

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

RAUL MAGNOLER SAMPAIO MEI

**ANÁLISE CITOLÓGICA DA MUCOSA BUCAL ADJACENTE A
BRACKETS E LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS**

CURITIBA

2008

RAUL MAGNOLER SAMPAIO MEI

**ANÁLISE CITOLÓGICA DA MUCOSA BUCAL ADJACENTE A
BRACKETS E LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS**

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

M499a
2008 Mei, Raul Magnoler Sampaio
 Análise citológica da mucosa bucal adjacente a *brackets* e ligaduras
 metálicas ou elásticas / Raul Magnoler Sampaio Mei ; orientadora, Elisa Souza
 Camargo ; co-orientador, Antônio Adilson Soares de Lima. – 2008.
 68 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.
III. 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

RAUL MAGNOLER SAMPAIO MEI

ANÁLISE CITOLÓGICA DA MUCOSA BUCAL ADJACENTE A *BRACKETS* E LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS

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):


Prof.ª Dr.ª Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


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


Prof. Dr. Hiroshi Maruo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 11 de Dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Kary e Lígia pelo apoio incondicional e financeiro mesmo nas decisões duvidosas e preocupação no decorrer deste longo tempo e grande distância. Ele, trabalhador incansável e sempre em busca pela excelência... Ela, assistente social, que sempre viu no estudo e dedicação com os pacientes o melhor caminho para a realização pessoal. Com certeza a posição em que estou muito se deve à herança de humildade, persistência e muito trabalho adquirida.

Às minhas irmãs Thais e Mara, pelo apoio e amizade apesar da distância, não medindo esforços para que eu obtivesse sucesso em mais esta etapa em minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, minha orientadora, pela paciência e prontidão disponibilizada desde o primeiro contato de orientação. Também pelas dicas incessantes e muitas vezes repetidas para que fossem lembradas, mostrando sempre o melhor caminho a ser seguido, respeitando as limitações de seus alunos. Um exemplo como mestre, mãe e pessoa pela postura extremamente correta e sempre buscando a perfeição mesmo em situações rotineiras. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

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, meu agradecimento pela atenção e confiança sempre dispensadas.

Ao Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima, co-orientador deste trabalho, que contribuiu de forma inteligente para a realização desta pesquisa, o que me estimulou a prosseguir principalmente nos momentos finais, além de nos disponibilizar todos os materiais e estruturas físicas necessárias.

Ao Prof. Dr. Orlando Tanaka, coordenador do programa de Pós-Graduação em Ortodontia, pela sua busca incansável por descobertas em favor da ciência e dinamismo, contribuindo muito para meu desenvolvimento científico e técnico.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pela sua simplicidade e praticidade em conduzir o atendimento dos pacientes, e sua maneira descontraída e bem-humorada de ensinar.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Maruo, pelas lições de vida e conselhos transmitidos, mostrando com paciência a importância de seguir uma filosofia de tratamento. Também em uma frase nos fazia se sentir melhores: “Por que está nervoso?”.

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

Ao Prof. Sidnei Valieri e ao Prof. Hassan Isber 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.

À colega de turma Mariana Bridi Moschetti, pelo amor, paciência e compreensão imensuráveis, dignos de alguém tão especial, compartilhando alegrias, dificuldades e conquistas, meu eterno reconhecimento.

Aos colegas Bruno Bochnia Cerci, Fernanda Brasil Baboni, Jucienne Salgado Ribeiro, Luciana Borges Retamoso, Luégia Amorim Henriques Knop, Luis Filipe Siu Lon, Marcos Adriano Sabatoski, Ricardo Lima Shintcovsk, Saulo Régis de Oliveira Junior e Tais de Moraes 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.

À secretária Neide Reis Borges e às estagiárias Paula Maiza de Marchi e Aline Cristine Machado Wiens, pela dedicação e bom humor 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 familiares que mesmo distantes, estiveram sempre preocupados e curiosos com minha “carreira de estudante”.

