PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ORTODONTIA

MARIANA BRIDI MOSCHETTI

# O EFEITO DE *BRACKETS* CERÂMICOS E LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS NA MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO CITOLÓGICA

CURITIBA
2008

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MARIANA BRIDI MOSCHETTI

# O EFEITO DE *BRACKETS* CERÂMICOS E LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS NA MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO CITOLÓGICA

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Camargo
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima

CURITIBA

2008

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

M895e
2008

Moschetti, Mariana Bridi
O efeito de brackets cerâmicos e ligaduras metálicas ou elásticas na mucosa bucal : avaliação citológica / Mariana Bridi Moschetti ; orientadora, Elisa Souza Camargo ; co-orientador, Antônio Adilson Soares de Lima. – 2008.
55 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2008
Inclui bibliografia

1. Materiais dentários. 2. Braquetes ortodônticos. 3. Mucosa bucal. 4. Citologia. I. Camargo, Elisa Souza. II. Lima, Antônio Adilson Soares de. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.695

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Curso de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**MARIANA BRIDI MOSCHETTI**

**O EFEITO DE *BRACKETS* CERÂMICOS E LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS NA MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO CITOLÓGICA**

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, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientador(a): Profª Drª Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Ernani Menezes Marchioro
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS

Prof. Dr. Orlando Tanaka
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 11 de dezembro de 2008.

**DEDICATÓRIA**

Ao meu pai, Eduardo, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo. Por estar sempre ao meu lado em todas as situações. Seu exemplo de vida me ensinou a ter caráter, a lutar pelos meus objetivos e nunca desistir. Você é um grande mestre em minha vida. Obrigada, pai.

À minha mãe, Maristela, por seu exemplo de coragem, determinação e persistência em suas metas. Pela amizade, apoio e companheirismo, acreditando sempre no meu potencial. Obrigada pelas conversas, por me oferecer seu colo sempre que precisei, me estimulando sempre a crescer e ser uma pessoa melhor.

Ao meu querido irmão, Fabrício, por estar comigo sempre, independente da situação, me apoiando em todas as minhas decisões. Você é meu irmão e grande amigo! Muitas vezes não sei o que eu faria sem seus conselhos. Obrigada pela compreensão, pelo apoio, pelo incentivo na realização de mais este sonho.

**AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À Profa. Dra. Elisa Souza Camargo pela competência, paciência e dedicação na orientação desta Dissertação. Por confiar na minha capacidade, pelo apoio, pelo incentivo, mostrando sempre o melhor caminho a ser seguido. És um exemplo, não só como mestre, mas também como pessoa e por isso, tens minha grande admiração. Muito obrigada pelos ótimos momentos vividos nestes dois anos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força para ultrapassar os obstáculos, calma e paciência para enfrentar as angústias e paz e alegria para celebrar as minhas vitórias.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pela colaboração com meu desenvolvimento profissional, pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado.

Ao Diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR, Prof. Dr. Sérgio Vieira pela atenção sempre dispensada.

Ao Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima, co-orientador deste trabalho, pela atenção e paciência a mim dedicadas. Pela disponibilidade em ensinar, tirar minhas dúvidas e pelas contribuições indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Orlando Tanaka, por sua dedicação na minha formação profissional, sempre buscando ampliar meus conhecimentos nos seminários, graduação e clínica.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Maruo, por seus ensinamentos de Ortodontia, mostrando com toda a paciência e dedicação a importância de seguirmos uma filosofia nos tratamentos de nossos pacientes.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pela incansável atenção dedicada na clínica e nas aulas de Typodont. Pelo companheirismo, alegria e risadas ao transmitir seus conhecimentos.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Dr. Orlando Tanaka e Profa. Dra. Maria Ângela Naval Machado pela valorosa contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Tavares e Prof. Dr. José Renato Prietsch pela carta de indicação para a realização deste curso.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Camargo Martins e Marina Luise Viola de Azevedo pela atenção e apoio demonstrado durante a realização deste trabalho.

Ao colega de turma, Raul Magnoler Sampaio Mei, pela parceria, vontade e determinação ao me auxiliar, não somente na realização deste trabalho, mas também nas situações do dia-a-dia. Dono de uma autenticidade e espontaneidade sem igual, foi

sempre meu companheiro, mostrando com amor que o que importa são as coisas mais simples e os gestos mais sinceros.

Aos colegas Bruno Bochnia Cerci, Fernanda Brasil Baboni, Jucienne Salgado Ribeiro, Luciana Borges Retamoso, Luegya Amorim Henriques Knop, Luis Filipe Siu Lon, Marcos Adriano Sabatoski, Ricardo Lima Shintcovsk, Saulo Régis de Oliveira Junior e Tais de Morais Alves da Cunha, pela amizade, experiências e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela orientação estatística.

Aos professores de áreas conexas, pelas contribuições para a minha formação neste Curso de Mestrado.

À secretária Neide Reis Borges e às estagiárias Paula Maiza de Mache e Aline Cristine Machado Wiens, pela dedicação e carinho ao atender meus pedidos.

À funcionária Silvana Casagrande Gabardo e aos demais funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR, pela atenção dispensada na clínica, contribuindo para a realização deste trabalho.

Aos amigos e familiares, que compartilharam comigo os momentos vividos, agradeço pelo incentivo e apoio.

Aos pacientes da clínica de Ortodontia pela confiança depositada em nosso atendimento, e também àqueles que me ajudaram participando deste trabalho.

Aos alunos do 7º e 8º períodos do curso de Odontologia da PUCPR, pela oportunidade de viver a docência.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho e na minha formação profissional.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC: área do citoplasma

AN: área do núcleo

AN/AC: relação área do núcleo / área do citoplasma

PUCPR: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

T: tempo

UCM: Universal Collection Medium

µl: microlitro

µm: micrômetro

# SUMÁRIO


**1 ARTIGO EM PORTUGUÊS** **02**

PÁGINA TÍTULO 03

RESUMO 04

INTRODUÇÃO 05

MATERIAL E MÉTODOS 05

RESULTADOS 08

DISCUSSÃO 09

REFERÊNCIAS 12

TABELAS 15

FIGURAS 16

**2 ARTIGO EM INGLÊS** **17**

TITLE PAGE 18

ABSTRACT 19

INTRODUCTION 20

MATERIAL AND METHODS 20

RESULTS 23

DISCUSSION 24

REFERENCES 27

TABLES 30

FIGURES 31

**3 ANEXOS** **32**

ANEXO I – Material e Métodos 33

ANEXO II – Tabelas e Gráficos 44

ANEXO III – Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 47

ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 48

ANEXO V – Normas da Revista – Journal of Oral Pathology and Medicine 49

# 1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

**PÁGINA TÍTULO**

# O EFEITO DE *BRACKETS* CERÂMICOS E LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS NA MUCOSA BUCAL: AVALIAÇÃO CITOLÓGICA

**Mariana Bridi Moschetti**
Mestranda em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**Antônio Adilson Soares de Lima**
Professor Titular do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**Elisa Souza Camargo**
Professora Adjunta do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**Endereço para correspondência**

Profa. 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

**Palavras-chave:** *brackets* cerâmicos; mucosa bucal; citologia esfoliativa

**RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** O aparelho ortodôntico fixo pode produzir ulcerações, abrasão de tecidos moles e desconforto. Objetivou-se analisar as células epiteliais da mucosa bucal adjacente ao aparelho ortodôntico fixo com diferentes tipos de ligaduras.
**MÉTODOS:** Foram colados *brackets* cerâmicos nos primeiros e segundos pré-molares superiores de 20 indivíduos. Um segmento de fio de aço inoxidável foi inserido nos *slots,* fixados com ligaduras elásticas e metálicas, duas do mesmo tipo em cada lado. Por meio da citologia esfoliativa em base líquida, células da mucosa adjacente aos acessórios foram coletadas nos tempos: antes da instalação dos acessórios (T0), 30 dias após a instalação (T1) e 30 dias após a remoção (T2). A análise e comparação dos esfregaços foram feitas por meio da citomorfometria e citomorfologia.
**RESULTADOS:** Verificou-se diminuição na área do núcleo e aumento na do citoplasma no T1 ($p<0,05$), com tendência ao retorno para o valor inicial no T2 ($p<0,05$). Na relação núcleo/citoplasma não houve diferença estatisticamente significante, assim como em todas as variáveis quando comparados os dois grupos (ligaduras metálica e elástica). No T0 não houve predomínio de células superficiais ou sub-superficiais, enquanto no T1, predominaram as células superficiais.
**CONCLUSÕES:** A presença do aparelho ortodôntico induziu resposta adaptativa da mucosa, causando aumento na espessura do epitélio para proteger a mucosa frente à injúria física.

## INTRODUÇÃO

O tratamento ortodôntico com aparelho fixo está relacionado muitas vezes com dor, ulcerações, e abrasão de tecidos moles, portanto uma vez que os acessórios ortodônticos são posicionados, estes podem causar desconforto aos pacientes (1). Além das conseqüências relacionadas ao trauma físico, os *brackets* ortodônticos podem conter substâncias com potencial de toxicidade alto, tais como o níquel, ocasionando reações alérgicas e efeitos citotóxicos (2).

Os dois métodos mais comuns para manter os arcos ortodônticos amarrados aos *brackets* são a ligadura elástica e a metálica (3,4). As ligaduras de metal são fios de aço inoxidável com diferentes calibres variando de 0,009" a 0,014". Ligaduras elásticas são elastômeros de forma circular que podem ser deformados e adaptados aos *brackets* fixando o arco ortodôntico (5). Cada um destes materiais pode induzir alterações específicas na cavidade bucal, tais como redução do pH e acúmulo prolongado de biofilme dental (6,7).

O conjunto *brackets*, fio e ligaduras produz fricção na mucosa bucal adjacente. Como resposta a estes estímulos mecânicos repetitivos ocorre adaptação da mucosa promovendo o aparecimento de ulceração persistente ou hiperceratose (8). Tais alterações podem ser diagnosticadas por meio da citologia esfoliativa, por ser uma técnica de simples execução, não invasiva e que permite que se apliquem métodos qualitativos e quantitativos para avaliação das células (9).

Os *brackets*, fios e ligaduras são componentes essenciais dos aparelhos ortodônticos fixos corretivos e requerem biocompatibilidade para não causarem efeitos deletérios irreversíveis aos tecidos. Oferecer aos pacientes um tratamento ortodôntico corretivo sem significante prejuízo à mucosa bucal motivou a realização deste estudo que objetivou analisar e comparar o comportamento das células epiteliais da mucosa bucal adjacente a *brackets* cerâmicos, fios de aço inoxidável e ligaduras metálicas ou elásticas por meio da citomorfometria e citomorfologia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra

Participaram do estudo 20 indivíduos, que se encaminharam para a Clínica de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) para a realização

de tratamento odontológico, sendo 6 do gênero masculino e 14 do gênero feminino, com idade média de 21,1 anos, entre 20 e 31 anos.

Os critérios de inclusão para participação da pesquisa foram indivíduos com ausência de: história de tabagismo e etilismo, tratamento com antibióticos ou esteróides, doenças debilitantes, uso de colutórios bucais, mordida cruzada posterior, prótese dentária total ou parcial removível, ou qualquer tipo de lesão na mucosa bucal.

**Instalação dos acessórios**

*Brackets* cerâmicos (Allure® *Straight Wire*, *slot* 0,022" x 0,028", GAC, Bohemia, NY, USA) foram colados nas faces vestibulares dos primeiros e segundos pré-molares superiores direitos e esquerdos em cada indivíduo. Com a ajuda de um guia de fio de aço inoxidável com espessura de 0,020" (Shiny Bright®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA), os *slots* ficaram em um mesmo eixo horizontal e este foi mantido em posição até o término da polimerização por meio de luz halógena.

Em seguida, outro segmento de fio de aço inoxidável com espessura de 0,020" (Shiny Bright®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA), foi inserido nos *slots* dos *brackets* de ambos os lados, com dobras nas extremidades, uma no sentido palatino e outra no sentido oclusal. O objetivo dessas dobras foi evitar que o segmento de fio girasse ou deslizasse, impedindo, desta forma, fricção adicional na mucosa bucal adjacente.

Para a fixação dos fios nos *brackets* foram colocadas ligaduras elásticas incolores (Mini Stix Non-Coated®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) e metálicas com espessura de 0,012" (Dentalloy®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA). Em cada indivíduo foram colocadas aleatoriamente ligaduras do mesmo tipo em cada lado, porém de tal forma que metade dos indivíduos recebessem ligaduras elásticas no lado direito e metálicas no lado esquerdo e nos outros indivíduos o inverso ocorresse (Fig. 1a,b).

**Coleta das células epiteliais**

As coletas das células da mucosa bucal adjacente aos acessórios foram realizadas com um *kit* do sistema DNA-Citoliq (Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil), denominado *Universal Collection Medium* (UCM). Estas foram realizadas em três tempos distintos: antes da instalação dos acessórios (T0 - controle), trinta dias após, antes da remoção dos mesmos (T1), e trinta dias após a remoção (T2).

