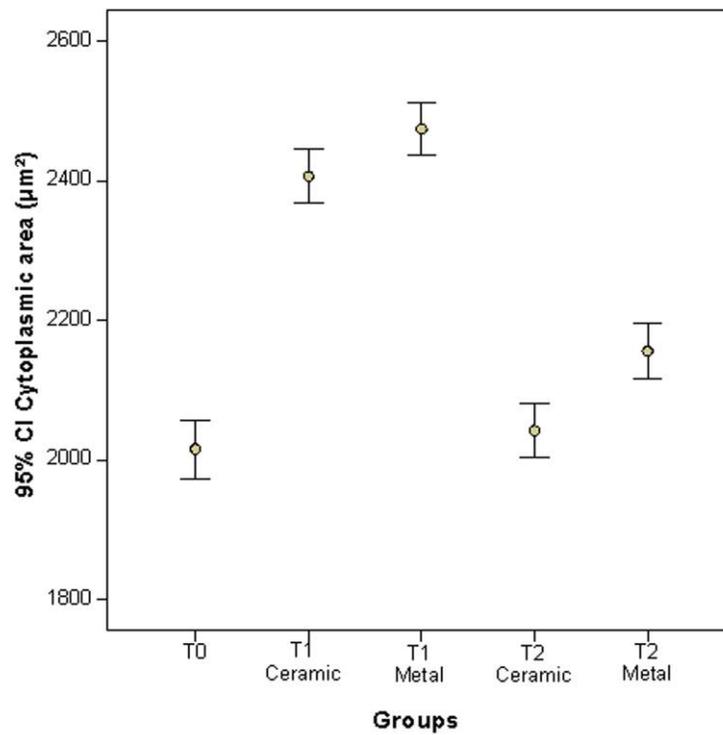


Fig 3. Mean values of cytoplasmic area according to bracket/time.

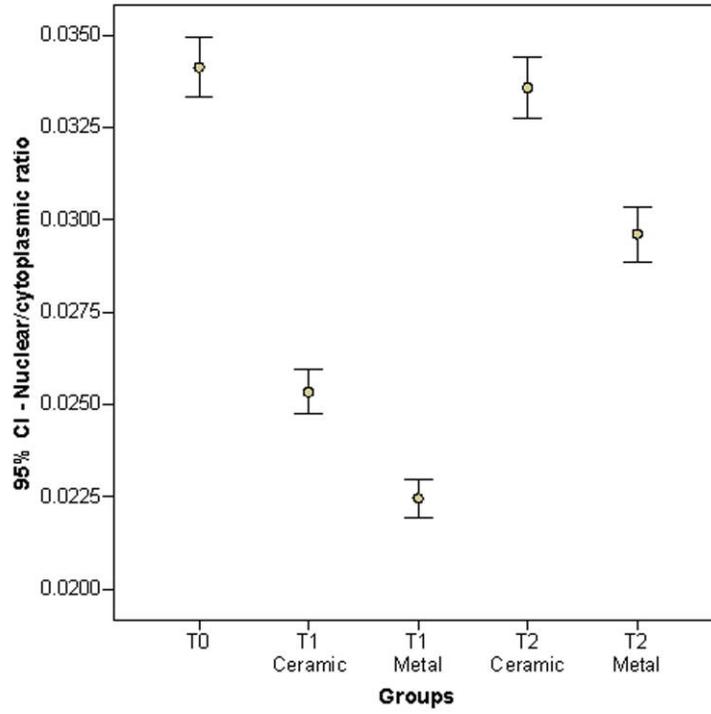


Fig 4. Mean values of nuclear/cytoplasmic ratio according to bracket/time.

TERMS OF APPROVAL BY THE COMMITTEE OF ETHICS IN RESEARCH



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 10 de novembro de 2005.

Of. 493/05/CEP-PUCPR

Ref. **"A influência de Brackets metálicos e cerâmicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e fúngica"**

Prezado (a) Pesquisador

Venho por meio deste, informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 09 de novembro do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado **"A influência de Brackets metálicos e cerâmicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e fúngica"** pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 887 e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.
Elissa Souza Camargo

2. ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA DE TÍTULO

O EFEITO DE *BRACKETS* METÁLICOS E CERÂMICOS NAS CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL DE HUMANOS

Betina do Rosário Pereira, DDS

Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Elisa Souza Camargo, DDS, MSD, PhD

Professora Adjunta, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Antônio Adilson Soares de Lima, DDS, MSD, PhD

Professor Titular, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Autor responsável pela correspondência

Prof. Dra. Elisa Souza Camargo
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Mestrado em Odontologia - Ortodontia
Rua Imaculada Conceição, 1155
Cep: 80215-901 - Curitiba - Paraná – Brasil
Telefone: 55 41 3271-1637
Fax: 55 41 3271-1405
E-mail: elisa.camargo@pucpr.br

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de *brackets* metálicos e cerâmicos nas células epiteliais da mucosa bucal. **Métodos:** Foram colados dois *brackets* metálicos e dois *brackets* cerâmicos em 22 indivíduos, de ambos os gêneros. Com o auxílio da citologia esfoliativa em base líquida, as alterações morfométricas e morfológicas das células da mucosa bucal adjacente a estes *brackets* foram analisadas e comparadas, em três tempos: dia zero (T0), 60 dias após a colagem (T1) e 30 dias após a remoção dos *brackets* (T2). **Resultados:** Verificou-se diminuição da área do núcleo e aumento da área do citoplasma das células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* no T1 ($p < 0,01$). No T2, somente as células adjacentes aos *brackets* metálicos persistiram com suas áreas alteradas, embora em menor quantidade que no T1 ($p < 0,01$). Houve maior diminuição da área do núcleo das células adjacentes aos *brackets* metálicos que das adjacentes aos cerâmicos ($p < 0,01$). No T0, o predomínio de células superficiais e sub-superficiais foi semelhante, enquanto no T1 houve predomínio de células superficiais ($p < 0,05$). Em todos os tempos foram observados somente esfregaços com células normais ou com alterações inflamatórias. **Conclusões:** A instalação de *brackets* metálicos e cerâmicos na cavidade bucal induz alterações celulares que não sugerem malignidade.

INTRODUÇÃO

A instalação de aparelhos ortodônticos em uma cavidade bucal saudável pode induzir acúmulo contínuo de placa bacteriana,¹ alterar a microbiota bucal normal,^{2,3} causar lesões na mucosa bucal,⁴ exacerbar doenças periodontais e conseqüentemente, causar infecções.⁵

O uso de aparelho ortodôntico fixo metálico diminui a viabilidade das células da mucosa bucal que estão em contato com o mesmo, assim como, o níquel e o cobalto liberados por estes aparelhos induzem apoptose e danos ao DNA destas células.⁶

Mackenzie e Ettinger⁷ observaram que a mucosa bucal de ratos apresentava danos e áreas de inflamação quando sofria fricção, e que quando este estímulo persistia não ocorria o reparo das ulcerações. Sabe-se que as ulcerações na mucosa bucal são uma das reclamações mais freqüentes dos pacientes devido à fricção da mucosa no *bracket*, causando assim desconforto ao paciente.^{8,9} Sendo assim, quando há persistência destas ulcerações durante o tratamento, cabe ao ortodontista encaminhar o paciente a um profissional especializado, para que este com o auxílio de exames de diagnóstico como a citologia esfoliativa e a biópsia, possa detectar as alterações ocorridas na mucosa bucal, provocadas a partir destas agressões.

O uso da citologia esfoliativa no diagnóstico de lesões bucais foi mais freqüente no período entre 1955 e 1975. Desde então, houve declínio de sua aplicação clínica devido à natureza subjetiva de sua interpretação e porque poucas células anormais eram identificadas nos esfregaços. Porém, esta técnica tem despertado interesse devido à possibilidade de ser complementada com

outras técnicas laboratoriais como a biologia molecular, a citomorfologia e a imunohistoquímica.¹⁰ Além disso, apresenta como principais vantagens ser de fácil execução, não invasiva, indolor e não necessitar de anestesia local.

Outro grande avanço na área de citopatologia foi o desenvolvimento da citologia em base líquida, a qual apresenta uma série de vantagens em relação à convencional, destacando-se melhor evidenciação das células epiteliais, esfregaços com menor quantidade de células inflamatórias, hemácias, restos celulares e artefatos indesejáveis,¹¹ menor sobreposição celular, produzindo uma amostra mais representativa para leitura.¹² Como a citologia em base líquida homogeneíza a amostra completa das células no líquido, isto provavelmente diminui os falsos negativos, uma vez que na citologia convencional apenas 20% das células coletadas são transferidas para a lâmina.¹¹

A constatação da necessidade de se oferecer aos pacientes um tratamento ortodôntico corretivo sem risco significativo de danos às células da mucosa bucal, aliada à ausência de relatos na literatura sobre a análise citológica da mucosa bucal adjacente a *brackets* metálicos e cerâmicos motivaram a realização deste estudo.

Portanto, os objetivos desta pesquisa foram analisar e comparar as células epiteliais da mucosa bucal adjacentes a *brackets* metálicos e cerâmicos, em três tempos: dia zero, 60 dias após a colocação e 30 dias após a remoção dos *brackets*. Foi analisado se ocorreram alterações: morfométricas na área do núcleo e do citoplasma, na relação núcleo/citoplasma, morfológicas no núcleo e no citoplasma destas células e nos critérios citológicos de malignidade. Também foi

avaliada a influência do gênero na morfometria do núcleo e do citoplasma destas células.

MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos que procuraram a Clínica de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná para a realização de tratamento odontológico foram convidados a participar deste estudo antes do início do seu tratamento. Quando houve concordância da participação na pesquisa, os indivíduos ou responsáveis assinaram um termo de consentimento.

Somente foram selecionados indivíduos que relataram ausência de história de tabagismo e etilismo, diabetes, anemia, doenças debilitantes e tratamento com antibióticos ou esteróides no período do estudo, que não fossem usuários de enxagüatórios bucais à base de álcool, sem próteses ou dentes com restaurações com bordas cortantes, e que não apresentassem qualquer tipo de lesão na mucosa bucal. A amostra deste estudo foi composta de 22 indivíduos brasileiros, com idades entre 7,6 e 53,7 anos, 7 do gênero masculino e 15 do gênero feminino. A idade média dos indivíduos foi de 14 anos.

Os locais de escolha para a fixação dos *brackets* foram: segundo molar decíduo, segundo pré-molar, primeiro e segundo molar permanentes, todos na arcada superior. Os dentes escolhidos variaram em função do estágio da dentição que cada um se encontrava no momento da colagem.

Em cada indivíduo foram colados 4 *brackets* de pré-molares com o compósito resinoso do *kit* do Transbond XT® (3M Unitek, Monrovia, USA), dois *brackets* metálicos *standard edgewise* Dyna-lock™ (3M Unitek, Monrovia, USA) do

lado direito e dois *brackets* cerâmicos *standard edgewise* Transcend™ Series 6000 (3M Unitek, Monrovia, USA) do lado esquerdo.

Citologia em base líquida

A coleta das células epiteliais foi realizada em três tempos, por um único operador: dia zero (T0), 60 dias após a colagem (T1) e 30 dias após a remoção dos *brackets* (T2). O T0 foi utilizado como controle, sendo coletadas células da mucosa jugal clinicamente saudável.