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
MÉTODOS	06
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO	11
CONCLUSÕES	15
REFERÊNCIAS	16
TABELAS	19
ILUSTRAÇÕES	20
2 ARTIGO EM INGLÊS	21
TITLE PAGE	22
ABSTRACT	23
INTRODUCTION	24
METHODS	25
RESULTS	29
DISCUSSION	30
CONCLUSIONS	34
REFERENCES	35
TABLES	38
ILLUSTRATIONS	39
3 ANEXOS	40
ANEXO I – Material e Métodos	41
ANEXO II – Tabelas e Gráficos	55
ANEXO III – Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	58
ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Menor de Idade	60
ANEXO V – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Maior de Idade	61
ANEXO VI – Normas da Revista - Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology	62

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO**ANÁLISE CITOLÓGICA DA MUCOSA BUCAL ADJACENTE A *BRACKETS* E
LIGADURAS METÁLICAS OU ELÁSTICAS****Raul Magnoler Sampaio Mei**

Mestrando 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
Professora Adjunta do Programa de Pós-graduação em Odontologia - Área de
Concentração em Ortodontia
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Mestrado em Odontologia – Ortodontia
Rua Imaculada Conceição, 1155
Cep: 80215-901 – Curitiba – Paraná – Brasil
Telefone: 55 41 3271-1637
Fax: 55 41 3271-1405
E-mail: elisa.camargo@pucpr.br

RESUMO

Objetivos: Avaliar pela citologia esfoliativa em base líquida possíveis alterações citológicas das células epiteliais adjacentes a acessórios ortodônticos. **Design do Estudo:** Em 20 indivíduos foram colados *brackets* nos pré-molares superiores e amarrados fios com ligaduras metálicas ou elásticas. Foi realizada a avaliação citomorfológica e citomorfométrica em 3 tempos: antes da instalação (T0 - controle), 30 dias após a instalação (T1) e 30 dias após a remoção dos acessórios (T2). **Resultados:** ANOVA demonstrou diminuição na área do núcleo e aumento na área do citoplasma nos dois tipos de ligaduras no T1 ($p>0,05$) entre os grupos, e a tendência a retornar aos valores iniciais no T2 ($p<0,05$). No T0 a quantidade de células superficiais ou sub-superficiais foi semelhante enquanto no T1 e T2 predominaram as superficiais. Em todos os tempos somente células normais e inflamatórias foram observadas. **Conclusões:** O aparelho ortodôntico induz adaptações funcionais com maior grau de ceratinização da mucosa bucal e tendem a retornar ao normal após a retirada do estímulo.

INTRODUÇÃO

Durante o tratamento ortodôntico são instalados acessórios como *brackets*, arcos e ligaduras. As ligaduras podem ser de aço inoxidável ou elásticas e permitem a fixação do arco nos *brackets*⁽¹⁾. Estes acessórios, em atrito com a mucosa bucal, podem ocasionar irritação e inflamação, com conseqüente desconforto e dor⁽²⁾. Ulcerações também são comuns nesse tipo de tratamento e estas são relatadas pelos pacientes como as que promovem o maior desconforto⁽³⁾.

A dor proveniente da fricção da mucosa com estes acessórios é, muitas vezes, a razão do abandono do tratamento pelos pacientes⁽²⁾, porém após quatro semanas, este desconforto desaparece pela adaptação dos tecidos⁽⁴⁾. Além da ulceração persistente, a hiperqueratose é uma das formas de adaptação da mucosa aos estímulos físicos do aparelho ortodôntico, e esta não é observada clinicamente⁽⁵⁾.

Diversas técnicas têm sido usadas para avaliação destas lesões, tais como a biópsia excisional, a análise da saliva e a citologia esfoliativa^(6,7). A partir da década de 90, a citologia esfoliativa em base líquida foi desenvolvida^(8,9) apresentando como vantagens a redução de contaminação por sangue, células inflamatórias e muco, obtendo-se assim um fundo claro e maior sensibilidade que proporciona melhor qualidade do esfregaço⁽⁸⁾.