Antes da coleta, os indivíduos foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água durante 20 segundos para remover possíveis restos alimentares. A escova do *kit* foi posicionada de tal forma que as cerdas maiores tocassem a mucosa jugal adjacente à região onde os *brackets* estavam posicionados, e realizados movimentos giratórios (cinco voltas) no sentido horário, de forma suave.

**Processamento histológico**

Os frascos foram homogeneizados por meio de um agitador de tubos (Vortex, Bionatic®, 2.500 rpm) por tempo mínimo de 20 segundos. Com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 200 µl da amostra foi transferida do interior do frasco para a membrana de policarbonato (Filtrogene®, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). A prensa metálica (Prepgene®, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) contendo uma cartela com 12 lâminas histológicas (Lamigene®, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) foi fechada por aproximadamente 10 segundos, promovendo o *imprint* do material sobre a lâmina. Foi obtido um total de 120 lâminas, sendo uma lâmina de cada tempo e de cada lado da cavidade bucal, totalizando 6 lâminas para cada indivíduo.

As lâminas foram imersas em solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos para fixação. A seguir, foi procedida a coloração por meio da técnica de Papanicolaou.

**Análises citomorfométrica e citomorfológica**

Na análise citomorfométrica, os esfregaços foram observados por meio de microscopia de luz, com o uso de um microscópio binocular, modelo Olympus BX50 (Olympus®, Japão), adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65 (Olympus®, Japão). Cinqüenta células de cada lâmina foram examinadas aleatoriamente (10), sendo evitadas as áreas em que as células se apresentavam dobradas, sobrepostas ou aglomeradas. A captura da imagem dos campos citológicos foi feita com aumento de 400 vezes por uma câmera Sony CCD Íris Color Vídeo, modelo DXC-107A (Sony Electronics, Inc., USA) associada ao *software Image Pro Plus*, versão 4.5.029 *for Windows* 98/NR/2000 (Media Cybernetics Inc., USA). Com este *software* também foi possível a avaliação das imagens das células, permitindo a delimitação do núcleo e do citoplasma de cada célula, por meio da utilização do cursor digitador, após as imagens terem sido salvas em computador. As áreas do núcleo (AN) e do citoplasma (AC) foram obtidas em $\mu m^2$ com o *software* no modo "Medida". Os valores foram tabulados no

*software* Microsoft Excel e, após, foram obtidos os valores da relação área do núcleo/área do citoplasma (AN/AC) de cada célula (11).

Para verificar o erro de reprodutibilidade, foram medidas 50 células por um único operador, duas vezes, com 30 dias de intervalo. A reprodutibildade foi confirmada pela Fórmula de Dahlberg, que gerou um Coeficiente de Confiabilidade > 90, indicando inexistência de erro casual.

Para a análise citomorfológica, o microscópio foi adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 10X/0,25, 20X/0,40 e 40X/0,65. Toda a extensão dos esfregaços foi percorrida, realizando-se a classificação de acordo com o predomínio das células presentes segundo Sugerman e Savage (12).

Os esfregaços também foram classificados de acordo com os critérios citológicos de Papanicolaou (13) 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**

Todos os dados foram tabulados e testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o *software Statistical Package for the Social Science 13.0 for Windows* (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e do teste de homogeneidade de Levene, verificou-se que a maioria das variáveis apresentou normalidade e homogeneidade. Visando verificar se existia diferença entre as variáveis ligaduras metálicas, elásticas e tempo, aplicou-se ANOVA a 2 critérios com medidas repetidas. Quando ANOVA indicou existir diferença significante, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey HSD, visando detectar quais grupos diferiam entre si. Para analisar o predomínio de células presentes, foi realizado o teste da Diferença entre duas proporções. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

**RESULTADOS**

Um total de 6000 células foram avaliadas quanto às variáveis AN, AC e AN/AC. A AN apresentou maior média no gênero masculino em todos os tempos observados

quando comparada com a do gênero feminino, tanto para a ligadura metálica quanto para a elástica e a AC apresentou maior média no gênero masculino do que no feminino em todos os tempos observados para a ligadura elástica. Para as três variáveis em todos os tempos, a única que mostrou existir diferença significante ($p<0,05$) segundo gênero foi a AN na ligadura metálica no T2, que mostrou-se maior no gênero masculino.

Os valores da média, mediana e desvio padrão para as variáveis AN, AC e AN/AC em relação ao tipo de ligadura são exibidos na tabela 1. Para as variáveis AN e AN/AC, a ligadura elástica apresentou maior média que a ligadura metálica. Ao relacionar as duas ligaduras, no mesmo tempo de observação, não foi verificada diferença significante ($p>0,05$) (Tabela 1).

Houve diminuição na AN e aumento na AC para os dois grupos (ligaduras metálicas e elásticas) no T1, com tendência ao retorno para o valor inicial no T2. Para estas duas variáveis houve diferença significante ($p<0,05$) quando comparados intra-grupos em diferentes tempos de observação, enquanto para a variável AN/AC não houve diferença significante ($p>0,05$) (Tabela 2).

Foi observada diferença em relação à camada de células superficiais, sendo observado aumento do número de células desta camada 30 dias após a instalação dos acessórios (T1) com subseqüente diminuição (T2). No entanto, esta relação não apresentou diferença significante ($p>0,05$). A quantidade de esfregaços está descrita na Tabela 3.

Pela classificação de Papanicolaou, foi possível observar que os esfregaços apresentaram-se normais (Classe I - 89,17%) e com alterações de natureza inflamatória (Classe II - 10,83%).

## DISCUSSÃO

A citologia esfoliativa em base líquida é usada para o diagnóstico de lesões suspeitas da mucosa bucal. Estudos comparativos têm mostrado vantagens desta técnica em relação à convencional (9), tais como redução de contaminação por sangue e muco, obtendo-se assim maior dispersão das células e aumentando-se consideravelmente a sensibilidade e a qualidade (14). A citologia esfoliativa é baseada no método de Papanicolaou, reconhecido como um método confiável e de sucesso (15).

Não foram encontradas diferenças significantes ($p>0,05$) para as variáveis AN e AC entre os gêneros feminino e masculino. Resultados semelhantes foram verificados por Cowpe et al. (10), que utilizaram citologia convencional.

Ao avaliar o comportamento das variáveis AN e AC ao longo do período estudado, verificou-se diminuição na AN e aumento na AC após o uso dos acessórios ortodônticos (T1), o que sugere um espessamento do epitélio devido à fricção causada pelo aparelho. No epitélio há um "estado de equilíbrio", em que o número de células formadas é balanceado pelo número de células eliminadas. Entretanto, o epitélio tem a capacidade de adaptação funcional, tornando-se melhor capacitado para resistir a novos traumas (16). Shabana et al. (17) também encontraram aumento do tamanho das células quando analisadas lesões ceratinizadas traumáticas comparando-as com as células normais da mucosa bucal.

Se um dano é suficiente para provocar uma resposta inflamatória, o processo de cura é iniciado por meio de regeneração. Após uma injúria, há a tendência de aumento dos espaços intercelulares, com o objetivo de restabelecer a continuidade epitelial, e aumento na quantidade de citoplasma, permitindo aumento do metabolismo celular (18). Dentro destes conceitos, no presente estudo foi verificada a regeneração do epitélio, tendendo aos valores iniciais (T2), pois a remoção do estímulo induz à normalidade da espessura do epitélio (18).

O tempo de renovação do epitélio da mucosa jugal é cerca de 25 dias (18) e o desconforto inicial ocasionado com a instalação dos acessórios desaparece em quatro semanas (19). Por estes motivos, o tempo entre uma coleta e outra de células da mucosa bucal foi de 30 dias no presente estudo, permitindo assim observar a adaptação da mucosa frente à agressão e posterior regeneração desta mucosa.

Os esfregaços obtidos no T0 foram superficiais e sub-superficiais, não existindo predomínio entre os dois tipos celulares, uma vez que a mucosa bucal apresenta epitélio estratificado pavimentoso não-ceratinizado. Trinta dias após a instalação dos acessórios ortodônticos (T1), foi verificado aumento de células da camada superficial. Posteriormente à retirada dos acessórios (T2), houve tendência de retorno às características do T0. O aumento no número das camadas do epitélio (hiperplasia) pode estar presente em condições clínicas diversas e resulta de um estímulo local, podendo ser químico, térmico ou físico. O processo de ceratinização envolve aumento no número de camadas de células entre a camada basal e a superficial e, durante este processo, o núcleo celular diminui e ocorre um aumento no número de células superficiais (20).

Segundo Ramaesh et al. (21), o processo de ceratinização normal sofrido pela mucosa pode ser acelerado por uma irritação crônica, produzindo um aumento no número de células superficiais. Os resultados obtidos no presente estudo concordam

com os de Ramaesh et al. (22), que avaliaram o tabaco, agente irritante físico e químico, e não uma injúria física apenas.

Células normais da mucosa bucal apresentam núcleo pequeno, único e centralizado e citoplasma abundante. As células anormais ou displásicas apresentam núcleo maior, podendo ser único ou não, ocupando grande parte do citoplasma e a membrana nuclear é irregular (23). De acordo com Ramaesh et al. (21), células normais, de lesões displásicas e de carcinoma espinocelular, mostraram aumento gradual do núcleo e diminuição gradual do citoplasma. Desta forma, pelas características dos esfregaços analisados neste estudo (Classes I - 89,17% e II - 10,83%) pode-se inferir que os aparelhos ortodônticos não têm a capacidade de induzir alterações no material genético.

Os acessórios instalados nos indivíduos no presente estudo reproduzem uma condição clínica usual na Ortodontia. As ligaduras e os fios podem proteger a mucosa da fricção direta com as aletas dos *brackets*. Esperava-se que a ligadura elástica, por seu maior volume, tornasse a superfície do *bracket* menos irregular, causando, assim, menor injúria no epitélio adjacente, porém isto não foi verificado.

Todos os indivíduos da amostra apresentaram hiperparaceratose no epitélio adjacente aos acessórios, concordando com Pereira et al. (24). Além da fricção, poderia-se pensar na citotoxicidade como possível fator etiológico destas alterações. Porém, Mockers et al. (25), em estudo *in vitro*, não evidenciaram efeitos citotóxicos significantes, tanto nos materiais metálicos quanto nos não-metálicos (de policarbonato e cerâmicos). Isso mostra que, tendo-se utilizado *brackets* cerâmicos associados a elementos metálicos (fio de aço inoxidável e ligaduras metálicas), nenhum destes materiais possivelmente influenciou nas análises citológicas realizadas.

Apesar de ter sido verificada resposta adaptativa frente à injúria ocasionada pelos acessórios, tais alterações são reversíveis e os benefícios proporcionados pelo tratamento ortodôntico compensam o desconforto sofrido pelos pacientes.

Baseando-se nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que os *brackets* cerâmicos, os fios de aço inoxidável e as ligaduras metálicas ou elásticas são capazes de induzir alterações na citomorfometria e citomorfologia das células epiteliais da mucosa bucal, que sugerem um processo adaptativo frente à injúria física, o qual regride após a remoção dos mesmos. Ambas as ligaduras causaram a mesma intensidade de alterações no epitélio.

**REFERÊNCIAS**

1. KVAM E, BONDEVIK O, GJERDET NR. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. Community Dent Oral Epidemiol 1989; **17**: 154-7.

2. DAVID A, LOBNER D. *In vitro* cytotoxicity of orthodontic archwires in cortical cell cultures. Eur J Orthod 2004; **26**: 421-6.

3. FORSBERG CM, BRATTSTRÖM V, MALMBERG E, NORD CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. Eur J Orthod 1991; **13**: 416-20.

4. TURKKAHRAMAN H, SAYIN MO, BOZKURT FY, YETKIN Z, KAYA S, ONAL S. Archwire ligations techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. Angle Orthod 2004; **75**: 231-6.

5. FABER J. Tying twin brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2000; **118**: 101-6.

6. MATTINGLY JA. Enhancement of *Streptococcus mutans* colonization by direct bonded orthodontic appliances. J Dent Res 1983; **62**: 1209-11.

7. ROSENBLOOM RG, TINANOFF N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during and after orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1991; **100**: 35-7.

8. MACKENZIE IC, ETTINGER RL. Differences in the response of rodent oral mucosa and skin to repeated surface trauma. J Prosthet Dent 1975; **34**: 666-74.

9. MEHROTRA R, GUPTA A, SINGH M, IBRAHIM R. Application of citology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. Mol Cancer 2006; **23**: 5-11.

10. COWPE JG, LONGMORE RB, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: An age, site and sex related survey. J R Soc Med 1985; **78**: 995-1004.

11. OGDEN GR, COWPE JG, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. J Oral Pathol Med 1990; **19**: 53-5.

12. SUGERMAN PB, SAVAGE NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. Aust Dent J 1996; **41**: 71-4.

13. LANGE DE, MEYER M, HAHN W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bollous lesions. J Periodontol 1972; **43**: 433-7.