Para a realização desta coleta, os pacientes foram orientados a realizar bochechos com água por 30 segundos, para a remoção de possíveis restos alimentares. A coleta das células foi realizada com o *kit* do sistema DNA-CITOLIQ® (DIGENE BRASIL LTDA, São Paulo, Brasil), denominado *Universal Collection Medium* (UCM). A coleta das células da mucosa estudada foi obtida por meio da aplicação da escova, de modo que as cerdas maiores tocassem a região escolhida, de forma suave e em movimentos giratórios no sentido horário (cinco voltas). A escova com o material coletado foi imersa no líquido preservador do frasco do *kit*, permanecendo assim até o processamento histológico. Uma alíquota de 200 µL foi submetida a processamento histológico segundo as orientações do fabricante.

O material disposto sobre as lâminas foi fixado pela imersão destas em uma solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos. A seguir, foi realizada a coloração das mesmas com a técnica de Papanicolaou modificada conforme as recomendações do fabricante do Sistema DNA-CITOLIQ (2002).

Análise citomorfométrica

A análise dos esfregaços foi realizada por meio de microscopia de luz utilizando-se um microscópio binocular (Olympus® BX50, Japão) adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65 (Olympus®, Japão). Previamente à leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés. Cinquenta células de cada lâmina foram examinadas aleatoriamente.¹³⁻¹⁶ Evitou-se áreas em que as células se encontravam visualmente dobradas e/ou aglomeradas, o que dificultaria a delimitação destas.¹⁷ A imagem dos campos citológicos foi capturada em uma ampliação de 400 vezes (Fig 1A, B, C, D e E), por uma câmera Sony CCD Íris Color Video, modelo DXC-107A (Sony Electronics Inc., USA). A mensuração da área do núcleo (NA) e do citoplasma (CA) da célula foi realizada por meio de um sistema de análise de imagens para aumento da precisão e da velocidade de mensuração.¹⁸ O sistema utilizado foi o *Image Pro Plus*, versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000 (Media Cybernetics. Inc., EUA). A delimitação do núcleo e do citoplasma foi realizada por meio de um cursor digitador, e posteriormente, com a placa no modo de medida, as áreas nucleares e citoplasmáticas foram mensuradas,^{13,14} e então foi obtida a relação núcleo/citoplasma (N/C) de cada célula.^{13,16,19}

Análise citomorfológica

A análise citomorfológica foi realizada utilizando-se o mesmo microscópio binocular, entretanto, adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 10X/0,25, 20X/0,40 e 40X/0,65 (Olympus®, Japão). A lâmina foi percorrida em toda sua extensão, e então os esfregaços foram classificados segundo o predomínio das células presentes, de acordo com Sugerman e Savage²⁰.

Os esfregaços também foram avaliados qualitativamente buscando-se identificar critérios citológicos de malignidade, sendo classificados de acordo com Papanicolaou²¹ em:

- Classe 0 - material insuficiente ou inadequado para análise;
- Classe I - esfregaço normal;
- Classe II - esfregaço normal com alterações inflamatórias;
- Classe III - alterações displásicas – esfregaço suspeito;
- Classe IV - fortemente indicativa, mas não conclusiva de malignidade;
- Classe V - esfregaço maligno.

Análise estatística

Para comparar se havia diferença entre NA, CA e N/C para os diferentes tempos, independente de gênero, aplicou-se ANOVA com medidas repetidas ($p < 0,01$). Quando ANOVA acusou diferença entre os grupos, visando identificar quais diferiam entre si utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey HSD ($p < 0,01$).

Para comparar se havia diferença na área do núcleo, do citoplasma e na relação núcleo-citoplasma, entre os gêneros para todos os tempos, utilizou-se o teste t de *Student* para amostras independentes ($p < 0,05$).

Para a comparação da morfologia celular dos diferentes tempos e *brackets* foi utilizado o teste de McNemar da significância das mudanças ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Dos 22 indivíduos participantes deste estudo, somente um, do gênero feminino, foi excluído da amostra porque os *brackets* foram descolados

acidentalmente durante o período do estudo. Portanto, foram avaliadas e mensuradas 5250 células, ou seja, 105 lâminas, de 21 indivíduos.

Análise Citomorfométrica

A tabela I apresenta a média e o desvio padrão das variáveis NA, CA e N/C de acordo com *bracket*/tempo.

Com relação à variável NA independente do gênero, observou-se diferença significativa entre todos os grupos ($p < 0,01$), com exceção entre T0 e T2 nas células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos (Fig 2).

Após a instalação dos *brackets* houve diminuição significativa do valor da NA ($p < 0,01$), tanto para as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos como para a adjacente aos metálicos. No entanto, a NA da adjacente aos *brackets* metálicos apresentou valor menor que a adjacente aos cerâmicos ($p < 0,01$).

Uma vez removidos os *brackets*, o valor da NA das células da mucosa adjacente aos *brackets* cerâmicos tendeu retornar ao valor de T0. Por outro lado, o valor da NA das células da mucosa adjacente aos *brackets* metálicos aumentou estatisticamente em relação a T1, embora ainda permanecesse menor do que T0 ($p < 0,01$).

Com relação à variável CA independente do gênero, verificou-se diferença significativa entre todas as variáveis ($p < 0,01$), com exceção entre T0 e T2 nas células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos, e no T2 entre a adjacente aos *brackets* metálicos e cerâmicos (Fig 3).

Após a instalação dos *brackets* houve aumento significativo do valor da CA ($p < 0,01$), tanto para as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos

como para a adjacente aos metálicos. No entanto, a CA da adjacente aos *brackets* metálicos apresentou valor maior que a adjacente aos cerâmicos, embora não significante ($p>0,05$).

Quando os *brackets* foram removidos, o valor da CA das células da mucosa adjacente aos *brackets* cerâmicos tendeu retornar ao valor de T0. Por outro lado, o valor da CA das células da mucosa adjacente aos *brackets* metálicos diminuiu estatisticamente em relação a T1, embora ainda permanecesse maior do que T0 ($p<0,01$).

Com relação à variável N/C independente do gênero, observou-se diferença significativa entre todas as variáveis ($p<0,01$), com exceção entre T0 e T2 nas células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos (Fig 4).

Após a instalação dos *brackets* houve diminuição significativa do valor da N/C ($p<0,01$), tanto para as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos como para a adjacente aos metálicos. No entanto, a N/C as células da mucosa adjacente aos *brackets* metálicos apresentou valor menor que a adjacente aos cerâmicos ($p<0,01$).

Quando os *brackets* foram removidos, o valor da N/C das células da mucosa adjacente aos *brackets* cerâmicos tendeu retornar ao valor de T0. Por outro lado, o valor da N/C das células da mucosa adjacente aos *brackets* metálicos aumentou em relação a T1, embora ainda permanecesse menor do que T0 ($p<0,01$).

Quando avaliada a influência do gênero nas variáveis estudadas considerando-se todos os tempos e *brackets* simultaneamente, encontrou-se que o valor médio da NA foi maior no gênero masculino ($61,13\mu\text{m}^2$) do que no feminino

($58,67\mu\text{m}^2$) ($p<0,05$). Do mesmo modo, o valor médio da CA foi maior no gênero masculino ($2278\mu\text{m}^2$) do que no feminino ($2189\mu\text{m}^2$) ($p<0,05$). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa quando avaliada a N/C ($p>0,05$).

Análise Citomorfológica

No que diz respeito ao predomínio das células presentes nos esfregaços, de acordo com a sua coloração, não foi encontrado nenhum esfregaço com predominância de células epiteliais dos estratos espinhoso e basal.

A tabela II apresenta a distribuição dos esfregaços de acordo com o predomínio celular. No T0, a quantidade de esfregaços com predomínio de células superficiais e sub-superficiais foi semelhante. Entretanto, nos T1 e T2 houve maior quantidade de esfregaços com predomínio de células superficiais. Verificou-se diferença significativa entre T0 e T1 nas células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos e metálicos, e T0 e T2 na adjacente aos *brackets* cerâmicos ($p<0,05$).

Nos esfregaços examinados não foram encontradas Classes 0, III, IV e V de Papanicolaou. Foram observadas Classes I e II em todos os tempos de acordo com os *brackets*, não havendo diferença significativa entre os mesmos ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

Nos indivíduos deste estudo não foram inseridos arcos, ligaduras ou elásticos nos *brackets* cerâmicos e metálicos, evitando assim que estes materiais pudessem causar viés nos resultados encontrados.²² Entretanto, sabe-se que estes acessórios são rotineiramente utilizados no tratamento, e podem proteger a mucosa bucal da fricção direta com o *bracket*. As ulcerações na mucosa bucal são

reclamações freqüentes em pacientes ortodônticos. Estudos indicam que aproximadamente de 76%⁸ a 95%⁹ dos pacientes relatam úlceras na mucosa bucal durante o tratamento, sendo que apenas entre 16,5%⁹ a 21,1%⁸ dos pacientes relataram úlceras uma vez apenas no tratamento.

Dentro deste conceito, como o epitélio de revestimento bucal está sujeito a agentes agressores, no caso os *brackets*, capazes de provocar alterações freqüentes durante o tratamento, o uso da citologia esfoliativa pode ser um eficiente exame de diagnóstico para avaliar e detectar estas alterações, se suas limitações forem bem esclarecidas e aplicadas.^{23,24} O clínico deve estar ciente de que nesta técnica, as células são estudadas individualmente e não podem ser avaliada a sua conformação tecidual como na biópsia,²³ além de somente serem coletadas células das camadas mais superficiais do epitélio.²⁵ Entretanto, quando a coleta das células é realizada através de escovas, células de todo o epitélio escamoso estratificado da mucosa bucal podem ser obtidas,^{11,26,27} além de proporcionar uma distribuição mais dispersa, fina e homogênea das células nas lâminas.²⁸

No presente estudo verificou-se que a instalação de *brackets* na cavidade bucal provocou diminuição do núcleo, aumento do citoplasma e diminuição da relação núcleo-citoplasma das células epiteliais que mantiveram contato com os mesmos, em concordância com Shabana et al²⁹ que também encontraram aumento estatisticamente significativo do tamanho das células de lesões brancas ceratinizadas traumáticas quando comparado com o de células normais da mucosa bucal.

Entretanto, em estudos em que foram avaliadas as células da mucosa bucal de indivíduos com lesões malignas^{13,15} ou fumantes^{14,17} por meio de a citologia esfoliativa foram encontradas alterações celulares distintas com as do presente estudo. Em indivíduos com o hábito de mascar tabaco e naqueles com o hábito de fumar associado a mascar tabaco observou-se aumento do diâmetro do núcleo e diminuição do diâmetro da célula,¹⁷ assim como nas amostras de indivíduos com neoplasias malignas no assoalho da boca em que se verificou aumento da área do núcleo e diminuição da área do citoplasma.¹⁵ Cowpe et al¹³ não encontraram alteração no tamanho do núcleo em amostras de lesões da mucosa bucal e do assoalho bucal, entretanto observaram diminuição da área do citoplasma em lesões da mucosa bucal. Ogden et al¹⁴ somente observaram aumento da área do núcleo de células da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não notaram alteração na área do citoplasma.