A execução do tratamento ortodôntico deve produzir o menor dano aos tecidos envolvidos. Considerando-se que há um número reduzido de pesquisas sobre a ocorrência de alterações na mucosa bucal decorrentes da fricção com o aparelho ortodôntico. Este estudo tem como objetivo realizar a análise citológica do comportamento das células epiteliais da mucosa bucal adjacente aos *brackets* metálicos, fios de aço inoxidável e ligaduras metálicas ou elásticas.

MÉTODOS

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob parecer nº 1389/08.

Amostra

A amostra foi composta de 20 indivíduos, entre 14 e 36 anos, com idade média de 22,7 anos, 10 do gênero feminino e 10 do gênero masculino. Foram selecionados indivíduos que procuraram tratamento na Clínica de Odontologia da PUCPR, utilizando-se os seguintes critérios de inclusão ausência de: história de tabagismo e etilismo, doenças debilitantes, uso de colutórios bucais, mordida cruzada posterior, tratamento com antibióticos ou esteróides no período do estudo, prótese dentária total ou parcial removível ou qualquer tipo de lesão na mucosa bucal. Depois de explicados os objetivos da pesquisa, cada indivíduo assinou um termo de consentimento livre e esclarecido.

Instalação dos Acessórios

Os dentes escolhidos para a fixação dos *brackets* (Generus® *Straight Wire* “Roth” – GAC, Bohemia, NY, USA) foram os primeiros e segundos pré-molares superiores direitos e esquerdos em cada indivíduo.

Para que os *brackets* ficassem posicionados em um mesmo eixo horizontal, foi utilizado um guia de fio de aço inoxidável redondo com espessura de 0,020 polegada (Shiny Bright®, TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) inserido nos *slots* dos *brackets* antes da polimerização da resina (Transbond XT®, 3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, CA, USA).

Após a polimerização, outro segmento de fio de aço inoxidável com espessura de 0,020 polegada (Shiny Bright[®], TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) foi inserido nos *slots* dos *brackets*, com dobras nas extremidades mesial e distal para evitar o deslizamento ou rotação do mesmo, impedindo fricção adicional na mucosa adjacente.

Estes fios foram fixados com ligaduras metálicas com espessura de 0,012 polegada (Dentalloy[®], TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) e elásticas incolores (Mini Stix Non-Coated[®], TP Orthodontics, La Porte, IN, USA) sendo, duas ligaduras do mesmo tipo em cada lado, alternando-se os lados aleatoriamente de forma que metade dos indivíduos apresentassem ligaduras metálicas de um lado e elásticas do outro e o contrário ocorresse na outra metade (Ilustração 1 e 2).

Citologia em base líquida

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

Os pacientes foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água durante 20 segundos para remover possíveis restos alimentares. A coleta de células da mucosa foi realizada com o kit *Universal Collection Medium (UCM)* do sistema DNA-CITOLIQ. Esta foi obtida por meio da aplicação da escova até que as cerdas maiores tocassem a região escolhida, de forma suave e em movimentos giratórios (cinco voltas) no sentido horário.

Uma cartela contendo 12 lâminas histológicas foi adaptada numa prensa metálica juntamente com um filtro especial contendo uma membrana de policarbonato. Em seguida, uma alíquota de 200µl da amostra foi transferida do interior do frasco para

a membrana de policarbonato com o auxílio de uma pipeta e a prensa metálica foi fechada por 10 segundos havendo, no final, 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 06 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 com a técnica de Papanicolaou.