14. 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.

15. MARAKI D, BECKER J, BOECKING A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. J Oral Pathol Med 2004; **33**: 398-404.

16. MJÖR IA, FEJERSKOV O. Human Oral Embriology and Histology. Copenhagen: Munksgaard, 1986.

17. 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.

18. TEN CATE AR. Oral Histology: development, structure and function. 5th ed. St Louis: Mosby-Year Book, 1998.

19. CANIKLIOGLU C, ÖZTÜRK Y. Patient discomfort: A comparison between lingual and labial fixed appliances. Angle Orthod 2004; **75**: 86-91.

20. WOYCEICHOSKI IEC, ARRUDA EP, RESENDE L, MACHADO MAN, GRÉGIO AMT, AZEVEDO LR, LIMA AAS. Cytomorphometric analysis of crack

cocaine effects on the oral mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; **105**: 745-9.

21. RAMAESH T, MENDIS BRRN, RATNATUNGA N, THATTIL RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leucoplakia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1998; **27**: 83-6.

22. 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.

23. BERNSTEIN ML, MILLER RL. Oral exfoliative cytology. JADA 1978; **96**: 626-9.

24. PEREIRA BR, TANAKA OM, LIMA AAS, GUARIZA-FILHO O, MARUO H, CAMARGO ES. Metal and ceramic brackets effects on human buccal mucosa epithelial cells. Angle Orthod 2009;**79**:373–9.

25. MOCKERS O, DEROZE D, CAMPS J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires *in vitro*. Dent Mater 2002; **18**: 311-7.

## TABELAS

**Tabela 1** - Estatísticas descritivas das variáveis AN, AC, AN/AC segundo tempo e teste "*t*" de *Student* para análise inter-grupos no mesmo tempo de observação

| Variáveis | Tempo | Metálica (n=20) | | | Elástica (n=20) | | | Valor p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Média | Mediana | Desvio padrão | Média | Mediana | Desvio padrão | |
| AN | T0 | 71,979 | 74,881 | 9,458 | 72,961 | 74,867 | 9,247 | 0,985444 |
| | T1 | 49,057 | 48,130 | 5,664 | 51,882 | 51,908 | 6,770 | 0,401341 |
| | T2 | 62,707 | 64,154 | 7,693 | 63,335 | 65,019 | 7,260 | 0,998230 |
| AC | T0 | 2249,753 | 2228,387 | 210,125 | 2253,489 | 2192,506 | 196,357 | 0,999997 |
| | T1 | 2610,413 | 2597,432 | 194,195 | 2588,976 | 2619,344 | 152,325 | 0,985642 |
| | T2 | 2391,494 | 2347,986 | 157,481 | 2406,825 | 2388,844 | 154,087 | 0,997011 |
| AN/AC | T0 | 0,048 | 0,034 | 0,068 | 0,050 | 0,034 | 0,073 | 0,999999 |
| | T1 | 0,028 | 0,020 | 0,038 | 0,029 | 0,020 | 0,040 | 0,999999 |
| | T2 | 0,027 | 0,027 | 0,003 | 0,040 | 0,027 | 0,060 | 0,960617 |

AN: área do núcleo; AC: área do citoplasma; AN/AC: relação área do núcleo/ área do citoplasma; T: tempo
* Valores estatisticamente significantes quando p<0,05.

**Tabela 2** - Teste de Tukey HSD para análise intra-grupos, segundo as variáveis AN, AC, AN/AC

| Variáveis | Metálica | | | Elástica | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | T0xT1 | T0xT2 | T1xT2 | T0xT1 | T0xT2 | T1xT2 |
| AN | **0,000122*** | **0,000122*** | **0,000122*** | **0,000122*** | **0,000122*** | **0,000122*** |
| AC | **0,000122*** | **0,000543*** | **0,000122*** | **0,000122*** | **0,000226*** | **0,000124*** |
| AN/AC | 0,792983 | 0,757689 | 1,000000 | 0,799380 | 0,990894 | 0,984595 |

AN: área do núcleo; AC: área do citoplasma; AN/AC: relação área do núcleo/ área do citoplasma; T: tempo
* Valores estatisticamente significantes quando p<0,05.

**Tabela 3** – Tipo de células predominantes nos esfregaços segundo tempo e tipo de ligaduras

| | Superficial | Sub-superficial | Espinhosa | Basal |
|---|---|---|---|---|
| T0 Metálica | 12 | 8 | 0 | 0 |
| T0 Elástica | 12 | 8 | 0 | 0 |
| T1 Metálica | 16 | 4 | 0 | 0 |
| T1 Elástica | 17 | 3 | 0 | 0 |
| T2 Metálica | 15 | 5 | 0 | 0 |
| T2 Elástica | 13 | 7 | 0 | 0 |
| Total | **85** | **35** | **0** | **0** |

T: tempo.

## FIGURAS

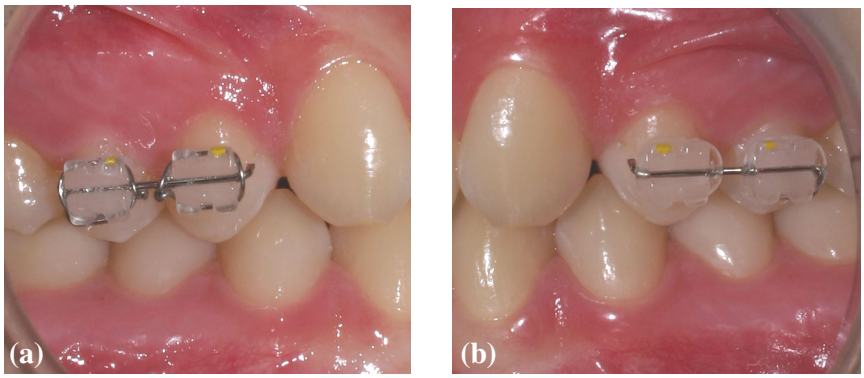



**Figura 1** Segmento de fio ortodôntico fixado nos *brackets* por meio de ligaduras metálicas (a); segmento de fio ortodôntico fixado nos *brackets* por meio de ligaduras elásticas (b)

# 2 ARTIGO EM INGLÊS

**TITLE PAGE**

# THE EFFECT OF CERAMIC BRACKETS AND METAL OR ELASTIC LIGATURES ON THE ORAL MUCOSA: CYTOLOGIC EVALUATION

**Mariana Bridi Moschetti**

Master of Science Student, Graduate Dentistry Program – Orthodontics, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

**Antônio Adilson Soares de Lima**

Senior Professor, Graduate Dentistry Program – Stomatology, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

**Elisa Souza Camargo**

Associate Professor, Graduate Dentistry Program – Orthodontics, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

**Corresponding author**

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

**Keywords:** ceramic brackets; oral mucosa; exfoliative cytology

**ABSTRACT**

**BACKGROUND:** The fixed orthodontic appliance can produce ulcerations, soft tissue abrasion and discomfort. The purpose of this study was to analyze the epithelial cells of the oral mucosa adjacent to the fixed orthodontic appliance using different types of ligatures.

**METHODS:** Ceramic brackets were bonded to the maxillary first and second premolars of 20 individuals. A segment of stainless steel wire was inserted in the slots, fixed with elastic and metal ligatures, two of the same type on each side. By means of liquid-based exfoliative cytology, cells of the mucosa adjacent to the accessories were collected at the following moments: before the accessories were placed (M0), 30 days after placement (M1) and 30 days after removal (M2). Analysis and comparison of the smears were performed by means of cytomorphometry and cytomorphology.

**RESULTS:** Reduction in the nuclear area and increase in the cytoplasmic area was found at M1 ($P<0.05$), with a trend towards returning to the initial value at M2 ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in the nuclear/cytoplasmic ratio or in any of the variables when the two groups were compared (metal and elastic ligatures). At M0 there was no predominance of superficial or sub-superficial cells, whereas at M1, superficial cells predominated.

**CONCLUSIONS:** The presence of the orthodontic appliance induced an adaptive response from the mucosa, causing an increase in the thickness of the epithelium to protect the mucosa from physical injury.

## INTRODUCTION

Orthodontic treatment with a fixed appliance is frequently related to pain, ulcerations and soft tissue abrasion, therefore, once the orthodontic accessories are in place, they may cause patients discomfort (1). In addition to the consequences related to physical trauma, orthodontic brackets may contain substances with potentially high toxicity, such as nickel, causing allergic reactions and cytotoxic effects (2).

Two of the commonest aids to keeping the orthodontic arches tied to the brackets are elastic and metal ligatures (3,4). Metal ligatures are stainless steel wires of different calibers ranging from 0.009" to 0.014". Elastic ligatures are circular shaped elastomers that can become deformed and adapted to the brackets fixing the orthodontic arch (5). Each of these materials could induce specific alterations in the oral cavity, such as reduction in pH and prolonged accumulation of dental biofilm (6,7).

The set of brackets, wire and ligatures produce friction on the adjacent oral mucosa. As a response to these repetitive mechanical stimuli, adaptation of the mucosa occurs, causing the appearance of persistent ulceration or hyperkeratosis (8). Such alterations can be diagnosed by means of exfoliative cytology, as it is a non invasive, simple technique to perform, and allows qualitative and quantitative methods of cell evaluation to be applied (9).

The brackets, wires and ligatures are essential components of corrective fixed orthodontic appliances and need to be biocompatible so as not to cause irreversible deleterious effects on the tissues. This study was motivated by the desire to offer patients corrective orthodontic treatment without significant harm to the oral mucosa, therefore, the aim was to analyze and compare the behavior of the epithelial cells of the oral mucosa adjacent to ceramic brackets, stainless steel wires and metal or elastic ligatures, by means of cytomorphometry and cytomorphology.

## MATERIAL AND METHODS

### Sample

Twenty individuals of whom 6 were males and 14 females, between the ages of 20 and 31 years, with a mean age of 21.1 years participated in this study, and were referred to the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) Dentistry Clinic for dental treatment.

The inclusion criteria for participating in the research were individuals with absence of: history of smoking and alcoholism, treatment with antibiotics or steroids, debilitating diseases, use of mouth washes, posterior crossbite, removable complete or partial dentures, or any type of oral mucosa lesion.

**Placement of the appliances**

Ceramic brackets (Allure™ Straight Wire, slot 0.022" x 0.025", GAC, Bohemia, NY, USA) were bonded to the vestibular faces of the maxillary right and left first and second premolars of each individual. With the aid of a stainless steel guide wire 0.020" thick (Shiny Bright™, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA), the slots were placed on the same horizontal axis, which was kept in position until polymerization by means of halogen light was concluded.

After this, another segment of stainless steel wire 0.020" thick (Shiny Bright™, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) was inserted in the slots of the brackets on both sides, with bends at the extremities, one in the palatine and the other in the occlusal direction. The object of the bends was to prevent the segment of wire from turning or sliding, thus preventing additional friction on the adjacent oral mucosa.

To fixate the wires on the brackets, elastic (Mini Stix Non-Coated™, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) and metal ligatures 0.012" thick (Dentalloy™, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) were placed. In each individual, ligatures of the same type were randomly placed on each side, however, in such a manner that half of the individuals would receive elastic ligatures on the right side and metal ligatures on the left, and in the other individuals, the opposite would occur (Fig. 1a,b).

**Epithelial cell collection**

The cells from the oral mucosa adjacent to the accessories were collected with a kit from the DNA-Citoliq System (Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil), denominated *Universal Collection Medium* (UCM). The collections were made at three different moments: before the accessories were placed (M0 - control), 30 days after placement, before they were removed (M1) and 30 days after removal (M2).

Before collection, the individuals were instructed to perform a mouth wash with water for 20 seconds, to remove possible food remainders. The brush from the kit was placed in such a way that the longer bristles would touch the jugal mucosa adjacent to

the region were the brackets were placed, and smooth turning movements (five turns) in the clockwise direction were made.

**Histologic processing**

The flasks were homogenized by means of a tube agitator (Vortex, Bionatic™, 2.500 rpm) for a minimum time of 20 seconds. With the aid of a pipette, an aliquot of 200 µl of the sample was transferred into the flask onto the polycarbonate membrane filter (Filtrogene™, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil). A metal press (Prepgene™, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) containing a card with 12 histological glass slides (Lamigene™, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) was closed for approximately 10 seconds, to make an imprint of the material on the slide.

A total of 120 slides was obtained, being one slide of each moment and of each oral cavity side, totally 6 slides to each patients.

The slides were immersed in a solution of absolute ethyl alcohol for 20 minutes for fixation. Smears were then stained by the Papanicolaou stain.