As células normais da mucosa bucal apresentam citoplasma abundante e núcleo único, pequeno e centralizado, enquanto as células malignas apresentam núcleo largo e grosseiro, ocupando uma larga área do citoplasma, cromatina bem corada e a membrana que reveste o núcleo é irregular.²³ Dentro deste conceito, as alterações celulares ocorridas na mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos e cerâmicos no presente estudo não sugerem malignidade, diagnóstico este confirmado pela avaliação dos critérios citológicos de malignidade em que se observaram somente esfregaços Classes I e II de Papanicolaou.

As alterações nos tamanhos do núcleo e do citoplasma verificadas no presente estudo sugerem um quadro histológico de hiperparaceratose do epitélio escamoso estratificado da mucosa bucal adjacente aos *brackets*. Esta reação

epitelial causa aumento no número de células da camada córnea do epitélio, as quais apresentam citoplasma abundante e núcleos menores que as células das camadas mais profundas. Esta hiperparaceratose pode ser confirmada pelo aumento da quantidade de esfregaços com predomínio de células superficiais 60 dias após a instalação dos *brackets* e 30 dias após a remoção dos mesmos, quando comparados com o dia zero.

Neste estudo também se observou que as alterações no núcleo foram maiores nas células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos do que aos cerâmicos. Trinta dias após a remoção dos *brackets* foi verificado que as células da mucosa bucal que mantiveram contato com os *brackets* metálicos ainda apresentavam o núcleo diminuído, o citoplasma aumentado e a relação núcleo-citoplasma diminuída, embora com menor alteração que 60 dias após a instalação. Entretanto, as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos já haviam retornado ao tamanho inicial 30 dias após a remoção destes.

As alterações celulares maiores no lado dos *brackets* metálicos sugerem que o *bracket* utilizado neste estudo, de aço inoxidável 17-4, pode ter causado mais traumatismo na mucosa bucal devido às suas características físicas, ou seja, aletas menos arredondadas que as dos *brackets* cerâmicos, ou devido à citotoxicidade do aço inoxidável já observada em outros estudos.^{6,30-33}

As células epiteliais da mucosa, do presente estudo, foram avaliadas somente 30 dias após a remoção dos *brackets*, uma vez que Jones et al²⁴ preconizaram que se uma lesão persiste por mais de 14 dias mesmo após a remoção dos fatores etiológicos, a biópsia deve ser realizada imediatamente. Sendo assim, em 30 dias, as células já deveriam ter retornado a sua conformação

normal. Considerando que o tempo médio de tratamento ortodôntico é de aproximadamente 24 meses, sugere-se que em próximos estudos, estas células sejam analisadas após um período maior, para que se possa observar se estas alterações persistem e, ainda, se tornam malignizáveis.

No presente estudo também foi encontrado que o tamanho do núcleo e do citoplasma das células epiteliais da mucosa bucal foi maior no gênero masculino do que no feminino, contrário ao estudo de Cowpe et al²⁹ que não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os gêneros. Entretanto, este autor utilizou a citologia esfoliativa convencional, o que pode explicar os resultados contraditórios com os do presente estudo, uma vez que foi utilizada a citologia em base líquida a qual aprimora a visualização da morfologia celular.¹²

Este é o primeiro estudo a descrever alterações celulares da mucosa bucal adjacente a *brackets* metálicos e cerâmicos. Antes disto, os ortodontistas não tinham como se defender de alegações que relacionassem o uso de *brackets* ao câncer bucal. Como os *brackets* são componentes essenciais dos aparelhos ortodônticos fixos corretivos, requerem biocompatibilidade para não causar efeitos deletérios irreversíveis aos tecidos. Apesar de os resultados desta pesquisa sugerirem que *brackets* causam alterações não malignizáveis, ainda persiste a dúvida quanto à etiologia destas alterações. Futuras pesquisas a este respeito, auxiliariam a descoberta de meios para evitá-las.

CONCLUSÕES

- as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos e cerâmicos sofrem diminuição do núcleo, aumento do citoplasma e diminuição da relação núcleo-citoplasma, não sugerindo malignidade;

- as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos apresentam maiores alterações no núcleo do que as adjacentes aos *brackets* cerâmicos;
- as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos permanecem alteradas 30 dias após a remoção dos mesmos;
- as células da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos e cerâmicos tendem a retornar ao tamanho inicial após a remoção dos mesmos;
- há predomínio de células superficiais nos esfregaços da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos e cerâmicos 60 dias após a colagem, e da mucosa bucal adjacente aos *brackets* cerâmicos 30 dias após a remoção dos mesmos;
- os esfregaços da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos e cerâmicos são classificados como normais ou normais com alterações inflamatórias;
- o tamanho do núcleo e do citoplasma das células da mucosa jugal é maior no gênero masculino.

REFERÊNCIAS

1. Sukontapatipark W, El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001;23:475-84.
2. Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Gluca MR, Gabriele M, Campa M, Senesi S. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonization by mutans streptococci in children. *Eur J Orthod* 2001;109:388-92.
3. Hägg U, Kaveewatchranont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. *Eur J Orthod* 2004;26:623-9.

4. Bishara SE. Oral lesions caused by an orthodontic retainer: a case report. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;108:115-7.
5. Atack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontics appliances. A review. *J Periodontol* 1996;67:78-85.
6. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:687-94.
7. Mackenzie IC, Ettinger RL. Differences in the response of rodent oral mucosa and skin repeated surface trauma. *J Prosthet Dent* 1975;34:666-74.
8. Kvam E, Gjerdet NR, Bondevik O. Traumatic ulcers and pain during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987;15:104-7.
9. Kvam E, Bondevik O, Gjerdet NR. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989;17:154-7.
10. Macluskey M, Ogden GR. An overview of the prevention of oral cancer and diagnosis markers of malignant change: 2 Markers of value in tumour diagnosis. *Dent Update* 2000;27:148-52.
11. Kahn MA. Oral exfoliative cytology procedures: conventional, brush biopsy and thintrep. *J Tenn Dent Assoc* 2001;81:17-20.
12. Hayama FH, Motta ACF, Silva APG, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:115-22.
13. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J R Soc Med* 1988;81:509-13.

14. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-5.
15. Mollaoglu N, Cowpe JG, Walker R. Cytomorphologic analysis of Papanicolaou stained smears collected from floor of the mouth mucosa in patients with or without oral malignancy. *Turk J Med Sci* 2001;31:225-8.
16. Alberti S, Spadella CT, Francischone TRCG, Assis GF, Cestari TM, Taveira LAA. Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* 2003;32:538-43.
17. Ramaesh T, Mendis BRRN, Ratnatunga N, Thattil RO. The effect of tobacco smoking and of betel chewing with tobacco on the buccal mucosa: a cytomorphometric analysis. *J Oral Pathol Med* 1999;28:385-8.
18. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med* 1997;26:201-5.
19. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: na age, site and sex-related survey. *J R Soc Med* 1985;78:995-1004.
20. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent J* 1996;41:71-4.
21. Lange DE, Meyer M, Hahn W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bollous lesions. *J Periodontol* 1972,43:433-7.
22. Kluemper GT, Hiser DG, Rayens MK, Jay MJ. Efficacy of a wax containing benzocaine in the relief of oral mucosal pain caused by orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002;122:359-65.
23. Bernstein ML, Miller RL. Oral exfoliative cytology. *JADA*, 1978;96:625-9.

24. Jones AC, Migliorati CA, Stewart CM. Oral cytology: indications, contraindications, and technique. *Gen Dent* 1995;Jan-Feb:74-7.
25. Folsom TC, White CP, Bromer L, Canby HF, Garrington GE. Oral exfoliative study. Review of the literature and report of a three-year study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33:61-74.
26. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J Am Dent Assoc* 1999;130:1445-57.
27. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006;23:5-11.
28. Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The cytobrush plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:101-4.
29. Shabana AHM, El-Labban NG, Lee KW, Kramer IRH. Morphometric analysis of suprabasal cells in oral white lesions. *J Clin Pathol* 1989;42:264-70.
30. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A, Kullmann A. Cytotoxic effect of orthodontic appliances. *Eur J Orthod* 1992;14:47-53.
31. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A. Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. *Scand J Dent Res* 1993; 101:229-31.
32. David A, Lobner D. *In vitro* cytotoxicity of orthodontic archwires in cortical cell cultures. *Eur J Orthod* 2004;26:421-6.
33. Oh KT, Choo SU, Kim KM, Kim KN. A stainless steel bracket for orthodontic application. *Eur J Orthod* 2005;27:237-44.

TABELAS

Tabela I - Média e desvio padrão da ANOVA segundo *bracket* e tempo

Variáveis	NA	CA	N/C
T0	63,39 $\mu\text{m}^2 \pm 19,23$	2015,05 $\mu\text{m}^2 \pm 696,75$	0,03 $\pm 0,01$
T1 Cerâmico	57,92 $\mu\text{m}^2 \pm 19,79$	2406,09 $\mu\text{m}^2 \pm 642,18$	0,03 $\pm 0,01$
T1 Metálico	53,00 $\mu\text{m}^2 \pm 17,37$	2473,93 $\mu\text{m}^2 \pm 621,03$	0,02 $\pm 0,01$
T2 Cerâmico	63,68 $\mu\text{m}^2 \pm 20,89$	2041,44 $\mu\text{m}^2 \pm 639,44$	0,03 $\pm 0,01$
T2 Metálico	59,4 $\mu\text{m}^2 \pm 20,30$	2155,40 $\mu\text{m}^2 \pm 677,04$	0,03 $\pm 0,01$

Tabela II - Quantidade de esfregaços de acordo com o predomínio celular

Tempo	Superficial	Sub-superficial	Espinhosa	Basal
T0	10	11	0	0
T1 Cerâmico	17	4	0	0
T1 Metálico	19	2	0	0
T2 Cerâmico	18	3	0	0
T2 Metálico	16	5	0	0