Análise Citomorfométrica

Por meio de microscopia de luz, foi realizada a análise dos esfregaços, sendo utilizado um microscópio binocular, modelo Olympus BX50, adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65. Foram examinadas 50 células de cada lâmina aleatoriamente⁽¹⁰⁾, por um examinador devidamente calibrado. Áreas em que as células se apresentavam dobradas e/ou aglomeradas ou sobrepostas foram evitadas. A captura da imagem dos campos citológicos foi feita em ampliação de 400 vezes por uma câmera Sony CCD Íris Color Vídeo, modelo DXC-107A associada ao programa *Image Pro Plus*, versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000. A avaliação das imagens das células foi feita por meio deste mesmo programa, no qual, após serem salvas em computador, foram delimitados o núcleo e o citoplasma de cada célula, usando-se o cursor digitador. Com o programa no modo “Medida”, as áreas do núcleo (AN) e do citoplasma (AC) foram obtidas em micrômetros quadrados. Estes valores foram tabulados e, então, 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 reprodutibilidade foi confirmada pela

Fórmula de Dahlberg, que gerou um Coeficiente de Confiabilidade >90 , indicando inexistência de erro casual.

Análise Citomorfológica

Para esta análise, o mesmo microscópio binocular foi utilizado, porém adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 10X/0,25, 20X/0,40 e 40X/0,65. As lâminas foram percorridas em toda a extensão dos esfregaços, classificando-os, assim, de acordo com o predomínio das células presentes segundo Sugerman e Savage⁽¹²⁾.

Também foi realizada a análise qualitativa dos esfregaços, visando identificar critérios citológicos de malignidade, classificados de acordo com 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 realizados com o programa Statistical Package for the Social Science 13.0 for Windows. Foi realizado 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 o 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 dois critérios com medidas repetidas visando comparar se existia diferença entre área do núcleo, área do citoplasma e razão área do núcleo/área do citoplasma segundo grupos e tempo, uma vez que cada paciente era seu próprio controle. Quando ANOVA indicou existir diferença significativa 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.

RESULTADOS

Foi avaliado um total de 6000 células em relação à citomorfometria. Inicialmente, as variáveis AN, AC e AN/AC foram avaliadas quanto ao gênero. No gênero masculino foi encontrada menor média na AC e maior média na AN/AC em todos os tempos observados quando comparadas com as do gênero feminino para a ligadura metálica. O gênero masculino com ligadura elástica apresentou maior média na AC do que no feminino com a mesma ligadura, do T0 ao T2. Entretanto, apesar destas diferenças, para todas as variáveis (AN, AC e AN/AC), em todos os tempos não houve diferença estatisticamente significativa segundo gênero.

A tabela 1 expressa a média, a mediana e o desvio padrão de todas as variáveis para os dois tipos de ligaduras nos diferentes tempos. Nas variáveis AN e AN/AC, a ligadura metálica apresentou maior média que a ligadura elástica nos T0 e T2. No T1 estas variáveis apresentaram maior média na ligadura elástica quando comparada com a metálica, com ambas diferenças não estatisticamente significantes. Ao relacionar as duas ligaduras, no mesmo período de observação, não foi verificada diferença estatisticamente significativa.

Houve diminuição na AN e aumento na AC para os grupos ligadura elástica e metálica no T1, com tendência ao retorno para o valor inicial no T2 (tabela 2). Para as variáveis AN e AC houve diferença estatisticamente significativa quando comparados intra-grupos em diferentes períodos de observação ($p < 0,05$), exceto na ligadura elástica ao correlacionar o T0 com o T2. Para a variável AN/AC não houve diferença estatisticamente significativa (tabela 2).

O teste da Diferença entre duas proporções, mostrou diferença em relação à camada de células superficiais e sub-superficiais, sendo observado aumento da camada superficial 30 dias após a instalação dos acessórios (T1) com subsequente diminuição (T2) ($p > 0,05$). No entanto, quando comparados T0 e T1, somente na ligadura metálica, foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A quantidade de esfregaços está descrita na tabela 3.

Pela classificação de Papanicolaou, foi possível observar que os esfregaços apresentaram-se normais (Classe I 90,83%) e com alterações de natureza inflamatória (Classe II 9,16%).

DISCUSSÃO

A biópsia excisional tem sido o único método aceitável e confiável para o diagnóstico definitivo de diversas doenças que acometem a mucosa bucal⁽⁷⁾. Entretanto, uma alternativa para o exame de lesões bucais suspeitas é a citologia esfoliativa. Esta é baseada principalmente no método de coloração de Papanicolaou e aceita como uma metodologia confiável⁽¹⁴⁾.