**Cytomorphometric and cytomorphologic analysis**

In the cytomorphometric analysis, each slide was assessed using light microscopy by binocular Olympus BX50 microscope (Olympus™, Japan), fitted with a WH 10X-H/22 eyepiece and PLAN 40X/0.65 objectives (Olympus™, Japan). Fifty cells of each slide were randomly examined (10), however, avoiding the areas in which the cells were folded, superimposed or agglomerated. The image of the cytological fields was captured at 400X magnification by a Sony CCD Iris Color Video Camera, model DXC-107A (Sony Electronics, Inc., USA) associated with *Image Pro Plus software*, version 4.5.029 *for Windows* 98/NR/2000 (Media Cybernetics Inc., USA). With this software it was also possible to evaluate the images of the cells, allowing the nucleus and cytoplasm of each cell to be delimited by using the digitizer cursor, after the images had been saved on the computer. The nuclear area (NA) and cytoplasmic area (CA) were obtained in $\mu m^2$ with the software in the "Measurement" mode. The values were tabulated in Microsoft Excel software, and after this the nucleus-to-cytoplasm area ratio (NA/CA) values of each cell were obtained (11).

To calculate the error of the method, 50 randomly selected cells were measured twice within a 30 day interval by the same investigator. Measurement error was

calculated according to Dahlberg's formula, based on the error variance, the quotient between the error variance and the total variance was calculated. The method error can thus be considered negligible.

For the cytomorphologic analysis, the microscope was fitted with a WH 10X-H/22 eyepiece and PLAN 10X/0.25, 20X/0.40 and 40X/0.65 objectives. The entire extent of the smears was covered, and smears were classified in accordance with the predominance of the cells present, according to Sugerman and Savage (12).

The smears were also classified in accordance with the Papanicolaou cytological criteria (13) as: Class 0 (insufficient or inadequate material for analysis); Class I (normal smear); Class II (normal smear with inflammatory alterations); Class III (dysplastic alterations – suspect smear); Class IV (strongly indicative of malignancy, but inconclusive); Class V (malignant smear).

**Statistical analysis**

All the data were tabulated and statistical tests were applied, using the *Statistical Package for Social Science 13.0 for Windows* software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). By means of the Kolmogorov-Smirnov and Levene homogeneity tests, it was verified that the majority of the variables presented normality and homogeneity. With a view to verifying whether there was difference among the variables according to metal and elastic ligatures, and time, two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was applied. When ANOVA indicated that there was significant difference, the Tukey HSD multiple comparisons test was used to detect which of the groups differed among them. To analyze the predominance of cells present, the test of difference between two proportions was performed. The differences were considered statistically significant when $P<0.05$.

**RESULTS**

A total of 6000 cells were evaluated with regard to the variables NA, CA and NA/CA. NA was shown to have the highest mean in males at all times observed when compared with females, both for the metal and elastic ligatures, and CA had a higher mean in males than in females at all the times observed for the elastic ligature. For the three variables at all times, the only one that was shown to have significant difference ($P<0.05$) according to gender was NA in metal ligature at M2, having higher mean in males.

The mean, median and standard deviation values for the variables NA, CA and NA/CA with regard to type of ligature are shown in Table 1. For the variables NA and NA/CA, the elastic ligature presented a higher mean than the metal ligature. When relating the two ligatures at the same time of observation, no significant difference was found ($P>0.05$) (Table 1).

There was a reduction in NA and increase in CA for the two groups (metal and elastic ligatures) at M1, with a trend towards returning to the initial value at M2. For these two variables, there was significant difference ($P<0.05$) when intra-groups were compared at different observation times, whereas for the variable NA/CA there was no significant difference ($P>0.05$) (Table 2).

Difference was observed as regards the layer of superficial cells, with an increase being observed in the number of cells in this layer 30 days after the accessories were placed (M1) with a subsequent reduction (M2). Nevertheless, this relationship presented no significant difference ($P>0.05$). The quantity of the smears is described in Table 3.

By the Papanicolaou classification, it was possible to observe that the smears presented normal alterations (Class I 89.17%) and inflammatory alterations (Class II 10.83%).

**DISCUSSION**

Liquid-based exfoliative cytology is used for diagnosing suspect lesions of the oral mucosa. Comparative studies have shown the advantages of this technique in comparison with the conventional technique (9), such as the reduction in contamination by blood and mucus, thus obtaining greater dispersion of the cells and considerably increasing the sensitivity and quality of the technique (14). Exfoliative cytology is based on the Papanicolaou method, recognized as a reliable and successful method (15).

No significant differences were found ($P>0.05$) for the variables NA and CA between females and males. Similar results were found by Cowpe et al. (10), who used conventional cytology.

When evaluating the behavior of the variables NA and CA throughout the studied period, a reduction in NA and increase in CA after the use of the orthodontic accessories was found (M1), which suggest thickening of the epithelium due to the friction caused by the appliance. In the epithelium, there is a “state of equilibrium” in which the number of cells formed is balanced by the number of cells eliminated.

Nevertheless, the epithelium has the capacity of functional adaptation, making it more capable of resisting new traumas (16). Shabana et al. (17) also found an increase in the size of cells when traumatic keratinized lesions were analyzed and compared with normal cells of the oral mucosa.

If damage is sufficient to cause an inflammatory response, the cure process is initiated by means of regeneration. After an injury, there is a tendency for intercellular spaces to increase, with the object of re-establishing epithelial continuity, and an increase in the quantity of cytoplasm, allowing an increase in cellular metabolism (18). Within these concepts, regeneration of the epithelium was verified in the present study, with a trend towards the initial values (M2), as removal of the stimulus induces normality of the epithelium thickness (18).

The time of renewal of the jugal mucosa epithelium is around 25 days (18), and the initial discomfort caused by the placement of the accessories disappears in four weeks (19). For these reasons, the time between one collection of oral mucosa cells and the next was 30 days in the present study, thus allowing one to observe the adaptation of the mucosa to the aggression and the later regeneration of this mucosa.

The smears obtained at M0 were superficial and sub-superficial, and there was no predominance between the two types of cells, since the oral mucosa present non-keratinized, pavimentous, stratified epithelium. Thirty days after the orthodontic accessories were placed (M1), an increase in the cells of the superficial layer was verified. After removal of the accessories (M2) there was a trend towards return to the characteristics of M0. The increase in the number of layers of the epithelium (hyperplasia) can be present under various clinical conditions, and results from a local stimulus, which can be chemical, thermal or physical. The keratinization process involves an increase in the number of layers of cells between the basal and superficial layers, and during this process, the cell nucleus diminishes and an increase in the number of superficial cells occurs (20).

According to Ramaesh et al. (21), the normal keratinization process the mucosa undergoes can be accelerated by a chronic irritation, producing an increase in the number of superficial cells. The results obtained in the present study are in agreement with Ramaesh et al. (22), who evaluated tobacco, a irritant physical and chemical agent, and not only a physical injury.

Normal oral mucosa cells have a small, single, centralized nucleus and abundant cytoplasm. Abnormal or dysplastic cells have a larger nucleus, which may or may not

be single, occupying a large part of the cytoplasm and the nuclear membrane is irregular (23). According to Ramaesh et al. (21), normal cells, of dysplastic lesions and of squamous cell carcinoma, show a gradual increase in the nucleus and gradual reduction in cytoplasm. Thus, from the characteristics of the smears analyzed in this study, (Classes I – 89.17% and II – 10.83%) one can infer that the orthodontic appliances are not capable of inducing alterations in the genetic material.

The accessories placed in the individuals in the present study reproduced a clinical condition that is usual in Orthodontics. The ligatures and wires can protect the mucosa from direct friction with the wings of orthodontic brackets. One expected that the elastic ligature, due to its larger volume, would cause less injury to the adjacent epithelium, but this was not verified.

All the individuals in the sample presented hyperparakeratosis in the epithelium adjacent to the accessories, corroborating the findings of Pereira et al. (24). In addition to friction, one could think of cytotoxicity as a possible etiologic factor of these alterations. However, Mockers et al. (25), in an *in vitro* study, found no evidence of significant cytotoxic effects both of the metal and non-metal materials (of polycarbonate and ceramics). This shows that having used ceramic brackets associated with metal elements (stainless steel wire and metal ligatures), none of these materials possibly had any influence on the cytological analyses performed.

Although an adaptive response to the injury caused by the accessories was verified, such alterations are reversible and the benefits provided by orthodontic treatment compensate the discomfort suffered by the patients.

Based on the results of the present study, it could be concluded that the ceramic brackets, stainless steel wires and metal or elastic ligatures are capable of inducing cytomorphometric and cytomorphologic alterations to the epithelial cells of the oral mucosa, which suggest an adaptive process towards the physical injury that regresses after the appliances are removed. Both ligatures caused the same intensity of alterations in the epithelium.

**REFERENCES**

1. KVAM E, BONDEVIK O, GJERDET NR. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. Community Dent Oral Epidemiol 1989; **17**: 154-7.

2. DAVID A, LOBNER D. *In vitro* cytotoxicity of orthodontic archwires in cortical cell cultures. Eur J Orthod 2004; **26**: 421-6.

3. FORSBERG CM, BRATTSTRÖM V, MALMBERG E, NORD CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. Eur J Orthod 1991; **13**: 416-20.

4. TURKKAHRAMAN H, SAYIN MO, BOZKURT FY, YETKIN Z, KAYA S, ONAL S. Archwire ligations techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. Angle Orthod 2004; **75**: 231-6.

5. FABER J. Tying twin brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2000; **118**: 101-6.

6. MATTINGLY JA. Enhancement of *Streptococcus mutans* colonization by direct bonded orthodontic appliances. J Dent Res 1983; **62**: 1209-11.

7. ROSENBLOOM RG, TINANOFF N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during and after orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1991; **100**: 35-7.

8. MACKENZIE IC, ETTINGER RL. Differences in the response of rodent oral mucosa and skin to repeated surface trauma. J Prosthet Dent 1975; **34**: 666-74.

9. MEHROTRA R, GUPTA A, SINGH M, IBRAHIM R. Application of citology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. Mol Cancer 2006; **23**: 5-11.

10. COWPE JG, LONGMORE RB, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: An age, site and sex related survey. J R Soc Med 1985; **78**: 995-1004.

11. OGDEN GR, COWPE JG, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. J Oral Pathol Med 1990; **19**: 53-5.

12. SUGERMAN PB, SAVAGE NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. Aust Dent J 1996; **41**: 71-4.

13. LANGE DE, MEYER M, HAHN W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bollous lesions. J Periodontol 1972; **43**: 433-7.

14. 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.

15. MARAKI D, BECKER J, BOECKING A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. J Oral Pathol Med 2004; **33**: 398-404.

16. MJÖR IA, FEJERSKOV O. Human Oral Embriology and Histology. Copenhagen: Munksgaard, 1986.

17. 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.

18. TEN CATE AR. Oral Histology: development, structure and function. 5th ed. St Louis: Mosby-Year Book, 1998.

19. CANIKLIOGLU C, ÖZTÜRK Y. Patient discomfort: A comparison between lingual and labial fixed appliances. Angle Orthod 2004; **75**: 86-91.

20. WOYCEICHOSKI IEC, ARRUDA EP, RESENDE L, MACHADO MAN, GRÉGIO AMT, AZEVEDO LR, LIMA AAS. Cytomorphometric analysis of crack

cocaine effects on the oral mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; **105**: 745-9.

21. RAMAESH T, MENDIS BRRN, RATNATUNGA N, THATTIL RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leucoplakia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1998; **27**: 83-6.

22. 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.

23. BERNSTEIN ML, MILLER RL. Oral exfoliative cytology. JADA 1978; **96**: 626-9.

24. PEREIRA BR, TANAKA OM, LIMA AAS, GUARIZA-FILHO O, MARUO H, CAMARGO ES. Metal and ceramic brackets effects on human buccal mucosa epithelial cells. Angle Orthod 2009;**79**:373–9.

25. MOCKERS O, DEROZE D, CAMPS J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires *in vitro*. Dent Mater 2002; **18**: 311-7.

## TABLES

**Table 1** - Descriptive statistics of the variables NA, CA, NA/CA according to moment and Student's-*t* test for the inter-group analysis at the same moment of observation

| Variables | Moment | Metal (n=20) | | | Elastic (n=20) | | | *P*-Value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Mean | Median | Standard Deviation | Mean | Median | Standard Deviation | |
| NA | M0 | 71.979 | 74.881 | 9.458 | 72.961 | 74.867 | 9.247 | 0.985444 |
| | M1 | 49.057 | 48.130 | 5.664 | 51.882 | 51.908 | 6.770 | 0.401341 |
| | M2 | 62.707 | 64.154 | 7.693 | 63.335 | 65.019 | 7.260 | 0.998230 |
| CA | M0 | 2249.753 | 2228.387 | 210.125 | 2253.489 | 2192.506 | 196.357 | 0.999997 |
| | M1 | 2610.413 | 2597.432 | 194.195 | 2588.976 | 2619.344 | 152.325 | 0.985642 |
| | M2 | 2391.494 | 2347.986 | 157.481 | 2406.825 | 2388.844 | 154.087 | 0.997011 |
| NA/CA | M0 | 0.048 | 0.034 | 0.068 | 0.050 | 0.034 | 0.073 | 0.999999 |
| | M1 | 0.028 | 0.020 | 0.038 | 0.029 | 0.020 | 0.040 | 0.999999 |
| | M2 | 0.027 | 0.027 | 0.003 | 0.040 | 0.027 | 0.060 | 0.960617 |

NA: nuclear area; CA: cytoplasmic area; NA/CA: nucleus-to-cytoplasm area ratio; M: moment
* Values statistically significant when $P<0.05$.