FIGURAS

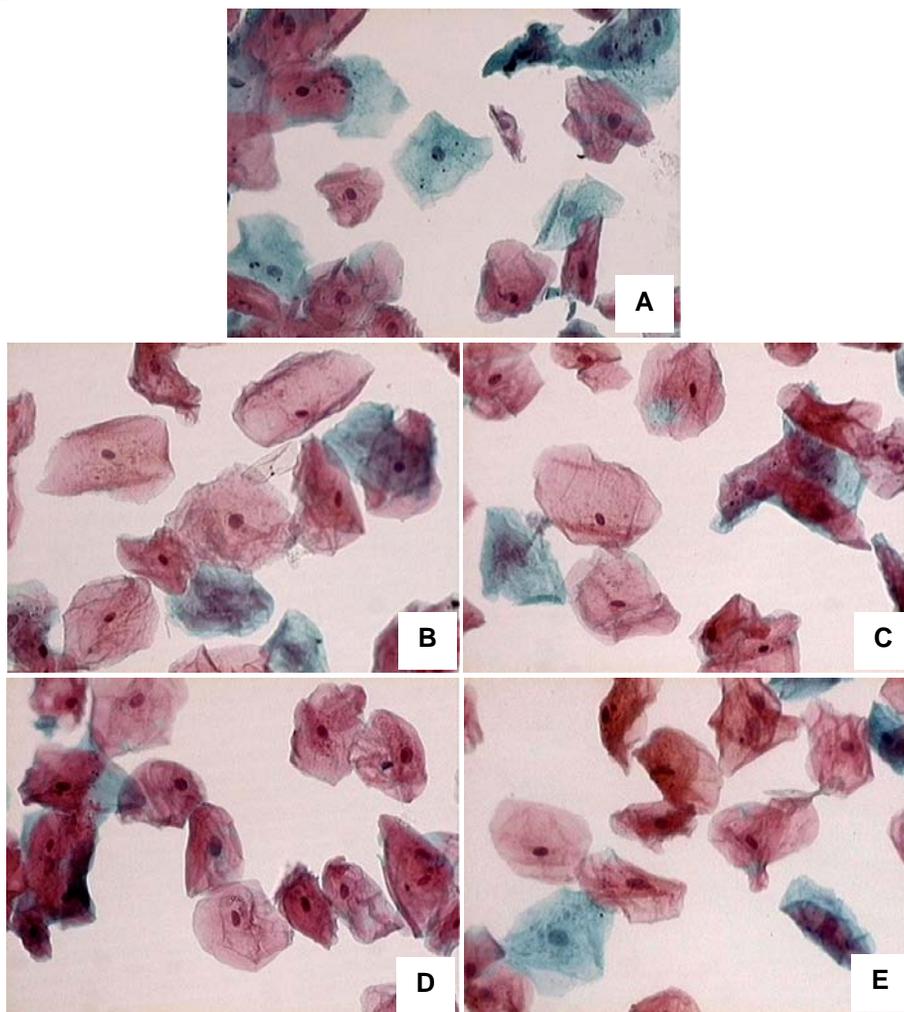


Fig 1 **A.** Células epiteliais da mucosa bucal clinicamente saudável em T0. **B.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* metálicos em T1. **C.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* cerâmicos em T1. **D.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* metálicos em T2. **E.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* cerâmicos em T2.
(Papanicolaou-400X)

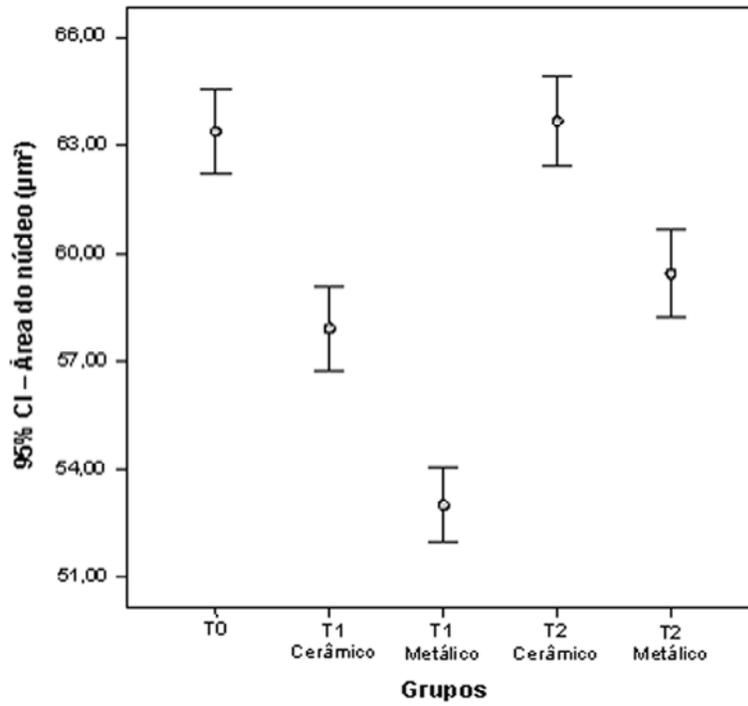


Fig 2. Valores médios da área do núcleo segundo *bracket*/tempo.

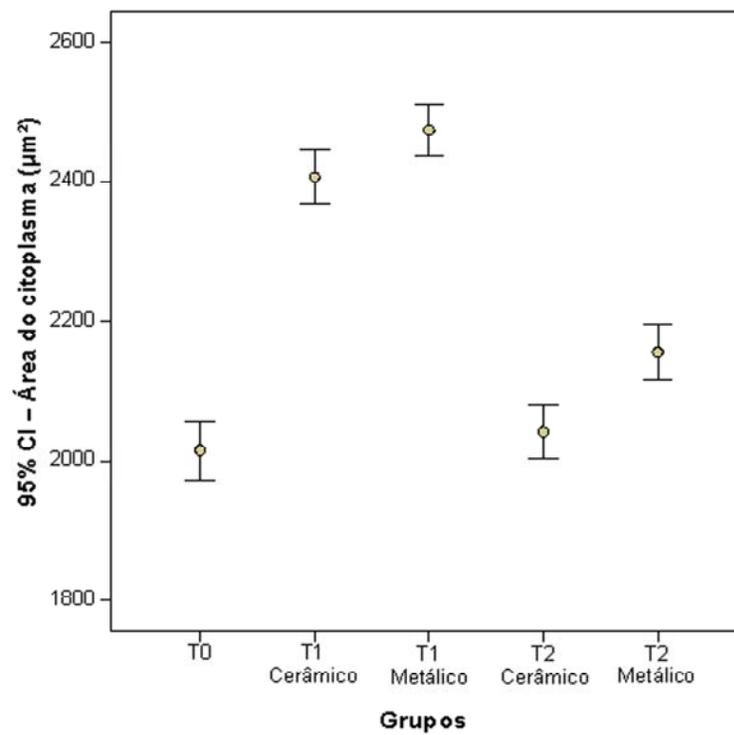


Fig 3. Valores médios da área do citoplasma segundo *bracket*/tempo.

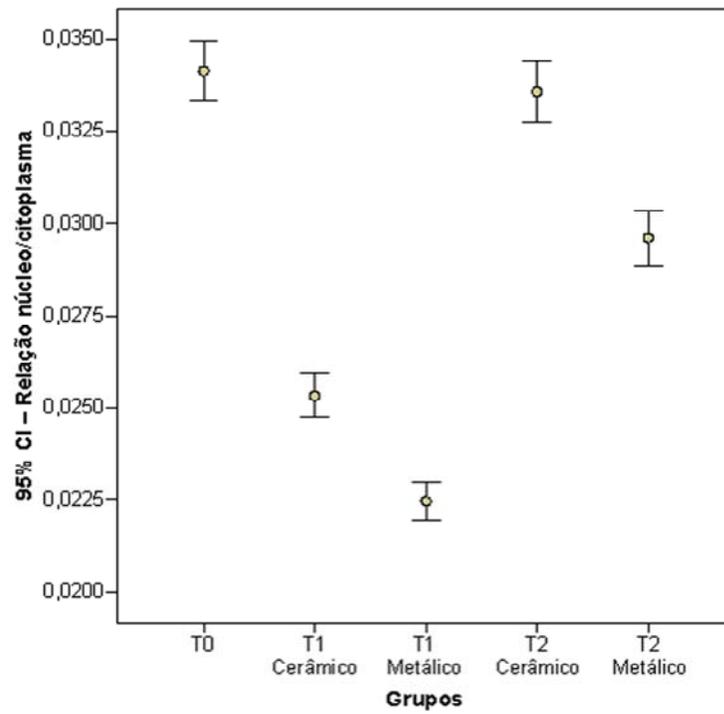


Fig 4. Valores médios da relação núcleo-citoplasma segundo *bracket*/tempo.

TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 10 de novembro de 2005.

Of. 493/05/CEP-PUCPR

Ref. **"A influência de Brackets metálicos e cerâmicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e fúngica"**

Prezado (a) Pesquisador

Venho por meio deste, informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 09 de novembro do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado **"A influência de Brackets metálicos e cerâmicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e fúngica"** pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 887 e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.
Elissa Souza Camargo

3. ANEXOS

ANEXO I – Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, sob registro no CEP nº 887 (Anexo IV, página 73).

Amostra

Os indivíduos que procuraram a Clínica de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná para a realização de tratamento odontológico foram convidados a participar deste estudo antes do início do seu tratamento. Os objetivos específicos desta pesquisa foram explicados de forma detalhada a cada indivíduo e responsável (se menor), e quando houve concordância da participação, o(s) mesmo(s) assinou(aram) um termo de consentimento de participação na pesquisa (Anexo V, página 74).

Somente foram selecionados indivíduos com ausência de história de tabagismo e etilismo, diabetes, anemia, doenças debilitantes e tratamento com antibióticos ou esteróides no período do estudo, que não fossem usuários de enxaguatórios bucais à base de álcool, portadores de próteses ou dentes com restaurações com bordas cortantes, e que não apresentassem qualquer tipo de lesão na mucosa bucal. Portanto, a amostra deste estudo foi composta de 22 indivíduos brasileiros, com idades entre 7,6 e 53,7 anos, 7 do gênero masculino e 15 do gênero feminino. A idade média dos indivíduos foi de 14 anos.

Benefícios

Todos os indivíduos que participaram da amostra da pesquisa receberam como benefício profilaxia dental e aplicação tópica de flúor, após a remoção dos *brackets* ortodônticos.

Colagem dos brackets

Os locais de escolha para a fixação dos *brackets* foram: segundo molar decíduo, segundo pré-molar, primeiro e segundo molar permanentes, todos na arcada superior. Os dentes escolhidos variaram em função do estágio da dentição que cada um se encontrava no momento da colagem.

Em cada indivíduo foram colados 4 *brackets* (Figura 1A), dois *brackets* metálicos *standard edgewise* Dyna-lock™¹ do lado direito (Figura 1B) e dois *brackets* cerâmicos *standard edgewise* Transcend™ Series 6000² do lado esquerdo (Figura 1C).

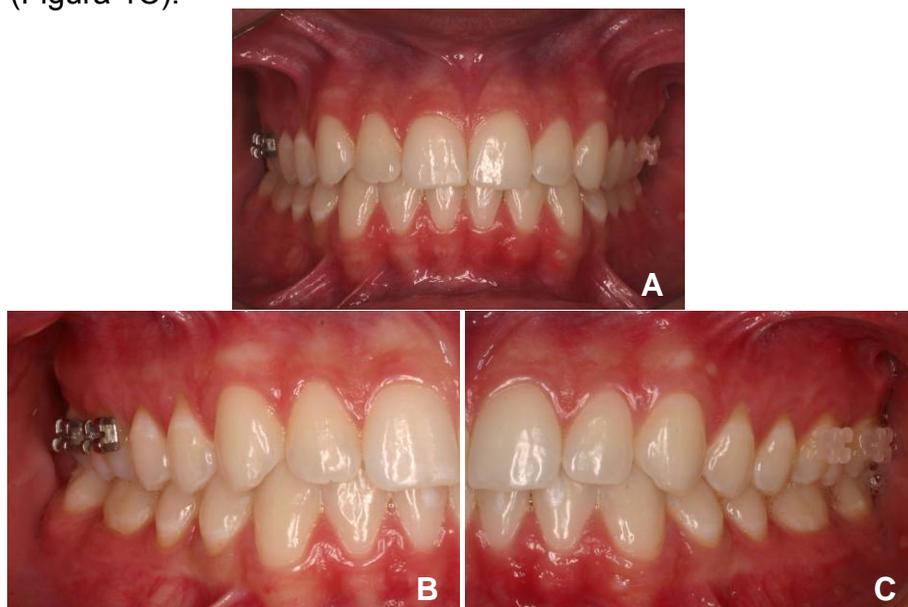


Figura 1. A, B e C. *Brackets* metálicos e cerâmicos colados no dentes póstero-superiores.