Em relação à diferenciação celular entre os gêneros masculino e feminino, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes tanto na área do núcleo quanto na área do citoplasma concordando com Cowpe et al⁽¹⁰⁾, que também não

encontraram diferenças entre os gêneros, apesar de utilizarem a citologia esfoliativa convencional, que pode causar maior aglutinamento celular.

Ao se comparar os efeitos na área do núcleo, área do citoplasma e na relação área do núcleo/área do citoplasma das células epiteliais em relação aos diferentes tipos de ligadura, os resultados revelaram que a área do núcleo diminui enquanto que a área do citoplasma aumenta significativamente 30 dias depois da instalação dos acessórios. Esta alteração nas células epiteliais ocorre por um processo adaptativo. Isto pode ser explicado pelo fato de a mucosa bucal que normalmente apresenta um predomínio de células sub-superficiais⁽¹⁵⁾, após a ação danosa de um estímulo externo sofrer um aumento de células na camada superficial (hiperplasia associada à hiperparaceratose reacional).

Este estímulo, que pode ser térmico, químico ou físico, proporciona alteração no número das camadas do epitélio⁽¹⁶⁾, pois a irritação crônica produz aumento no número de células da camada superficial devido à aceleração do processo de ceratinização normal sofrido pela mucosa⁽¹⁵⁾, como ocorreu no presente estudo. Ramaesh et al⁽¹⁷⁾, também verificaram tais alterações, embora estes autores não tenham analisado um trauma físico, mas sim o tabaco, agente irritante químico e físico, que também é capaz de produzir hiperparaceratose funcional.

Trinta dias após a colagem dos acessórios, houve aumento da área do citoplasma, que ocorre para elevar o metabolismo celular⁽¹⁸⁾. Este processo também foi observado por Shabana et al⁽¹⁹⁾ que verificaram aumento do tamanho das células de lesões traumáticas em relação às células normais. Após a remoção do estímulo é esperado que o tecido epitelial recupere a sua espessura normal⁽¹⁸⁾. Este processo também foi notado neste estudo, visto que 30 dias após a remoção dos acessórios

ortodônticos (T2), as variáveis AN, AC e AN/AC tenderam a retornar aos valores iniciais (T0).

O período de 30 dias de uso do aparelho ortodôntico foi baseado no período de renovação total do epitélio da mucosa jugal que é de 25 dias. Esta renovação epitelial ocorre em condições fisiológicas ou quando influenciado por estímulos externos⁽¹⁸⁾. Este é o período necessário para que as células epiteliais jovens consigam, por meio da diferenciação, alcançar as camadas mais superficiais e, depois esfoliarem⁽²⁰⁾. Além disso, o desconforto inicial ocasionado com a instalação dos acessórios desaparece em quatro semanas⁽⁴⁾.

Como a mucosa bucal apresenta epitélio estratificado não-queratinizado, as lâminas obtidas no T0 não exibiram predomínio de nenhum tipo celular, ou seja, tanto as células superficiais quanto as células das camadas sub-superficiais estavam igualmente presentes. Após os trinta dias em contato com os acessórios ortodônticos (T1), notou-se que houve aumento no número de esfregaços superficiais e depois de trinta dias da retirada dos acessórios (T2), foi observado que os esfregaços tenderam a retornar às características do T0. Normalmente, o tecido epitelial que é composto por células lábeis, se encontra num “estado de equilíbrio” (homeostase), e possui a propriedade de adaptação funcional, que o torna capaz de se adaptar a diversos estímulos⁽²⁰⁾.