**Table 2** - Tukey HSD test for intra-group analysis, according to the variables NA, CA, NA/CA

| Variables | Metal | | | Elastic | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0xM1 | M0xM2 | M1xM2 | M0xM1 | M0xM2 | M1xM2 |
| NA | **0.000122*** | **0.000122*** | **0.000122*** | **0.000122*** | **0.000122*** | **0.000122*** |
| CA | **0.000122*** | **0.000543*** | **0.000122*** | **0.000122*** | **0.000226*** | **0.000124*** |
| NA/CA | 0.792983 | 0.757689 | 1.000000 | 0.799380 | 0.990894 | 0.984595 |

NA: nuclear area; CA: cytoplasmic area; NA/CA: nucleus-to-cytoplasm area ratio; M: moment
* Values statistically significant when $P<0.05$.

**Table 3** – Type of cells predominant in the smears, according to moment and type of ligatures

| | Superficial | Sub-superficial | Spinosum | Basale |
|---|---|---|---|---|
| M0 Metal | 12 | 8 | 0 | 0 |
| M0 Elastic | 12 | 8 | 0 | 0 |
| M1 Metal | 16 | 4 | 0 | 0 |
| M1 Elastic | 17 | 3 | 0 | 0 |
| M2 Metal | 15 | 5 | 0 | 0 |
| M2 Elastic | 13 | 7 | 0 | 0 |
| Total | **85** | **35** | 0 | 0 |

M: moment.

## FIGURES

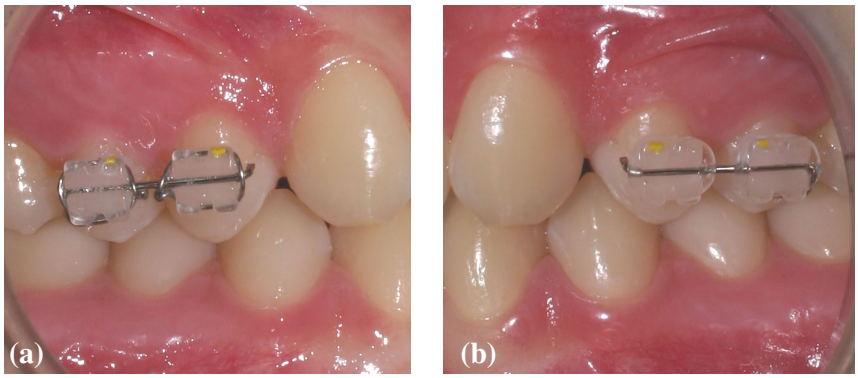



**Figure 1** Segment of orthodontic wire fixed to brackets by means of metal ligatures (a); segment of orthodontic wire fixed to brackets by means of elastic ligatures (b)

# 3 ANEXOS

## ANEXO I – Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), parecer nº 001254/07 (Anexo III, página 47).

### Amostra

Foram selecionados 20 indivíduos, que se encaminharam para a Clínica de Odontologia da PUCPR para a realização de tratamento odontológico. Participaram indivíduos de ambos os gêneros, sendo 6 do gênero masculino e 14 do gênero feminino, com idade média de 21,1 anos, entre 20 e 31 anos.

Os critérios de inclusão para participação da pesquisa foram indivíduos com ausência de história de tabagismo e etilismo, tratamento com antibióticos ou esteróides, doenças debilitantes, uso de colutórios bucais, e que não apresentassem prótese total ou parcial removível, ou qualquer tipo de lesão na mucosa bucal.

A cada indivíduo foram explicados de forma detalhada os objetivos específicos desta pesquisa e foi assinado um termo de consentimento de participação na pesquisa (Anexo IV, página 48), quando houve concordância.

Como benefício, todos os indivíduos que participaram da pesquisa receberam acessórios para escovação (escova, dentifrício e fio dental), instrução de higiene bucal, orientações sobre a sua maloclusão, caso fosse diagnosticada, a importância do tratamento ortodôntico e, existindo interesse, o próprio tratamento ortodôntico corretivo.

### Instalação dos acessórios

*Brackets* cerâmicos[1] foram colados nas faces vestibulares dos primeiros e segundos pré-molares superiores direitos e esquerdos em cada indivíduo.

Primeiramente foi realizada a profilaxia dos dentes com taça de borracha, pedra-pomes e água durante 20 segundos, para a remoção da película adquirida e da placa bacteriana (figura 1a, página 35). A região de pré-molares superiores foi isolada com afastador e rolos de algodão para a obtenção de um campo limpo e seco. O

[1] Allure® *Straight Wire*, *slot* 0,022"x0,025", GAC, Bohemia, NY, USA

condicionamento ácido foi realizado por meio da aplicação de ácido fosfórico a 37%[2] durante 30 segundos[3] sobre a superfície do esmalte (figura 1b, página 35). Em seguida, foi realizado enxágüe abundante com água para a remoção completa do ácido e secagem da superfície com jato de ar (figura 1c, página 35). O *primer* do *kit* do Transbond XT®[4] foi aplicado com a ajuda de um *microbrush* e polimerizado segundo a orientação do fabricante (20 segundos).

O posicionamento dos *brackets* foi feito com uma pinça clínica, com a colocação de um incremento do compósito resinoso Transbond XT®[5] sobre a base do *bracket*, pressionando-o sobre a superfície dentária. A remoção dos excessos foi realizada com auxílio de uma sonda exploradora. Com a ajuda de um guia de fio de aço inoxidável[6] com espessura de 0,020", os *slots* ficaram em um mesmo eixo horizontal (figura 2a, página 35) e este foi mantido em posição até o término da polimerização por meio de luz halógena. A polimerização foi realizada durante 40 segundos, sendo 10 segundos em cada face do *bracket* (figura 2b, página 35).

Em seguida, outro segmento de fio de aço inoxidável[7] com espessura de 0,020", foi inserido nos *slots* dos *brackets* de ambos os lados. Os segmentos de fio não apresentaram dobras, uma vez que os *slots* de cada conjunto de dois *brackets* estavam alinhados, exceto nas extremidades mesial e distal que foram dobradas uma no sentido palatino e outra no sentido oclusal. O objetivo dessas dobras foi evitar que o segmento de fio girasse ou deslizasse, impedindo, desta forma, fricção adicional na mucosa bucal adjacente, o que poderia causar viés nos resultados.

---

[2] Cond-Ac 37%®, FGM, Joinville, SC, Brasil

[3] VICENTE A, BRAVO LA, ROMERO M, ORTIZ AZ, CANTERAS M. Effects of 3 adhesion promoters on the shear bond strength of orthodontic brackets: an in-vivo study. Am J Orthod Dentofac Orthop 2006; 129:390-5.

[4] 3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, CA, USA.

[5] 3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, CA, USA.

[6] Shiny Bright®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA.

[7] Shiny Bright®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA.

**Figura 1** Profilaxia (a); Condicionamento ácido (b); Superfície do esmalte seca e pronta para a colagem (c)

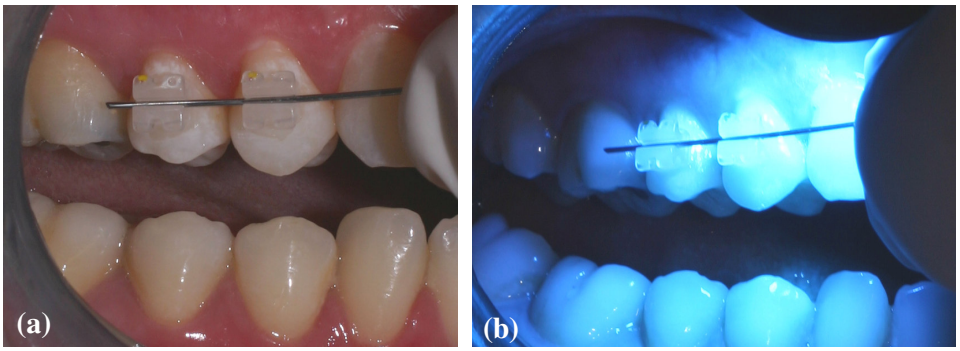



**Figura 2** Posicionamento por meio do guia de fio de aço (a); Polimerização (b)

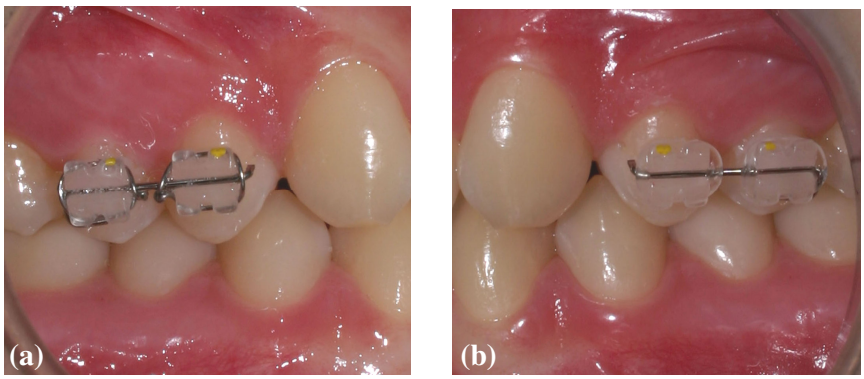



**Figura 3** Segmento de fio ortodôntico fixado nos *brackets* por meio de ligaduras metálicas (a); segmento de fio ortodôntico fixado nos *brackets* por meio de ligaduras elásticas (b)

Para a fixação dos fios nos *brackets* foram colocadas ligaduras elásticas[8] e metálicas[9] com espessura de 0,012". Em cada indivíduo foram colocadas aleatoriamente ligaduras do mesmo tipo em cada lado, porém de tal forma que metade dos indivíduos recebessem ligaduras elásticas no lado direito e metálicas no lado esquerdo e nos outros indivíduos o inverso ocorresse (figura 3a e b, página 35).

**Coleta das células epiteliais**

As coletas das células da mucosa bucal adjacente aos acessórios foram realizadas com um *kit* do sistema DNA-Citoliq[10], denominado *Universal Collection Medium* (UCM), cujo registro no Ministério da Saúde está sob o número 10322550015 (figura 4a e b, página 37). Este *kit* é composto por um frasco, contendo 1ml de UCM e uma escova citológica com cabo longo. A solução UCM é composta por N-Butanol, polietilenoglicol, ácido acético glacial, azida sódica, ácido etilenodiaminotetracetico (EDTA) e água deionizada.

A coleta foi realizada em três tempos distintos: antes da instalação dos acessórios (T0 - controle), trinta dias após, antes da remoção dos mesmos (T1), e trinta dias após a remoção (T2).

Antes da coleta, os indivíduos foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água durante 20 segundos para remover possíveis restos alimentares. A escova do kit foi posicionada de tal forma que as cerdas maiores tocassem a mucosa jugal adjacente à região onde os *brackets* estavam posicionados (figura 5, página 37), e realizados movimentos giratórios (cinco voltas) no sentido horário, de forma suave. A escova com o material coletado foi acondicionada no frasco já aberto, tomando-se o cuidado para que a mesma estivesse totalmente imersa pela solução UCM (figura 6a, página 37). No local pré-determinado pelo fabricante o cabo da escova foi seccionado. Para permitir que as células colhidas ficassem totalmente imersas no meio líquido, o frasco tampado foi agitado por um período mínimo de 30 segundos (figura 6b, página 37). O frasco permaneceu fechado, com a escova imersa no líquido, até o momento em que o material foi transferido, no processamento histológico, para a superfície de uma lâmina de vidro.

---

[8] Mini Stix Non-Coated®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA.

[9] Dentalloy®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA.