Para a colagem dos *brackets*, foi realizada a limpeza da superfície vestibular dos dentes, objetivando a remoção da placa bacteriana e da película adquirida, com escova de Robson, pedra-pomes e água por 20 segundos. Após isolar o campo de trabalho com afastador e rolos de algodão para controle salivar,

¹ 3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, USA.

² 3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, USA.

o ácido fosfórico a 37%, Cond Ac 37[®],³ foi aplicado para condicionar a superfície do esmalte por 30 segundos nos dentes permanentes⁴ e 60 segundos nos decíduos,⁵ seguido de enxágüe abundante com água. Após os dentes estarem completamente secos, o selante do *kit* do Transbond XT[®],⁶ foi aplicado com a ajuda de um *microbrush*. Os *brackets* foram posicionados com uma pinça clínica e fixados ao esmalte dentário por meio do compósito resinoso Transbond XT[®]. O excesso deste compósito foi removido com o auxílio de uma sonda exploradora, e posteriormente foi realizada sua polimerização conforme as especificações do fabricante.

Citologia em base líquida

A coleta das células epiteliais foi realizada em três tempos, por um único operador: dia zero (T0), 60 dias após a colagem (T1) e 30 dias após a remoção dos *brackets* (T2). O dia zero foi utilizado como controle, sendo coletadas células de uma mucosa jugal clinicamente saudável.

Para a realização desta coleta, os pacientes foram orientados a realizar bochechos com água por 30 segundos, para a remoção de possíveis restos alimentares. A coleta de células foi realizada com o *kit* do sistema DNA-CITOLIQ[®],⁷ denominado *Universal Collection Medium* (UCM), cujo registro no Ministério da Saúde está sob o número 10322550015. Este *kit* é composto por um

³ FGM, Joinville, Brasil.

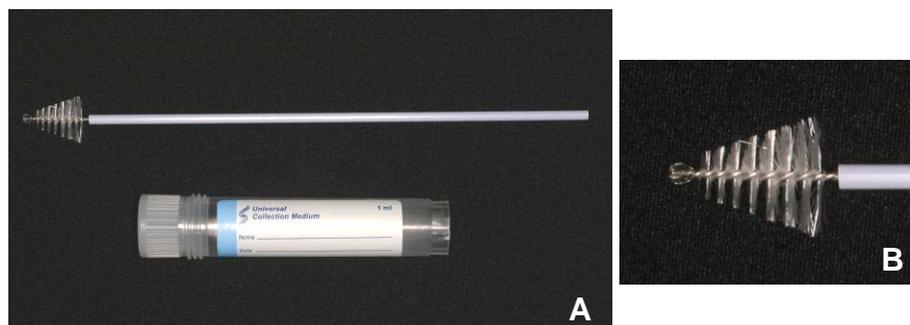
⁴ VICENTE A, BRAVO LA, ROMERO M, ORTÍZ AJ, CANTERAS M. Effects of 3 adhesion promoters on the shear bond strength of orthodontic brackets: an in-vitro study. Am J Orthod Dentofacial Orthop. v.129, n. 3, p. 390-395, Mar/2006.

⁵ ALTOUNIAN, G. Bonding and primary teeth. Orthod Fr. v. 73, n. 4, p. 407-413, 2002.

⁶ 3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, USA.

⁷ Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

frasco, contendo 1ml de UCM e uma escova citológica com cabo longo (Figuras 2 A e B). A solução UCM é composta por N-Butanol, polietilenoglicol, ácido acético glacial, azida sódica, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) qsq e água deionizada qsq.



Figuras 2.A. *Kit do sistema DNA-CITOLIQ[®].*

B. *Escova do kit.*

A coleta das células da mucosa estudada foi obtida por meio da aplicação da escova, de modo que as cerdas maiores tocassem a região escolhida (Figura 3, página 56), de forma suave e em movimentos giratórios no sentido horário (cinco voltas). Com o frasco já aberto, foi acondicionada a escova com o material coletado em seu interior sempre observando se a escova estava totalmente imersa pela solução UCM (Figura 4, página 56). Quebrou-se o cabo da escova no local pré-determinado pelo fabricante e fechou-se o frasco, agitando-o por um período de 30 segundos para permitir que o material coletado (células) ficasse imerso no meio líquido. A escova permaneceu imersa neste líquido com o frasco tampado até o processamento histológico. As amostras foram acondicionadas em meio refrigerado (2°C a 8°C) por no máximo 30 dias, embora conforme instruções do fabricante as amostras pudessem ficar armazenadas nestas condições por até seis meses.



Figura 3. Coleta das células da mucosa com a escova.



Figura 4. Escova sendo imersa na solução UCM.

Uma cartela contendo 12 lâminas histológicas (*Lamigene*[®])⁸ foi adaptada numa prensa metálica (*Prepgene*[®])⁹ juntamente com um filtro especial contendo uma membrana de policarbonato (*Filtrogene*[®])¹⁰. As lâminas foram previamente identificadas com o nome do indivíduo, momento e lado da coleta. Para a transferência das células contidas no líquido, inicialmente os frascos foram

⁸ Digene do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

⁹ Digene do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

¹⁰ Digene do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

colocados no UCM *rack* (Figura 5). A seguir, cada frasco foi homogeneizado através da colocação do mesmo sobre um aparelho agitador de tubos, denominado Vortex¹¹ (Figura 6), em alta velocidade e por tempo mínimo de 20 segundos. Antes de pipetar a amostra, cada frasco foi homogeneizado por mais 5 segundos e então uma alíquota de 200µL foi transferida do interior do frasco para o Filtrogene[®] com o auxílio de uma pipeta (Figura 7) e depois Prepgene[®] foi fechada por aproximadamente 10 segundos (Figura 8), havendo, ao final, o *imprint* do material sobre a lâmina (Figura 9, página 58).

O material disposto sobre as lâminas foi fixado pela imersão das lâminas em uma solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos. A seguir, foi procedida a coloração das mesmas com a técnica de Papanicolaou modificada conforme segue o Quadro 1 (página 58).

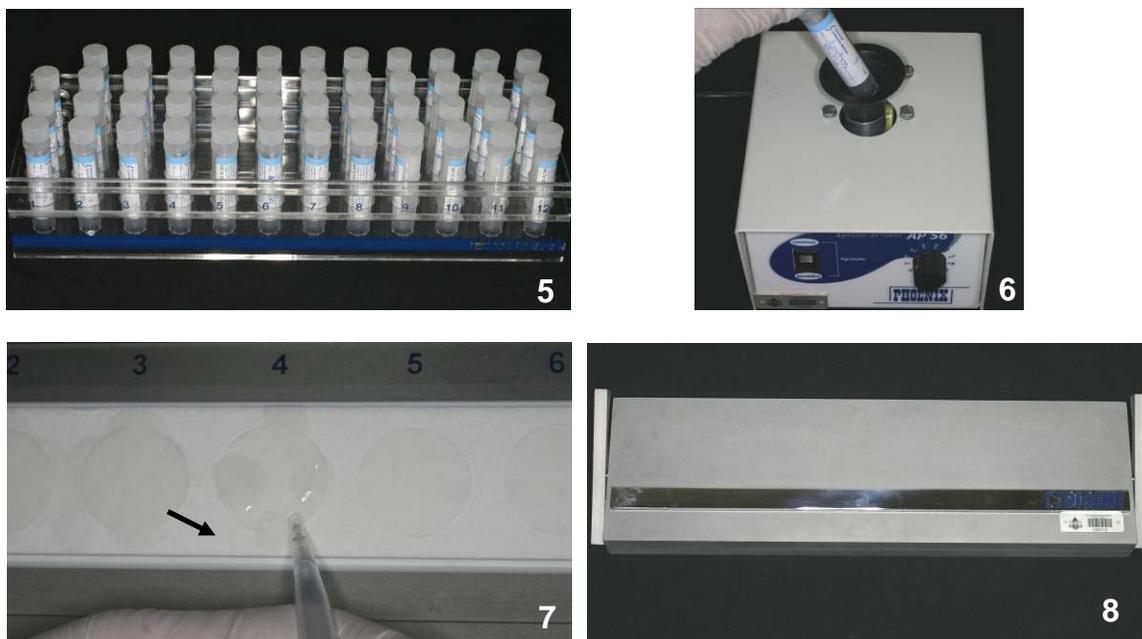


Figura 5. Frascos posicionados no UCM *rack*; **Figura 6.** Frasco sendo homogeneizado no Vortex; **Figura 7.** Transferência do meio líquido com as células coletadas para o *Filtrogene*[®] com o auxílio da pipeta; **Figura 8.** *Prepgene*[®].

¹¹ Vortex Bionatic[®], 2.500 rpm.



Figura 9. *Imprint* das células epiteliais sobre as lâminas.

QUADRO 1- TÉCNICA DA COLORAÇÃO PAPANICOLAU		
SEQÜÊNCIA	SUBSTÂNCIA QUÍMICA	PROCEDIMENTO
1	Álcool etílico 80%	10-15 mergulhadas
2	Álcool etílico 70%	10-15 mergulhadas
3	Álcool etílico 50%	10-15 mergulhadas
4	Água destilada	10-15 mergulhadas
5	Hematoxilina Harris	1 minuto
6	Água corrente	2 minutos
7	HCL 0.5% em água destilada	2 mergulhadas
8	Água corrente	2 minutos
9	Álcool etílico 50%	10-15 mergulhadas
10	Álcool etílico 70%	10-15 mergulhadas
11	Álcool etílico 80%	10-15 mergulhadas
12	Álcool absoluto	10-15 mergulhadas
13	OG 36	1 minuto
14	Álcool absoluto	10-15 mergulhadas
15	Álcool absoluto	10-15 mergulhadas
16	Álcool absoluto	10-15 mergulhadas
17	EA-36	1 minuto
18	Álcool absoluto	10 mergulhadas
19	Álcool absoluto	10 mergulhadas
20	Álcool absoluto	10 mergulhadas
21	Álcool absoluto	10 mergulhadas
22	50/50 Xilol e álcool	10-15 mergulhadas
23	Xilol	10-15 mergulhadas
24	Xilol	10-15 mergulhadas
25	Xilol	10-15 mergulhadas
26	Xilol	10-15 mergulhadas

FONTE: Sistema DNA-CITOLIQ, 2002.