De acordo com Berstein e Miller⁽²¹⁾, as células normais exibem morfolologicamente citoplasma abundante, núcleo pequeno, centralizado e único. Por outro lado, nas células da mucosa bucal que apresentam algum grau de displasia ocorre uma mudança morfológica. Ramaesh et al⁽¹⁵⁾ utilizando análise citomorfométrica demonstraram que ocorre diminuição gradual no diâmetro do citoplasma de células normais, de lesões displásicas e de carcinomas espinocelulares. Já o núcleo se comporta

de forma diferente, pois há aumento gradual do seu diâmetro. Não se observou mudanças nas características morfológicas nas células dos esfregaços obtidos da mucosa em contato com os acessórios ortodônticos, sendo 90,83% dos esfregaços classificados como classe I (normal) e 9,16% classe II (inflamatórios) de Papanicolaou concordando com Pereira et al⁽²²⁾. Estes resultados eram esperados, visto que para que ocorressem alterações displásicas ou até mesmo neoplásicas seria necessário um tempo maior de agressão e também modificações no material genético.

Bandas ortodônticas, *brackets* e fios metálicos, são universalmente compostos por uma liga de aço inoxidável austenítico contendo aproximadamente 18% de Cromo e 8% de Níquel⁽²³⁾. Estes íons podem afetar o sistema imunológico, causar dermatites de contato, asma e outros efeitos adversos tais como citotoxicidade celular e são agentes genotóxicos suspeitos⁽²⁴⁾. A liberação de íons na boca por ligas metálicas e a reação de citotoxicidade por eles induzidos em células humanas foram avaliadas em experimentos *in vitro*^(23,25-27). Estes estudos demonstraram que ocorre liberação iônica em quantidades inferiores à ingestão diária recomendada^(23,25), desta forma, não possuem o potencial para induzir alterações citológicas^(26,27). Sendo assim, as alterações celulares observadas no presente trabalho provavelmente não foram ocasionadas por reações de citotoxicidade, mas sim, pela fricção do conjunto *brackets*/fios/ligaduras com a mucosa bucal. Entretanto, os estudos *in vitro* são incapazes de simular uma condição clínica ideal⁽²⁷⁾.

Diante dos resultados obtidos, os *brackets* ortodônticos e fios associados às ligaduras metálicas e elásticas tiveram o potencial de induzir uma resposta adaptativa. A fricção do conjunto na mucosa bucal provavelmente foi capaz de provocar hiperplasia e leve hiperparaceratose epitelial em resposta ao tipo de injúria estabelecida. Devido à existência de poucos estudos relacionando tempo de injúria e diferenciação celular,

sugere-se que pesquisas sejam realizadas aumentando o tempo e o número de acessórios ortodônticos posicionados nos dentes.

Considerando-se todos os benefícios estéticos, funcionais e de saúde bucal que o tratamento ortodôntico proporciona, e que a resposta adaptativa da mucosa frente à injúria causada pelos acessórios é reversível, os resultados do tratamento ortodôntico compensam o desconforto que os pacientes são submetidos.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os *brackets* metálicos, fios de aço inoxidável e ligaduras podem induzir alterações citomorfométricas e citomorfológicas nas células da mucosa bucal, sugerindo uma resposta adaptativa frente ao estímulo físico independente do tipo de ligadura utilizada, a qual regride após a retirada do estímulo.

REFERÊNCIAS

- 1 Faber J. Tying twin brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000;118:101-6.
- 2 Kluemper GT, Hiser DG, Rayens MK, Jay MJ. Efficacy of a wax containing benzocaine in the relief of oral mucosal pain caused by orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002;122:359-65.
- 3 Kvam E, Bondevik O, Gjerdet NR. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989;17:154-7.
- 4 Caniklioglu C, Öztürk Y. Patient discomfort: a comparison between lingual and labial fixed appliances. *Angle Orthod* 2005;75:86-91.
- 5 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.
- 6 Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The cytobrush plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:101-4.
- 7 Maraki D, Yalcinkaya S, Pomjanski N, Megahed M, Boecking A, Becker J. Cytologic and DNA-cytometric examination of oral lesions in lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2006;35:227-32.
- 8 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.
- 9 Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006;23:5-11.