[10] Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

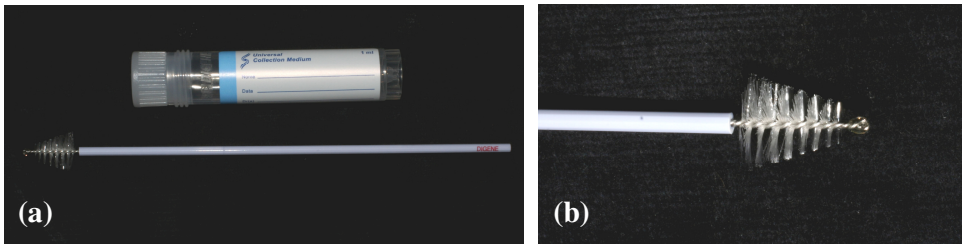



**Figura 4** *Kit* do sistema DNA-Citoliq (a); Escova do *kit* (b)

**Figura 5** Coleta das células da mucosa bucal

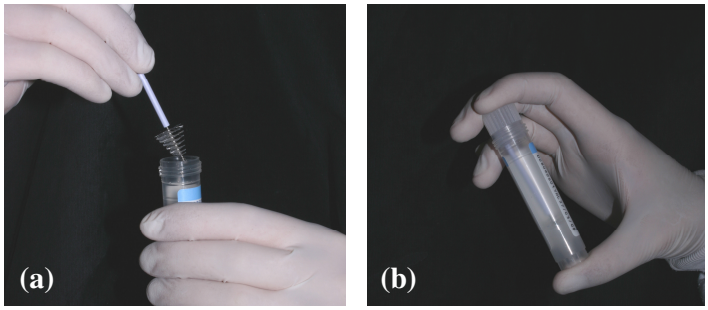



**Figura 6** Escova sendo imersa na solução UCM (a); Agitação do frasco (b)

## Processamento histológico

Previamente ao processamento histológico, foi realizada a identificação das lâminas com o nome do indivíduo, lado da cavidade bucal no qual foi realizada a coleta, tipo de ligadura utilizada e tempo (T0, T1 e T2). Em uma prensa metálica (Prepgene®)[11], um filtro especial composto por uma membrana de policarbonato (Filtrogene®)[12] foi adaptado junto com uma cartela contendo 12 lâminas histológicas (Lamigene®)[13]. Os frascos foram colocados no *UCM rack* (figura 7a, página 39) e, em seguida, foram homogeneizados por meio de um aparelho agitador de tubos do tipo

[11] Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

[12] Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

[13] Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

vórtex[14] (figura 7b, página 39) em alta velocidade e por tempo mínimo de 20 segundos. Com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 200 µl da amostra foi transferida do interior do frasco para a membrana de policarbonato (figura 7c, página 39). A prensa metálica foi fechada por aproximadamente 10 segundos (figura 7d, página 39), promovendo o *imprint* do material sobre a lâmina (figura 8, página 40).

Para a fixação das células, as lâminas foram imersas em solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos (figura 9a, página 40). A seguir, foi procedida a coloração com a técnica de Papanicolaou (figura 9b, página 40) conforme o quadro 1.

**Quadro 1 –** Técnica da coloração de Papanicolaou

| SEQUÊNCIA | 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 de Harris | 1 minuto |
| 6 | Água corrente | 2 minutos |
| 7 | HCL 0,5% | 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 | 2 mergulhadas |
| 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 absoluto | 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 | | |

**Análises citomorfométrica e citomorfológica**

A leitura das lâminas foi realizada por um único operador, devidamente calibrado, e estas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés.

Na análise citomorfométrica, os esfregaços foram observados por meio de microscopia de luz, com o uso de um microscópio binocular, modelo Olympus BX50[15],

[14] Vortex, Bionatic®, 2.500 rpm.

[15] Olympus®, Japão.

adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65[16] (figura 10, página 40). Cinqüenta células de cada lâmina foram examinadas aleatoriamente[17], sendo evitadas as áreas em que as células se apresentavam dobradas e/ou sobrepostas ou aglomeradas (figura 11a e b, página 40), visto que a delimitação da área celular seria dificultada. A ampliação para a captura da imagem dos campos citológicos foi feita em 400 vezes por uma câmera Sony CCD Íris Color Vídeo, modelo DXC-107A[18] associada ao *software Image Pro Plus*, versão 4.5.029 *for Windows* 98/NR/2000[19]. Com este software também foi possível a avaliação das imagens das células, permitindo a delimitação do núcleo e do citoplasma de cada célula, por meio da utilização do cursor digitador, após as imagens terem sido salvas em computador. As áreas do núcleo (AN) e do citoplasma (AC) foram obtidas em $\mu m^2$ com o *software* no modo "Medida"[20] (figura 12, página 42). Os valores foram tabulados no *software* Microsoft Excel e, após, foram obtidos os valores da relação área do núcleo/área do citoplasma (AN/AC) de cada célula.

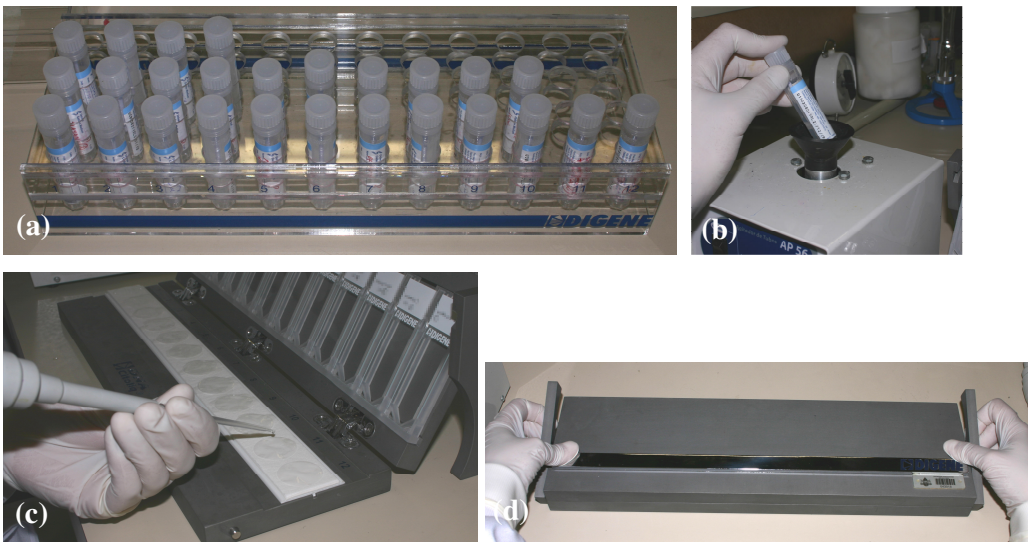



**Figura 7** Frascos posicionados no UCM *rack* (a); Homogeneização do frasco no vórtex (b); Transferência do meio líquido para a membrana (Filtrogene®) com a pipeta (c); Prensa para o *imprint* das células (d)

[16] Olympus®, Japão.

[17] COWPE JG, LONGMORE RB, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: An age and sex related survey. J R Soc Med 1985; 78: 995-1004.

[18] Sony Electronics, Inc., USA.

[19] Media Cybernetics Inc., USA

[20] OGDEN GR, COWPE JG, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. J Oral Pathol Med 1990; 19: 53-5.

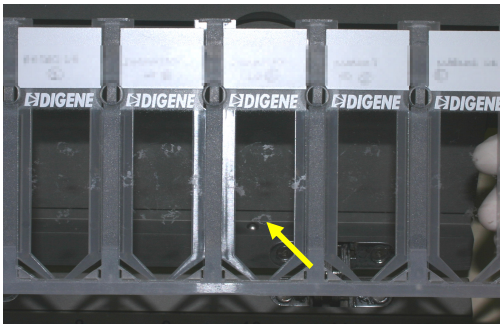



**Figura 8** *Imprint* das células sobre as lâminas

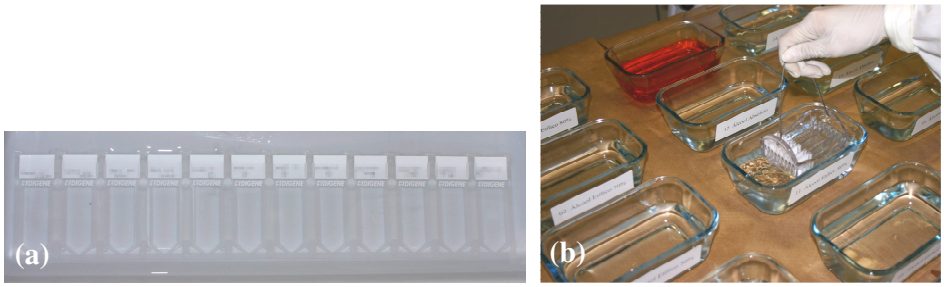



**Figura 9** Lâminas imersas em álcool absoluto (a); Coloração de Papanicolaou (b)

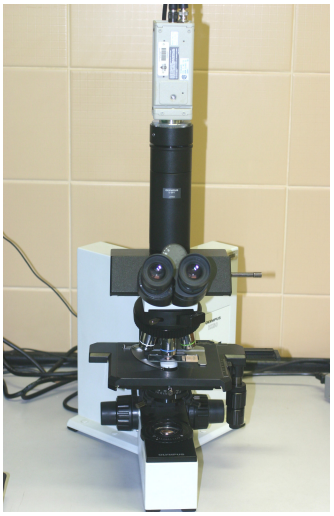


**Figura 10** Microscópio binocular, modelo Olympus BX50 acoplado a uma câmera Sony CCD Íris Color Vídeo, modelo DXC-107A

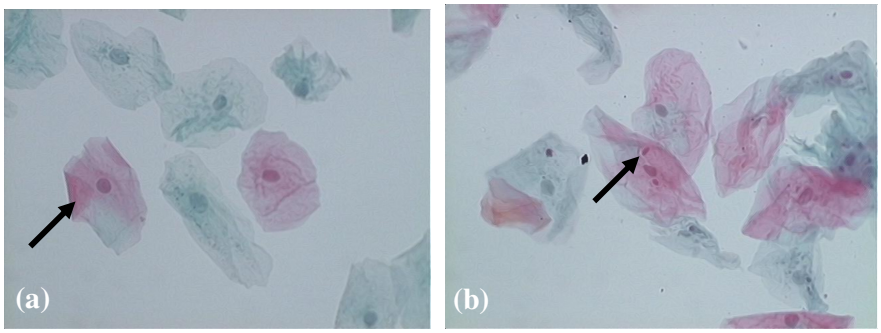



**Figura 11** Células dobradas (Papanicolaou - 400X) (a); Células aglomeradas (Papanicolaou - 400X) (b)

Para verificar o erro de reprodutibilidade, foram medidas 50 células por um único operador, duas vezes, com 30 dias de intervalo. A reprodutibildade foi confirmada pela Fórmula de Dahlberg, que gerou um Coeficiente de Confiabilidade > 90, indicando inexistência de erro casual.

Na análise citomorfológica, inicialmente foi avaliado o grau de ceratinização da mucosa pela técnica de Papanicolaou. O que determina a coloração de cada célula é a afinidade dos constituintes citoplasmáticos (ex: ceratina) com os corantes (EA-36, Hematoxilina e Orange G). O citoplasma se torna mais denso durante a maturação das células epiteliais, ocorrendo um aumento na quantidade de ceratina. Apenas os citoplasmas menos densos são penetrados pelos corantes de maior massa molecular (EA-36), presentes nas células imaturas. No citoplasma denso das células ceratinizadas os corantes com menor massa molecular (Hematoxilina e Orange G) têm capacidade de penetrar.

Desta forma, o mesmo microscópio binocular foi utilizado para esta análise, porém adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 10X/0,25, 20X/0,40 e 40X/0,65. Toda a extensão dos esfregaços foi percorrida, realizando-se a classificação de acordo com o predomínio das células presentes (figuras 13a e b, página 42) segundo Sugerman e Savage[21] em 1996 (quadro 2, página 43).

Ainda na análise citomorfológica, os esfregaços foram classificados de acordo com os critérios citológicos de Papanicolaou[22] em:

Classe 0: material insuficiente ou inadequado para análise.

Classe I (esfregaço normal): padrão normal de morfologia das células observadas em todo o esfregaço.

Classe II (esfregaço normal com alterações inflamatórias): células inflamatórias presentes em, pelo menos, dois campos do esfregaço. O núcleo e o citoplasma continuam apresentando características benignas.

Classe III (alterações displásicas – esfregaço suspeito): alterações celulares em até dois campos do esfregaço. Células displásicas são aquelas cujos núcleos apresentam algum sinal de malignidade, porém o citoplasma se mantém normal. Estas alterações

---

[21] SUGERMAN PB, SAVAGE NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. Aust Dent J 1996; **41**: 71-74.

[22] LANGE DE, MEYER M, HAHN W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bollous lesions. J Periodontol 1972; **43**: 433-7.

podem incluir: hipercromasia nuclear discreta, núcleos levemente aumentados, grânulos e cordões de cromatina, multinucleação.

Classe IV (fortemente indicativa, mas não conclusiva de malignidade): alterações celulares em dois ou mais campos do esfregaço. O número de células anormais é maior que nas displasias.

Classe V (esfregaço maligno): alterações nucleares compatíveis com neoplasia maligna. Presença de núcleo hipercromático, com grânulos grosseiros de cromatina, espaços vazios, pleomorfismo e mitose atípica.