Análise citomorfométrica

A análise dos esfregaços foi realizada por meio de microscopia de luz utilizando-se um microscópio binocular, modelo Olympus BX50¹² adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65¹³ (Figura 11, página 60). Previamente à leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés. Cinquenta células de cada lâmina foram examinadas aleatoriamente. Evitou-se áreas em que as células se encontravam visualmente dobradas e/ou aglomeradas, o que dificultaria a delimitação destas. A imagem dos campos citológicos foi capturada em uma ampliação de 400 vezes (Figuras 12 A, B, C, D e E, página 61), por uma câmera Sony CCD Íris Color Video, modelo DXC-107A.¹⁴ A avaliação das células foi feita através do sistema de análise de imagens *Image Pro Plus*, versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000.¹⁵ Após as imagens serem salvas no computador, foram delimitados o núcleo e o citoplasma da célula, usando-se o cursor digitador.¹⁶ Posteriormente, com a placa no modo de medida, as áreas nucleares (NA) e citoplasmáticas (CA) foram obtidas (Figura 13, página 62). Os valores das NA e CA foram tabulados no programa Microsoft Excel, e foi então obtida a relação núcleo/citoplasma (N/C) de cada célula.

Análise citomorfológica

O método de coloração Papanicolaou, diferencia as células epiteliais de acordo com o grau de ceratinização dentro das células. Isto ocorre devido à

¹² Olympus® BX50, Japão.

¹³ Olympus®, Japão.

¹⁴ Sony Electronics Inc., USA.

¹⁵ Media Cybernetics. Inc., USA.

¹⁶ OGDEN GR, COWPE JG, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. J Oral Pathol Med. v. 19, p.53-55, 1990.

afinidade dos corantes (verde claro-EA36, hematoxilina e Orange G) com os constituintes citoplasmáticos, por exemplo, a ceratina. Durante a maturação das células epiteliais ocorre um aumento na quantidade de ceratina, o que torna o citoplasma mais denso. Dessa maneira, os corantes “grandes” (EA-36) acabam penetrando apenas nos citoplasmas menos densos, presentes nas células imaturas. Enquanto que os corantes “pequenos” (Orange G e hematoxilina) são capazes de penetrar no citoplasma denso das células ceratinizadas.¹⁷



Figura 11. Microscópio binocular, modelo Olympus BX50 adaptado a uma câmera Sony CCD Íris Color Video, modelo DXC-107A.

¹⁷ WILLIAMS DW, WALKER R, LEWIS MA, ALLISON RT, POTTS AJ. Adherence of *Candida albicans* to oral epithelial cells differentiated by Papanicolaou staining. *J Clin Pathol.* v. 52, n. 7, p. 529-531, July/1999.

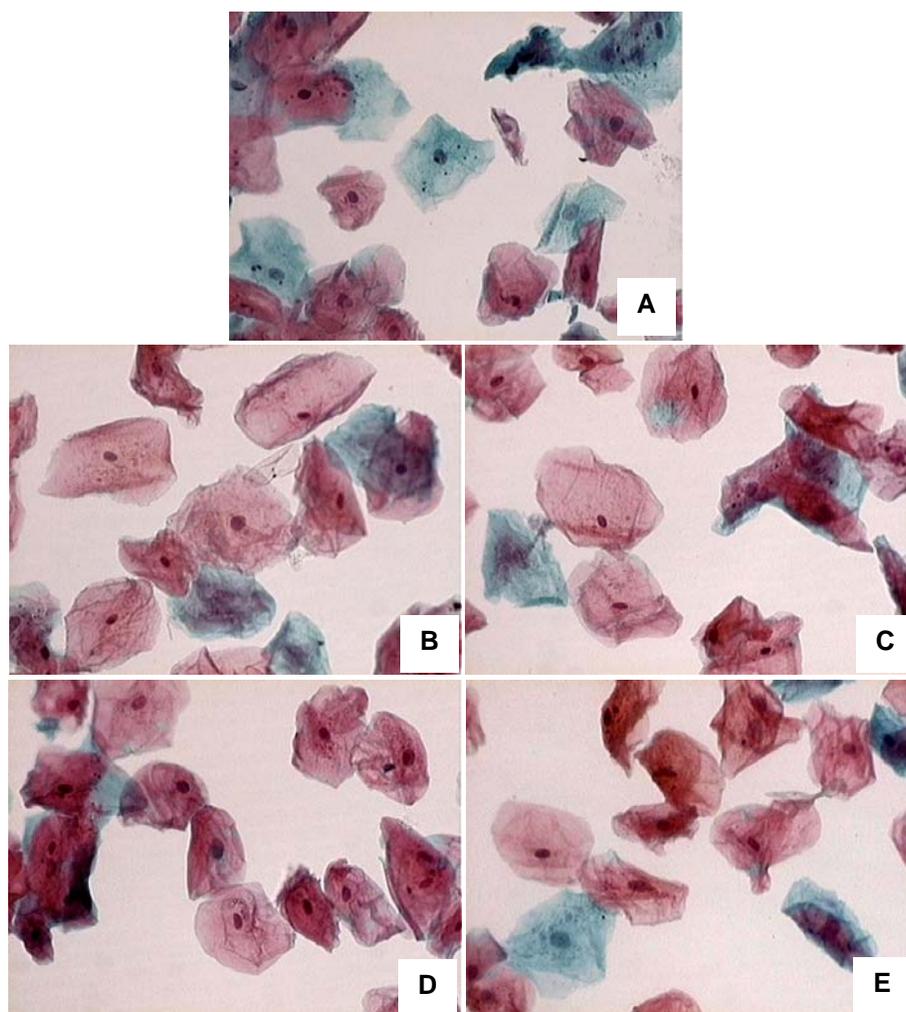


Fig 12 **A.** Células epiteliais da mucosa bucal clinicamente saudável em T0. **B.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* metálicos em T1. **C.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* cerâmicos em T1. **D.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* metálicos em T2. **E.** Células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* cerâmicos em T2.
(Papanicolaou-400X)

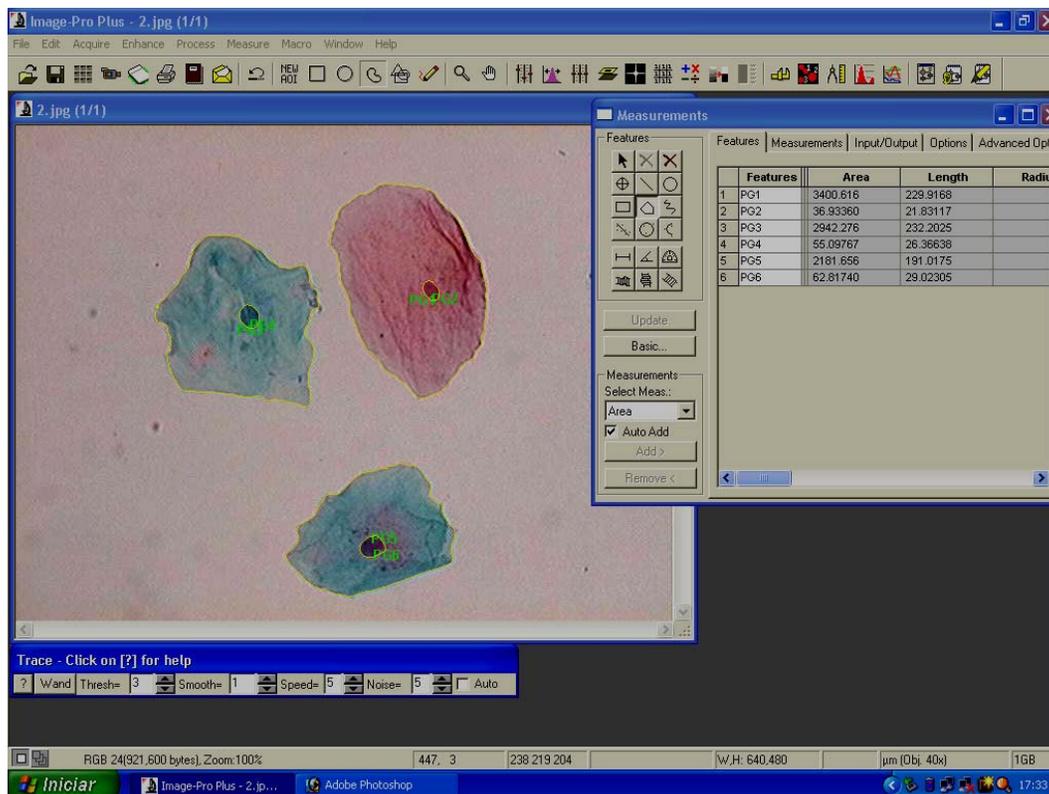


Figura 13. Medição da NA e da CA por meio do sistema de análise de imagens *Image Pro Plus*, versão 4.5.029.

A análise citomorfológica foi realizada utilizando-se o mesmo microscópio binocular, entretanto, adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 10X/0,25, 20X/0,40 e 40X/0,65. Os esfregaços foram percorridos em toda sua extensão, e classificados segundo o predomínio das células presentes (Figuras 14 e 15, página 63), de acordo com Sugerman e Savage em 1996¹⁸ (Quadro 2, página 64).

¹⁸ SUGERMAN PB, SAVAGE NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. Aust Dent J. v. 41, n. 2, p. 71-71, Apr/1996.

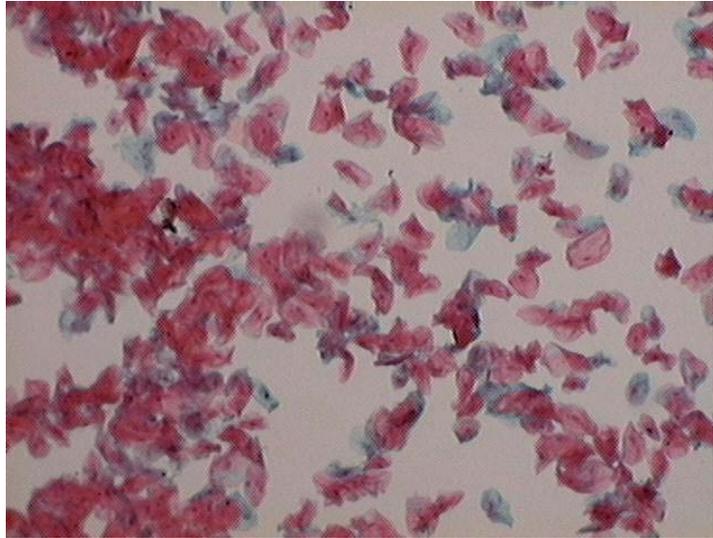


Figura 14. Lâmina com predomínio de células superficiais.
(Papanicolaou -100X)

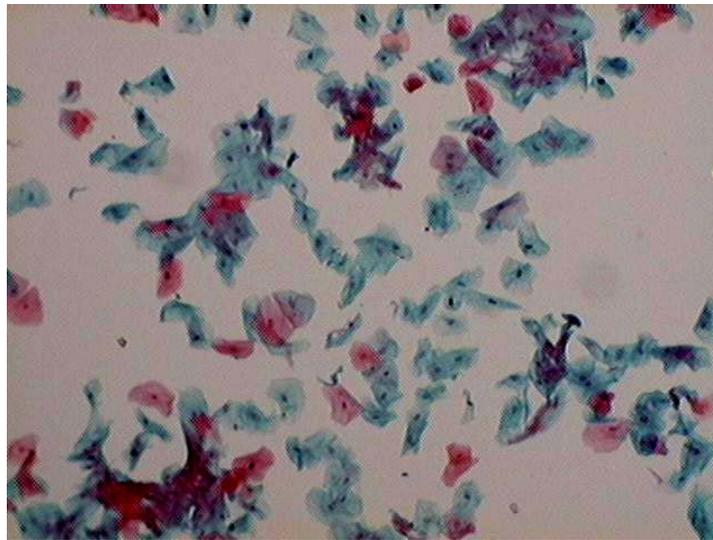


Figura 15. Lâmina com predomínio de células sub-superficiais.
(Papanicolaou-100X)