- 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 Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2004;33:398-404.
- 15 Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27:83-6.
- 16 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.
- 17 Ramaesh T, Mendis BRRN, Ratnatunga N, Thattil RO. The effect of tobacco smoking and betel chewing with tobacco on the buccal mucosa: a cytomorphometric analysis *J Oral Pathol Med* 1999;28:385-8.
- 18 Ten Cate AR. *Oral histology: development, structure and function*. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book: 1998.
- 19 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.
- 20 Mjör IA, Fejerskov O. *Human Oral Embryology and Histology*, Copenhagen: Munksgaard: 1986.

- 21 Bernstein ML, Miller RL. Oral exfoliative cytology. JADA 1978;96:625-9.
- 22 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.
- 23 Barret RD, Bishara SE, Quinn JK. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. Am J Orthod Dentofac Orthop 1993;103:8-14.
- 24 Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. Am J Orthod Dentofac Orthop 2003;124:687-94.
- 25 Staffolani N, Damiani F, Lilli C, Guerra M, Staffolani NJ, Belcastro S, Locci P. Ion release from orthodontic appliances. J Dent 1999;27:449-54.
- 26 Mockers O, Deroze JC. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. Dent Mater 2002;18:311-7.
- 27 Eliades T, Bourauel C. Intraoral aging of orthodontic materials: the picture we miss and its clinical relevance. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2005;127:403-12.

TABELAS

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

Variáveis	Tempo	Metálica (n=20)			Elástica (n=20)			Valor p
		Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão	
AN	T0	66,853	66,519	7,697	64,073	63,196	5,805	0,183480
	T1	52,208	51,005	7,333	53,321	51,989	4,544	0,934333
	T2	61,594	60,158	6,765	59,637	60,152	4,173	0,563269
AC	T0	2286,349	2325,619	227,107	2338,914	2317,409	188,439	0,787827
	T1	2654,724	2687,452	205,881	2608,837	2659,373	193,384	0,868038
	T2	2410,223	2432,456	196,529	2439,367	2449,534	181,960	0,979464
AN/AC	T0	0,030	0,030	0,003	0,054	0,027	0,081	0,285673
	T1	0,028	0,021	0,036	0,021	0,020	0,002	0,986988
	T2	0,026	0,027	0,002	0,026	0,025	0,003	1,000000

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*	0,000441*	0,000122*	0,000122*	0,004011*	0,000129*
AC	0,000122*	0,034358*	0,000122*	0,000122*	0,142981	0,001028*
AN/AC	0,999991	0,999498	0,999971	0,050000	0,128840	0,998774

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** - Quantidade de esfregaços segundo predomínio celular, tempo e tipo de ligadura

Tempo	Superficial	Sub-superficial	Espinhosa	Basal
T0 Metálica	11	9	0	0
T0 Elástica	12	8	0	0
T1 Metálica	17	3	0	0
T1 Elástica	16	4	0	0
T2 Metálica	14	6	0	0
T2 Elástica	14	6	0	0
Total	84	36	0	0

T: tempo.

ILUSTRAÇÕES



Ilustração 1. *Brackets* e fio unidos por ligaduras metálicas.



Ilustração 2. *Brackets* e fio unidos por ligaduras elásticas.

2 ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE**CYTOLOGIC ANALYSIS OF THE ORAL MUCOSA ADJACENT TO
BRACKETS AND METAL OR ELASTIC LIGATURES****Raul Magnoler Sampaio Mei**

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

Antônio Adilson Soares de Lima

Sênior 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, DDS, MsD, PhD
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Mestrado em Odontologia – Ortodontia
Rua Imaculada Conceição, 1155
Cep: 80215-901 – Curitiba – Paraná – Brasil
Phone: 55 41 3271-1637
Fax number: 55 41 3271-1405
E-mail: elisa.camargo@pucpr.br