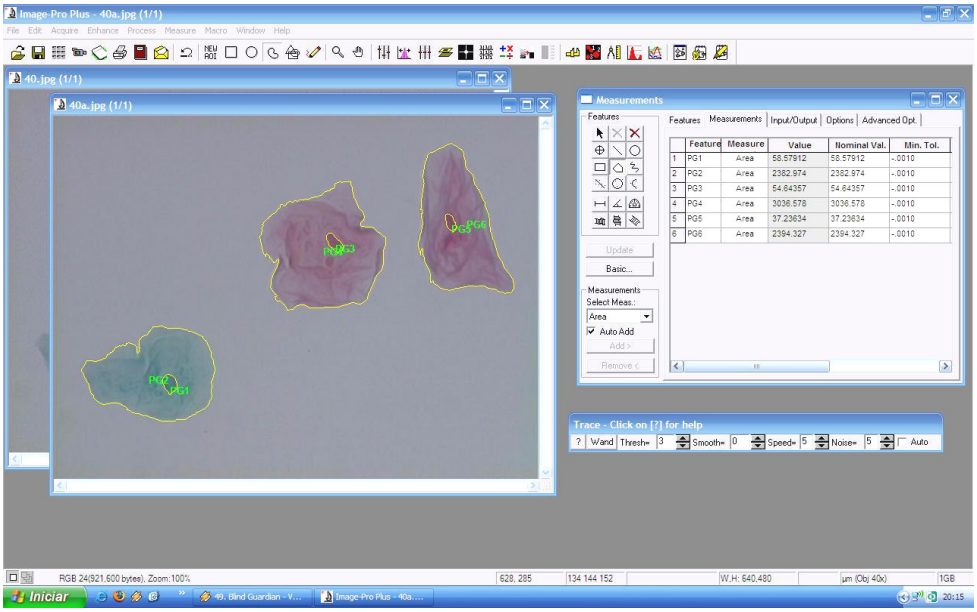



**Figura 12** Layout do *software Image Pro Plus* utilizado na avaliação citomorfométrica

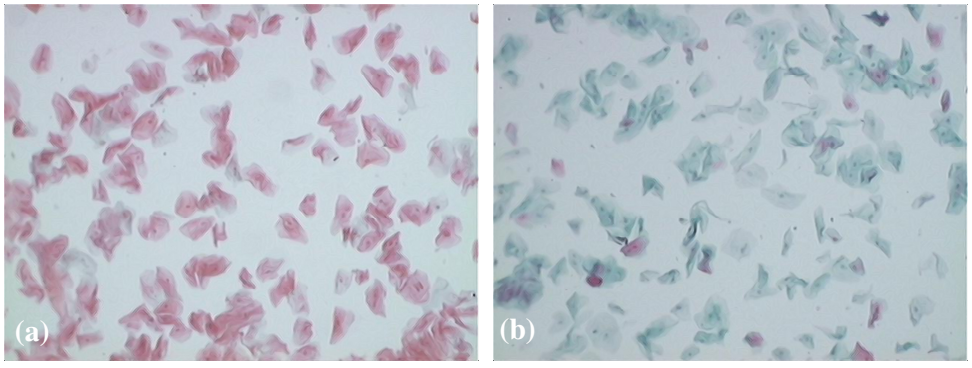



**Figura 13** Lâmina com predomínio de células superficiais (Papanicolaou – 100X) (a); Lâmina com predomínio de células sub-superficiais (Papanicolaou – 100X) (b)

**Quadro 2** – Características da mucosa bucal normal de acordo com a coloração de Papanicolaou

| CAMADA | | CITOPLASMA | NÚCLEO |
|---|---|---|---|
| Superficial | Estrato córneo | vermelho/laranja/marrom | anucleada |
| | Não ceratinizado | vermelho/laranja/quadrilátero | azul picnótico/achatado |
| | Estrato granuloso | azul esverdeado/rosa/laranja<br>grânulos de ceratohialina | azul escuro |
| Sub-superficial | Não granular | azul esverdeado/rosa/laranja<br>quadrilátero | azul escuro |
| Estrato espinhoso | | azul esverdeado/rosa/laranja<br>ovóide | azul<br>largo |
| Estrato basal | | verde/azul esverdeado<br>ovóide e pequeno | azul<br>redondo |

Fonte: Sugerman e Savage (1996)

**Análise estatística**

Todos os dados foram tabulados e testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o *software Statistical Package for the Social Science 13.0 for Windows* (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se as amostras para os diferentes grupos (metálico e elástico) nos diferentes tempos (T0, T1 e T2) apresentavam normalidade e teste de homogeneidade de Levene visando avaliar se os dados apresentavam homogeneidade de variâncias. Como a maioria das variáveis apresentou normalidade e homogeneidade, aplicou-se ANOVA a 2 critérios com medidas repetidas visando comparar se existia diferença entre AN, AC e AN/AC segundo ligadura metálica, elástica e tempo, uma vez que cada paciente era seu próprio controle. Quando ANOVA indicou existir diferença significante entre os grupos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey HSD visando detectar quais grupos diferiam entre si. Para analisar o predomínio de células presentes, de acordo com Sugerman e Savage, foi realizado o teste da Diferença entre duas proporções. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

## ANEXO II – Tabelas e Gráficos

**TABELA I** - TESTE DE NORMALIDADE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA AS VARIÁVEIS AN, AC, AN/AC, PUCPR-2008

| | TEMPO | METÁLICA | | | ELÁSTICA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ESTATÍSTICA | G.L. | VALOR p | ESTATÍSTICA | G.L. | VALOR p |
| AN | T0 | 0,1748 | 20 | 0,1108 | 0,1730 | 20 | 0,1189 |
| | T1 | 0,1639 | 20 | 0,1651 | 0,0864 | 20 | 0,2000 |
| | T2 | 0,1636 | 20 | 0,1670 | 0,1335 | 20 | 0,2000 |
| AC | T0 | 0,1444 | 20 | 0,2000 | 0,1940 | 20 | 0,0500 |
| | T1 | 0,1058 | 20 | 0,2000 | 0,1323 | 20 | 0,2000 |
| | T2 | 0,2216 | 20 | **0,0112*** | 0,1362 | 20 | 0,2000 |
| AN/AC | T0 | 0,4999 | 20 | **0,0000*** | 0,4959 | 20 | **0,0000*** |
| | T1 | 0,5078 | 20 | **0,0000*** | 0,5002 | 20 | **0,0000*** |
| | T2 | 0,1183 | 20 | 0,2000 | 0,5104 | 20 | **0,0000*** |

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: AN: área do núcleo; AC: área do citoplasma; AN/AC: relação área do núcleo / área do citoplasma; T: tempo; G.L.: grau de liberdade

NOTA: * Valores estatisticamente significantes quando p<0,05.

**TABELA II** - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DAS VARIÁVEIS AN, AC, AN/AC, SEGUNDO TEMPO E GÊNERO, PUCPR-2008

| | | TEMPO | FEMININO (n=14) | | | MASCULINO (n=6) | | | VALOR p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | MÉDIA | MEDIANA | DESVIO PADRÃO | MÉDIA | MEDIANA | DESVIO PADRÃO | |
| Metálica | AN | T0 | 70,500 | 73,901 | 10,756 | 75,429 | 75,668 | 4,325 | 0,161 |
| | | T1 | 47,771 | 46,980 | 5,723 | 52,055 | 51,500 | 4,619 | 0,124 |
| | | T2 | 61,071 | 60,890 | 8,676 | 66,524 | 66,912 | 2,059 | **0,042*** |
| | AC | T0 | 2263,920 | 2203,073 | 207,195 | 2216,698 | 2291,011 | 233,000 | 0,658 |
| | | T1 | 2586,341 | 2556,406 | 225,635 | 2666,580 | 2672,275 | 74,351 | 0,412 |
| | | T2 | 2385,092 | 2342,901 | 181,238 | 2406,431 | 2373,059 | 91,950 | 0,790 |
| | AN/AC | T0 | 0,032 | 0,033 | 0,005 | 0,085 | 0,035 | 0,122 | 0,341 |
| | | T1 | 0,031 | 0,020 | 0,046 | 0,020 | 0,020 | 0,002 | 0,558 |
| | | T2 | 0,026 | 0,026 | 0,004 | 0,028 | 0,028 | 0,001 | 0,260 |
| Elástica | AN | T0 | 71,276 | 72,605 | 10,440 | 76,891 | 77,453 | 3,887 | 0,097 |
| | | T1 | 50,348 | 49,356 | 6,746 | 55,463 | 56,718 | 5,817 | 0,124 |
| | | T2 | 62,079 | 63,556 | 7,453 | 66,267 | 68,199 | 6,414 | 0,247 |
| | AC | T0 | 2220,123 | 2141,624 | 162,379 | 2331,343 | 2388,235 | 259,939 | 0,256 |
| | | T1 | 2552,819 | 2551,982 | 139,894 | 2673,341 | 2717,647 | 158,390 | 0,106 |
| | | T2 | 2375,125 | 2351,520 | 140,442 | 2480,793 | 2508,195 | 171,933 | 0,166 |
| | AN/AC | T0 | 0,056 | 0,036 | 0,088 | 0,034 | 0,033 | 0,004 | 0,543 |
| | | T1 | 0,033 | 0,020 | 0,048 | 0,021 | 0,021 | 0,001 | 0,555 |
| | | T2 | 0,046 | 0,027 | 0,072 | 0,027 | 0,026 | 0,002 | 0,539 |

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: AN: área do núcleo; AC: área do citoplasma; AN/AC: relação área do núcleo/ área do citoplasma; T: tempo

**TABELA III** - TESTE DA DIFERENÇA ENTRE DUAS PROPORÇÕES SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008

| | PROPORÇÃO 1 | PROPORÇÃO 2 | VALOR p |
|---|---|---|---|
| T0M/T1M | 0,6 | 0,8 | 0,1756 |
| T0E/T1E | 0,6 | 0,85 | 0,0847 |
| T0M/T2M | 0,6 | 0,75 | 0,3176 |
| T0E/T2E | 0,6 | 0,65 | 0,7458 |
| T1M/T2M | 0,8 | 0,75 | 0,7071 |
| T1E/T2E | 0,85 | 0,65 | 0,1523 |

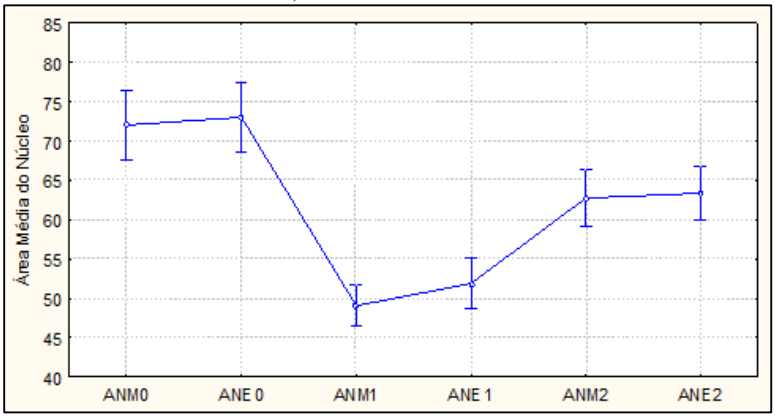
FONTE: Dados da pesquisa
LEGENDA: T: tempo; M: ligadura metálica; E: ligadura elástica
NOTA: * Valores estatisticamente significantes quando p<0,05.

**TABELA IV** – CLASSIFICAÇÃO DOS ESFREGAÇOS DE ACORDO COM PAPANICOLAOU SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008

| | T0M | T0E | T1M | T1E | T2M | T2E |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Classe 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Classe I | 19 | 18 | 17 | 17 | 18 | 18 |
| Classe II | 1 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| Classe III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Classe IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Classe V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

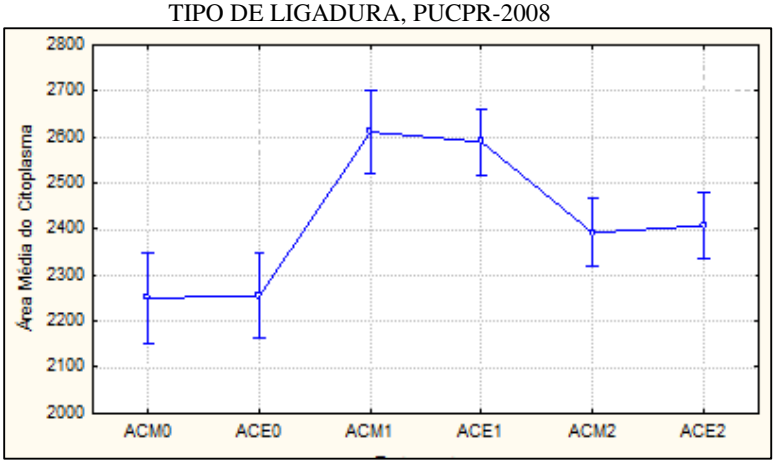
FONTE: Dados da pesquisa
LEGENDA: T: tempo; M: ligadura metálica; E: ligadura elástica.