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DA MUCOSA BUCAL NORMAL DE ACORDO COM A COLORAÇÃO PAPANICOLAOU

	CAMADA	CITOPLASMA	NÚCLEO
Superficial	Estrato córneo	vermelho/laranja/marrom	anucleada
	Não ceratinizado	vermelho/laranja quadrilátero	azul picnótico/achatado
Sub-superficial	Estrato granuloso	azul esverdeado/rosa/laranja grânulos de ceratohialina	azul escuro
	Não granular	azul esverdeado/rosa/laranja quadrilátero	azul escuro
Estrato espinhoso		azul esverdeado/rosa/laranja ovóide	azul largo
Estrato basal		verde/azul esverdeado ovóide e pequeno	azul redondo
FONTE: Sugerman e Savage (1996)			

Os esfregaços também foram avaliados qualitativamente buscando identificar critérios citológicos de malignidade, sendo classificados de acordo com Papanicolaou¹⁹ em:

- Classe 0 – material insuficiente ou inadequado para análise.
- Classe I (esfregaço normal) – as células observadas apresentam padrão morfológico normal em todo o esfregaço.
- Classe II (esfregaço normal com alterações inflamatórias) – o esfregaço apresenta células inflamatórias em pelo menos dois campos. Presença de alterações citológicas tais como: mudança da relação núcleo-citoplasma em favor do núcleo, células multinucleadas, presença de halos perinucleares. O núcleo e citoplasma das células continuam apresentando características benignas (Figura 16, página 66).
- Classe III (alterações displásicas – esfregaço suspeito) – o esfregaço apresenta alterações celulares em até dois campos. São consideradas

¹⁹ LANGE DE, MEYER M, HAHN W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bullous lesions. J Periodontol. v. 43, n. 7, p. 433-437, July/1972.

células displásicas aquelas cujos núcleos apresentem alguns critérios de malignidade, mas que mantenham o citoplasma com aspecto normal. As alterações consideradas são: discreta hipercromasia nuclear, núcleos levemente aumentados (o maior diâmetro do núcleo é bem menor que o do citoplasma), grânulos e cordões de cromatina. Observa-se multinucleação celular com alguma frequência. Na displasia leve, as células são do tipo superficial ou intermediário com raras células parabasais. Em uma displasia severa, as células em sua maioria, são do tipo parabasal ou intermediário de pequeno tamanho.

- Classe IV (fortemente indicativa, mas não conclusiva de malignidade) – presença de alterações celulares em dois ou mais campos. O número de células anormais é maior que nas displasias. Há células malignas imaturas, ou seja, células da camada basal e parabasal redondas ou ovais, com o núcleo em posição central. Podem aparecer células com núcleos volumosos e citoplasma escasso. A membrana nuclear é bem delimitada, a cromatina é irregular ou em grânulos grosseiros. No núcleo há hipercromasia, e pode-se observar multinucleação. O citoplasma pode conter vacúolos.
- Classe V (esfregaço maligno) – presença de alterações celulares compatíveis com neoplasia maligna. O núcleo é hiper cromático, apresenta grânulos grosseiros de cromatina, espaços vazios e acentuado pleomorfismo. Há evidente alteração na proporção núcleo-citoplasma em favor do núcleo, e mitose atípica.

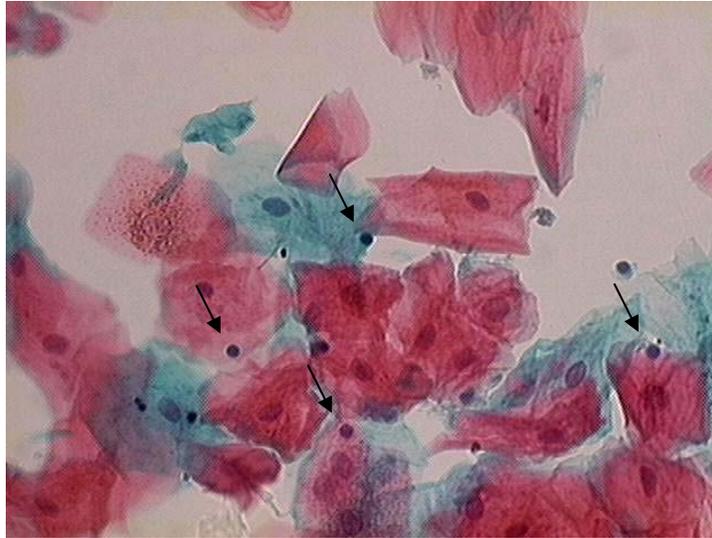


Figura 16. Esfregaço Classe II de Papanicolaou.
↘ Células inflamatórias. (Papanicolaou-400X)

ANEXO II – Análise Estatística

Para verificar se havia diferença entre NA, CA e N/C para os diferentes momentos, independente de gênero, utilizou-se ANOVA com medidas repetidas, a um nível de probabilidade de $p < 0,01$. Quando ANOVA acusou diferença entre os grupos, visando identificar quais diferiam entre si utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey HSD, a um nível de probabilidade de $p < 0,01$.

Para comparar se havia diferença na área do núcleo, do citoplasma e na relação núcleo-citoplasma, entre os gêneros para todos os momentos, utilizou-se o teste “t” de *Student* para amostras independentes, a um nível de probabilidade de $p < 0,05$.

Para a comparação da morfologia celular dos diferentes momentos e *brackets* foi utilizado o teste de McNemar da significância das mudanças, que é um teste não paramétrico para dados emparelhados (amostras dependentes), a um nível de probabilidade de $p < 0,05$.

ANEXO III - Tabelas e Gráficos

TABELA I - TESTE "t" DE STUDENT PARA A VARIÁVEL GÊNERO, PUCPR-2006

VARIÁVEL	t	df	p	DIFERENÇA MÉDIA	DIF. DO ERRO PADRÃO	95% ID	
						INFERIOR	SUPERIOR
NA T0	-0,67009	658,88	0,50304	-0,86050	1,28417	-3,3821	1,6610
NA T1C	-3,31970	1069	0,00093*	-4,23942	1,27705	-6,7452	-1,7336
NA T1M	-3,65634	1069	0,00027*	-4,09386	1,11966	-6,2908	-1,8969
NA T2C	-0,61186	1069	0,54076	-0,82870	1,35441	-3,4863	1,8289
NA T2M	-1,64335	632,00	0,10081	-2,26182	1,37634	-4,9646	0,4409
CA T0	-0,00753	1069	0,99399	-0,34026	45,18469	-89,0010	88,3205
CA T1C	-4,21480	1069	0,00003*	-174,08715	41,30378	-255,1328	-93,0415
CA T1M	-2,15606	645,54	0,03145	-89,93738	41,71373	-171,8484	-8,0264
CA T2C	-0,50380	1069	0,61451	-20,88912	41,46314	-102,2475	60,4693
CA T2M	-3,64902	1069	0,00028*	-159,22792	43,63581	-244,8495	-73,6064
N/C T0	-1,14676	579,88	0,25195	-0,00107	0,00093	-0,0029	0,0008
N/C T1C	0,19422	1069	0,84604	0,00013	0,00065	-0,0012	0,0014
N/C T1M	-2,29605	1069	0,02187*	-0,00126	0,00055	-0,0023	-0,0002
N/C T2C	0,24668	1069	0,80520	0,00023	0,00091	-0,0016	0,0020
N/C T2M	1,90220	1069	0,05741	0,00153	0,00081	0,0000	0,0031

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,05^*$ indica diferença estatisticamente significativa.

LEGENDA: ID - intervalo de confiança / C - cerâmico / M - metálico.

TABELA II - ÁREA DO NÚCLEO SEGUNDO O GÊNERO, PUCPR-2006

MÉDIA		VALOR p
FEMININO	MASCULINO	
58,67	61,13	0,00007*

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,05^*$ indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA III - ÁREA DO CITOPLASMA SEGUNDO O GÊNERO, PUCPR-2006

MÉDIA		VALOR p
FEMININO	MASCULINO	
2188,8	2277,6	0,00002*

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,05^*$ indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA IV - RELAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMA SEGUNDO O GÊNERO, PUCPR-2006

MÉDIA		VALOR p
FEMININO	MASCULINO	
0,029	0,0291	0,79792

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,05^*$ indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA V - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA ANOVA SEGUNDO BRACKET/TEMPO

VARIÁVEIS	NA	CA	N/C
T0	63,39 $\mu\text{m}^2 \pm 19,23$	2015,05 $\mu\text{m}^2 \pm 696,75$	0,03 $\pm 0,01$
T1 CERÂMICO	57,92 $\mu\text{m}^2 \pm 19,79$	2406,09 $\mu\text{m}^2 \pm 642,18$	0,03 $\pm 0,01$
T1 METÁLICO	53,00 $\mu\text{m}^2 \pm 17,37$	2473,93 $\mu\text{m}^2 \pm 621,03$	0,02 $\pm 0,01$
T2 CERÂMICO	63,68 $\mu\text{m}^2 \pm 20,89$	2041,44 $\mu\text{m}^2 \pm 639,44$	0,03 $\pm 0,01$
T2 METÁLICO	59,4 $\mu\text{m}^2 \pm 20,30$	2155,40 $\mu\text{m}^2 \pm 677,04$	0,03 $\pm 0,01$

FONTE: dados da pesquisa

TABELA VI - ANOVA COM MEDIDAS REPETIDAS PARA A VARIÁVEL NA, PUCPR-2006

VARIÁVEL	SS	GL	MS	F	Valor p
NA	82953	4	20738	56,97	0,0000*
ERRO	1557911	4280	364		

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,01^*$ indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA VII - ÁREA DO NÚCLEO SEGUNDO *BRACKET*/TEMPO, PUCPR-2006

	T0	T1 CERÂMICO	T1 METÁLICO	T2 CERÂMICO	T2 METÁLICO
MÉDIA	63,39	57,92	53,00	63,69	59,45
T0		0,00002*	0,00002*	0,99655	0,00003*
T1 CERÂMICO	0,00002*		0,00002*	0,00002*	0,34155
T1 METÁLICO	0,00002*	0,00002*		0,00002*	0,00002*
T2 CERÂMICO	0,99655	0,00002*	0,00002*		0,00002*
T2 METÁLICO	0,00003*	0,34155	0,00002*	0,00002*	

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,01$ * indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA VIII - ANOVA COM MEDIDAS REPETIDAS PARA A VARIÁVEL CA, PUCPR-2006

VARIÁVEL	SS	GL	MS	F	Valor p
CA	189734729,47	4	47433682,37	114,89	0,0000*
ERRO	1767073019,36	4280	412867,53		

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,01$ * indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA IX - ÁREA DO CITOPLASMA SEGUNDO *BRACKET*/TEMPO, PUCPR-2006

	T0	T1 CERÂMICO	T1 METÁLICO	T2 CERÂMICO	T2 METÁLICO
MÉDIA	2015,1	2406,1	2473,9	2041,4	2155,4
T0		0,00002*	0,00002*	0,87705	0,00002*
T1 CERÂMICO	0,00002*		0,10410	0,00002*	0,00002*
T1 METÁLICO	0,00002*	0,10410		0,00002*	0,00002*
T2 CERÂMICO	0,87705	0,00002*	0,00002*		0,00040*
T2 METÁLICO	0,00002*	0,00002*	0,00002*	0,00040*	

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,01$ * indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA X - ANOVA COM MEDIDAS REPETIDAS PARA A VARIÁVEL NC, PUCPR-2006

VARIÁVEL	SS	GL	MS	F	Valor p
NC	0,111372	4	0,027843	197,59	0,0000*
ERRO	0,603118	4280	0,000141		

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,01^*$ indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA XI - RELAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMA SEGUNDO BRACKET/TEMPO, PUCPR-2006

	T0	T1 CERÂMICO	T1 METÁLICO	T2 CERÂMICO	T2 METÁLICO
MÉDIA	0,0341	0,0253	0,0224	0,0336	0,0296
T0		0,00002*	0,00002*	0,81662	0,00002*
T1 CERÂMICO	0,00002*		0,00002*	0,00002*	0,00002*
T1 METÁLICO	0,00002*	0,00002*		0,00002*	0,00002*
T2 CERÂMICO	0,81662	0,00002*	0,00002*		0,00002*
T2 METÁLICO	0,00002*	0,00002*	0,00002*	0,00002*	

FONTE: dados da pesquisa.

NOTA: $p < 0,01^*$ indica diferença estatisticamente significativa.

TABELA XII - QUANTIDADE DE ESFREGAÇOS DE ACORDO COM O PREDOMÍNIO CELULAR, PUCPR-2006

TEMPO	SUPERFICIAL	SUB-SUPERFICIAL	ESPINHOSA	BASAL
T0	10	11	0	0
T1 CERÂMICO	17	4	0	0
T1 METÁLICO	19	2	0	0
T2 CERÂMICO	18	3	0	0
T2 METÁLICO	16	5	0	0

FONTE: dados da pesquisa.

GRÁFICO 1 - VALORES MÉDIOS DA ÁREA DO NÚCLEO SEGUNDO BRACKET/TEMPO

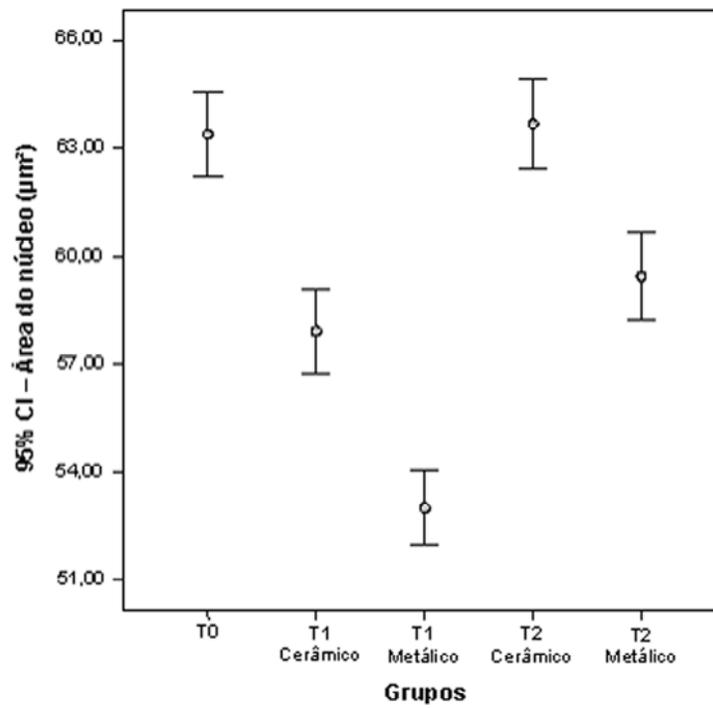


GRÁFICO 2 - VALORES MÉDIOS DA ÁREA DO CITOPLASMA SEGUNDO BRACKET/TEMPO

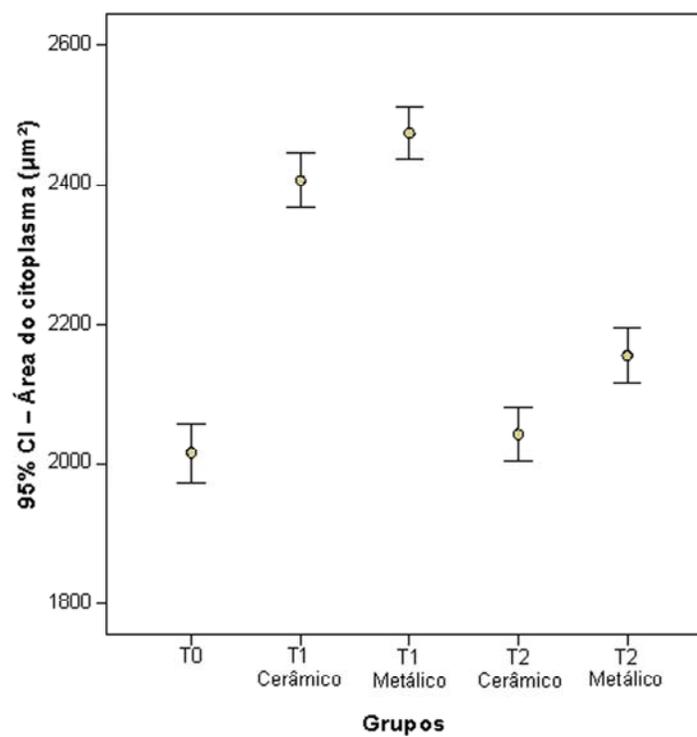
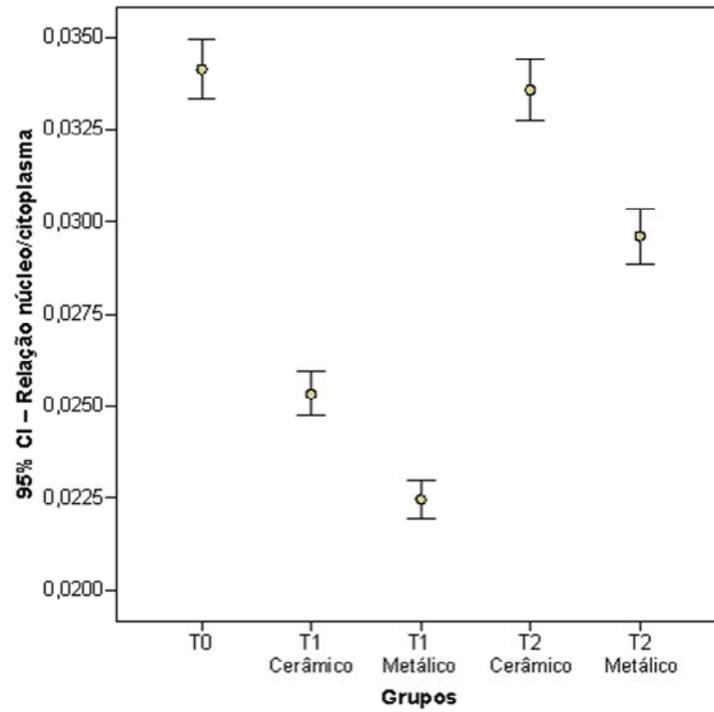


GRÁFICO 3 - VALORES MÉDIOS DA RELAÇÃO NÚCLEO/CITOPLASMA SEGUNDO BRACKET/TEMPO



ANEXO IV – Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 10 de novembro de 2005.

Of. 493/05/CEP-PUCPR

Ref. **"A influência de Brackets metálicos e cerâmicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e fúngica"**

Prezado (a) Pesquisador

Venho por meio deste, informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 09 de novembro do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado **"A influência de Brackets metálicos e cerâmicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e fúngica"** pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 887 e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.
Elissa Souza Camargo

ANEXO V – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(a) menor _____, sob responsabilidade de _____, RG _____ está sendo convidado a participar de um estudo denominado: **“O Efeito de *Brackets* Metálicos e Cerâmicos nas Células da Mucosa Bucal: Estudo *in vivo*”**.

Caso aceite participar desta pesquisa o(a) menor será submetido(a) à colagem de dois acessórios que compõem o aparelho ortodôntico fixo de cada lado da boca, nos dentes posteriores superiores. Em seguida, para a análise do tecido da bochecha, esta será raspada uma escova própria. Este exame será realizado três vezes: antes da colocação dos acessórios, 60 dias após a sua colocação e 30 dias após a remoção dos mesmos. Os exames acima citados são indolores, não requerem cuidados especiais (jejum, dieta específica, entre outros) e não terão nenhum custo ao paciente.

Como benefício ao participante deste estudo será realizada profilaxia dental e aplicação tópica de flúor, na Clínica de Ortodontia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, após o término da pesquisa.

A sua privacidade será respeitada, ou seja, o seu nome, ou qualquer outro dado confidencial, serão mantidos em sigilo.

O responsável está ciente de que pode se recusar a participar do estudo, ou retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo são: a professora Dra. Elisa Souza Camargo e a pós-graduanda Betina do Rosário Pereira do Mestrado de Odontologia - Área de Concentração em Ortodontia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Na condição de responsável, li este termo, fui orientado quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Assinatura do responsável pelo sujeito de pesquisa

Assinatura da pesquisadora

Curitiba, _____ de _____ de _____.

ANEXO VI - Normas para publicação - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via the online Editorial Manager: ees.elsevier.com/ajodo . Organize your submission as follows.

1. Title Page. Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.

2. Abstract. Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.

3. Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the *AMA Manual of Style*, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org> . Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. Figures. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. Tables. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source.

6. Model release and permission forms. Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

7. Copyright release. In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by _____ all _____ authors:
"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal,

whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material." Scan the printed copyright release and submit it via the Editorial Manager, or submit it via fax or mail.

8. Conflict of interest statement. Report any commercial association that might pose a conflict of interest, such as ownership, stock holdings, equity interests and consultant activities, or patent-licensing situations. If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via Editorial Manager.

Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A highquality manuscript will include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, alternatives, progress, and results; and discussion. The submitted figures should include extraoral and intraoral photographs and dental models, panoramic radiographs and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention figures as appropriate.

Short Communications should not exceed 2000 words, including the bibliography, and should include a minimal number of figures or tables. Priority will be given to communications relating to primary research data, preferably clinical but also basic. This section permits time-sensitive material to be published within 6 months of submission.

Techno Bytes items report on emerging technological developments and products for use by orthodontists.

Litigation, Legislation, and Ethics items report legal and ethical issues of interest to orthodontists.

Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and Ask Us questions and answers appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse concerning the profession. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the letter, or fax or mail separately.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is occasionally published as a Guest Editorial or Special Article. Send Guest Editorials or Special Articles directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the editorial, or fax or mail separately.

Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending on their interest and value to subscribers. Send books to the Editor of Reviews and Abstracts, Dr Alex Jacobson, University of Alabama School of Dentistry, 1919 7th Ave S, Box 23, Birmingham, AL 35294. They will not be returned.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)