**GRÁFICO I** – INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DA ÁREA DO NÚCLEO, SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008




FONTE: Dados da pesquisa
LEGENDA: ANM0: área do núcleo da ligadura metálica no tempo 0;
ANE0: área do núcleo da ligadura elástica no tempo 0;
ANM1: área do núcleo da ligadura metálica no tempo 1;
ANE1: área do núcleo da ligadura elástica no tempo 1;
ANM2: área do núcleo da ligadura metálica no tempo 2;
ANE2: área do núcleo da ligadura elástica no tempo 2

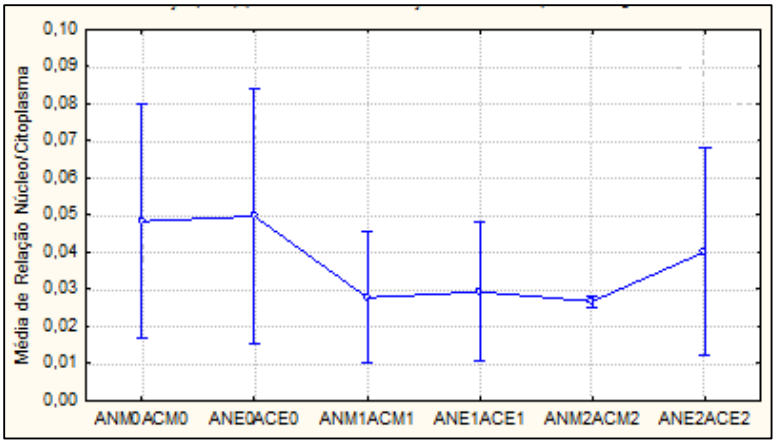
**GRÁFICO II** – INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DA ÁREA DO CITOPLASMA, SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008




FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: ACM0: área do citoplasma da ligadura metálica no tempo 0; ACE0: área do citoplasma da ligadura elástica no tempo 0; ACM1: área do citoplasma da ligadura metálica no tempo 1; ACE1: área do citoplasma da ligadura elástica no tempo 1; ACM2: área do citoplasma da ligadura metálica no tempo 2; ACE2: área do citoplasma da ligadura elástica no tempo 2

**GRÁFICO III** – INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DA RELAÇÃO NÚCLEO/CITOPLASMA, SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008




FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: ANM0ACM0: relação da área do núcleo com a área do citoplasma da ligadura metálica no tempo 0; ANE0ACE0: relação da área do núcleo com a área do citoplasma da ligadura elástica no tempo 0; ANM1ACM1: relação da área do núcleo com a área do citoplasma da ligadura metálica no tempo 1; ANE1ACE1: relação da área do núcleo com a área do citoplasma da ligadura elástica no tempo 1; ANM2ACM2: relação da área do núcleo com a área do citoplasma da ligadura metálica no tempo 2; ANE2ACE2: relação da área do núcleo com a área do citoplasma da ligadura elástica no tempo 2

## ANEXO III – Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**
**Núcleo de Bioética**
**Comitê de Ética em Pesquisa**

PUCPR

**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

Parecer Nº **0001254/07** Protocolo CEP Nº **2005**
Titulo do projeto **A influência de brackets cerâmicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e citomorfológica** Grupo **III** Versão **2**
Protocolo CONEP Pesquisador responsável **Elisa Souza Camargo**
Instituição

**Objetivos**

Analisar as células epiteliais da mucosa bucal em função da fricção com brackets cerâmicos.

**Comentários**

O projeto é uma segunda versão e foi devidamente corrigida.

**Termo de consentimento livre e esclarecido**

Está adequado.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **05/12/2007**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

**Situação Aprovado**

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.
Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 05 de Dezembro de 2007.

**Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira**
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**
**PUCPR**

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos PUCPR CEP

**ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O indivíduo _____, RG _____ está sendo convidado a participar de um estudo denominado: "**A influência de *brackets* cerâmicos na mucosa bucal: análise citomorfométrica e citomorfológica"** cujo objetivo é analisar as células da região da bochecha em contato com acessórios ortodônticos.

Caso aceite participar desta pesquisa o indivíduo será submetido(a) à colagem de dois acessórios (peças de cerâmica denominadas *brackets*) que compõem o aparelho ortodôntico fixo nos lados direito e esquerdo da boca, em dois dentes, os primeiros e segundos pré-molares e à colocação de um segmento de fio metálico, preso a estes acessórios. Em seguida, para a realização do estudo do tecido da bochecha em contato com os acessórios, este tecido será raspado com uma pequena escova própria para este procedimento. Estes exames serão realizados três vezes: antes da colocação dos acessórios, trinta dias após a sua colocação (momento em que os acessórios serão removidos) e 30 dias após a remoção dos mesmos. Os exames acima citados não causam dor ou desconforto, não requerem cuidados especiais (jejum, dieta específica, entre outros) e não irão trazer nenhum custo ao paciente.

Como benefício(s) pela participação neste estudo, todos os indivíduos participantes receberão instrução de higiene bucal, acessórios para escovação (escova, creme dental e fio dental), orientações sobre problemas nas posições dos dentes, se estes forem diagnosticados, a importância de tratamento ortodôntico e, existindo interesse, o tratamento ortodôntico corretivo. Como possível risco para o participante da pesquisa, algum dos acessórios poderá descolar da superfície do dente por descuido do próprio indivíduo, ou seja, caso ele mastigue alimentos duros e/ou pegajosos. Se isto ocorrer, os acessórios poderão ferir a mucosa bucal, causando desconforto, portanto, caso isto ocorra, o participante deverá contatar a pesquisadora através do telefone (41) 3271-1637 (Secretaria da Pós-graduação em Odontologia), que providenciará a remoção dos mesmos. Neste caso, esta região da mucosa bucal não será incluída na pesquisa, uma vez que esta injúria causada pelo acessório descolado poderá causar distorção nas células coletadas.

A sua privacidade será respeitada, ou seja, o seu nome, ou qualquer outro dado confidencial, serão mantidos em sigilo, ou seja, não serão divulgados O responsável está ciente de que pode se recusar a participar do estudo, ou retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar.

A pesquisadora responsável por este estudo será, a professora Dra. Elisa Souza Camargo - 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 sujeito da pesquisa

_____

Assinatura da pesquisadora

Curitiba,_____de _____de 2008.

# ANEXO V – Normas da Revista – Journal of Oral Pathology and Medicine

## 1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Journal of Oral Pathology & Medicine. Authors are encouraged to visit Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

## 2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

### 2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

### 2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

### 2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/, http://isrctn.org/. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

**2.4 Conflict of Interest**
All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading "Conflict of Interest Statement".
**2.5 Appeal of Decision**
Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.
**2.6 Permissions**
If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.
**2.7 Copyright Assignment**
Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Publishing if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.
Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Blackwell Publishing. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Exclusive Licence Form must be sent to the address specified on the Exclusive Licence Form, before any manuscript can be published. Authors must send the completed original Exclusive Licence Form by regular mail upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the Exclusive Licence form at submission. Faxing or e-mailing the Exclusive Licence Form does not meet requirements. For questions concerning copyright, please visit Blackwell Publishing's Copyright FAQ

**3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE**
Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site http://mc.manuscriptcentral.com/jopm. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Anne-Marie Engel at ame@dadlnet.dk
**3.1. Getting Started**
• Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: http://mc.manuscriptcentral.com/jopm.
• Log-in or, if you are a new user, click on "register here".
• If you are registering as new user.
- After clicking on "register here", enter your name and e-mail information and click "Next". Your e-mail information is very important.
- Enter your institution and address information as appropriate, and then click "Next."
- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click "Finish".
• If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under "Password Help". The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
• Log-in and select "Author Centre".
**3.2. Submitting Your Manuscript**
• After you have logged into your "Author Centre", submit your manuscript by clicking the submission link under "Author Resources".
• Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
• Click the "Next" button on each screen to save your work and advance to the next screen.
• You are required to upload your files.

- Click on the "Browse" button and locate the file on your computer.
- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
- When you have selected all files you wish to upload, click the "Upload Files" button.

• Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the "Submit" button when you are finished reviewing.

**3.3. Manuscript Files Accepted**

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance "Figure 1", "Figure 2" etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

**3.4. Blinded Review**

All manuscripts submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine will be reviewed by two experts in the field. Journal of Oral Pathology & Medicine uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

**3.5. Suggest a Reviewer**

Journal of Oral Pathology & Medicine attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, the name and current email address of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript is requested. Additionally, you may mention non-preferred reviewers as well.

**3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process**

You may suspend a submission at any phase before clicking the "Submit" button and save it to submit later. The manuscript can then be located under "Unsubmitted Manuscripts" and you can click on "Continue Submission" to continue your submission when you choose to.

**3.7. E-mail Confirmation of Submission**

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

**3.8. Manuscript Status**

You can access Manuscript Central any time to check your "Author Centre" for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

**3.9. Submission of Revised Manuscripts**

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under "Manuscripts with Decisions" and click on "Submit a Revision". Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. **MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED**

Original Research Articles: of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

Review Papers: Journal of Oral Pathology & Medicine commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: http://mc.manuscriptcentral.com/jopm and are subject to peer-review.

Case Reports: Please note that as of 1st September 2007, Journal of Oral Pathology & Medicine no longer accepts submission of case reports.

Brief Reports: Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. They should not exceed three pages.

Letters to the Editor: Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in Journal of Oral Pathology & Medicine or they may raise new issues, but should have important implications.

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages (excluding figures and tables) are subject to a charge of USD163.00 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

### 5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

### 5.3. Structure

All papers submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

Abstract: is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

Introduction: should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

Materials and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/, http://isrctn.org/. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. .

(ii)Experimental subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the

Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.
(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.
Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.
Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.
Main Text of Review Articles comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.
Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.
Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

**5.4. References**

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based on the formats used in Index Medicus. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style used in Index Medicus and the Vancouver System.
We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp . Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp
Examples of the Journal's reference style:

**(1) Standard journal article**

(List all authors when 6 or less; when 7 or more, list only the first 3 and add et al.)
BUCHNER A, SCIUBBA JJ. Peripheral epithelial odontogenic tumors: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987; **63**: 688-97.
HEINIC GS, GREENSPAN D, MACPHAIL LA, et al. Oral Histoplasma capsulatum infection in association with HIV infection: a case report. J Oral Pathol Med 1992; **21**: 85-9.

**(2) Corporate author**

European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. Lancet 1992; 339: 1007-12.

**(3) No author given**

Anonymous. `The importance of being early' [leader]. Br Dent J 1991; **170**: 167.

**(4) Journal supplement**

MØLLER-PETERSEN J. Evaluation of diagnostic tests. Design and phases. Scand J Clin Lab Invest 1992; **52**: suppl. (208): 35-50.
CROSS SS, SCHOLFIELD JH, KENNEDY A, COTTON DWK. Measuring the fractal dimension of tumour borders. J Pathol 1992; **168**: 117A (abstr).

**(5) Journal paginated by issue**

HILLAM C. Dentistry in Europe in the 1790's. Dent Historian 1992; **22**: (May): 31-4.

**(6) Book**

PINDBORG JJ. Atlas of diseases of the oral mucosa. Copenhagen: Munksgaard, 1992: 50-66.

**(7) Chapter in a book**

VAN DER WAAL I. Salivary gland neoplasms. In: PRABHU SR, WILSON DF, DAFTARY DK, JOHNSON NW, eds. Oral diseases in the tropics. Oxford: Oxford Medical, 1992; 478-86.

**(8) Published proceedings paper**

DRINNAN AJ. Review of the literature: educational aspects of oral medicine. In: MILLARD HD, MASON DK, eds. World workshop on oral medicine. Chicago: Year Book Medical, 1989; 5-11.

**(9) Agency publication**

MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T, POWELL J, WHELAN S. Cancer incidence in five continents: Vol. 5. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; IARC Scientific Publications No. 88.

**(10) Dissertation or thesis**

CHUNGPANICH S. The diagnostic and prognostic potential of nucleolar organizer regions in oral epithelial dysplasia. MMedSci Thesis, University of Sheffield, 1989.

**5.5. Tables, Figures and Figure Legends**

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast.

All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected

Figures divided into parts should be labeled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Blackwell Publishing's guidelines for figures: www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp.

Check your electronic artwork before submitting it: www.blackwellpublishing.com/bauthor/eachecklist.asp

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

Figure Legends: should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

**5.6. Supporting Information**

Supporting Information, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Information is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Information is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Information available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's Web site. The author must advise Blackwell Publishing if the URL of the Web site where the Supporting Information is located changes. The content of the Supporting Information must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed "Supporting Information" and providing titles of figures, tables, etc.

In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

**6. AFTER ACCEPTANCE**

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

**6.1 Proof Corrections**

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html.

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs of the paper should be corrected, signed and returned without delay. Please ensure that you can be contacted during this time. As changes to proofs are costly, we ask you to only correct typesetting errors. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

**6.2 Early View - Online Publication Prior to Print**

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

**6.3 Online Production Tracking**

Online production tracking is available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

**6.4 Author Material Archive Policy**

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

**6.5 Offprints**

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: Offprint Cosprinters If you have queries about offprints please email offprint@cosprinters.com

**6.6 Author Services**

For more substantial information on the services provided for authors, please see Blackwell Publishing Author Services.

# 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