ABSTRACT

Objectives: Evaluate the possible cytological alterations of epithelial cells adjacent to orthodontic accessories by liquid-based exfoliative cytology. **Study Design:** In 20 individuals, brackets were bonded to the maxillary premolars, and wires were tied with metal or elastic ligatures. The cytomorphometric and cytomorphology alterations were evaluated in 3 moments: before the accessories were placed (M0), 30 days after placement (M1) and 30 days after removal of the accessories (M2). **Results:** ANOVA indicated a reduction in nuclear area and increase in cytoplasmic area was verified in both types of ligatures at M1 ($p>0,05$) and a trend towards returning to initial values at M2 ($p<0.05$). At M0 the quantity of superficial or sub-superficial cells was similar, whereas at M1 and M2, superficial cells predominated. In all moments only normal and inflammatory cells were observed. **Conclusions:** Orthodontic appliances induced functional adaptations with greater keratinization degree of oral mucosa, and tended to return to normal after the stimulus was removed.

INTRODUCTION

During orthodontic treatment, accessories such as brackets, arches and ligatures are placed. Ligatures can be made of stainless steel or elastic and allow the fixation of the arch to the brackets⁽¹⁾. The friction of these accessories against the oral mucosa can cause irritation and inflammation, with consequent discomfort and pain⁽²⁾. Ulcerations are also common in this type of treatment, and patients report that they cause the greatest discomfort⁽³⁾.

The pain resulting from friction of these accessories against the mucosa is frequently the reason why patients abandon the treatment⁽²⁾, however, after four weeks this discomfort disappears due to adaptation of the tissues⁽⁴⁾. In addition to persistent ulceration, hyperkeratosis is one of the forms of adaptation of the mucosa to the physical stimuli of the orthodontic appliance, and this is not clinically observed⁽⁵⁾.

Various techniques have been used to evaluate these lesions, such as excisional biopsy, saliva and exfoliative cytology analyses^(6,7). As from the 1990s, exfoliative cytology in a liquid base was developed^(8,9) with the advantages of a reduction in contamination by blood, inflammatory cells and mucus, thus obtaining a clear background and greater sensitivity, which provide a smear of better quality⁽⁸⁾.

Considering that orthodontic treatment should produce the least amount of damage to the tissues involved, and that there are a small number of researches about the occurrence of alterations in the oral mucosa resulting from friction with the orthodontic appliance, the aim of this study was to perform cytological analysis of the behavior of the epithelial cells of the oral mucosa adjacent to metal brackets, stainless steel wires and metal or elastic ligatures.

METHODS

The research project was approved by the Ethics in Research Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Brazil.

Sample

The sample was composed of 20 individuals between the ages of 14 and 36 years, with a mean age of 22.7 years, 10 females and 10 males. Individuals that sought treatment at the Dental Clinic of PUCPR were selected. 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. After having the objectives of the research explained to them, each individual signed a free and informed term of consent.

Placement of the Accessories

The teeth chosen for fixation of the brackets (GenerusTM Straight Wire “Roth”–GAC, Bohemia, NY) were the maxillary right and left first and second premolars of each individual.

So that the brackets would remain positioned on the same horizontal axis, a guide made by a round, stainless steel wire 0,020 inches thick (Shiny BrightTM, TP Orthodontics, La Porte, IN) was used, and inserted in the slots of the brackets before the resin (Transbond XTTM, 3M Unitek Orthodontic Product, Monrovia, CA) was polymerized.

After polymerization, another segment of stainless steel wire, 0,20 inches thick (Shiny BrightTM, TP Orthodontics, La Porte, IN) was inserted in the slots of the brackets, with bends at the mesial and distal extremities to prevent them from sliding or

rotating, making it improbable for additional friction to occur against the adjacent mucosa.

These wires were fixed with stainless steel 0.012 inches thick (Dentalloy™, TP Orthodontics, La Porte, IN) and incolor elastic ligatures (Mini Stix Non-Coated™, TP Orthodontics, La Porte, IN), with two ligatures of the same type on each side, randomly alternating the sides so that half the individuals would have metal ligatures on the one side and elastic on the other, and the opposite would occur in the other half of the individuals (Illustration 1 and 2).

Liquid-based Cytology

Material was collected at three moments: before the accessories were placed (M0), 30 days after placement, before they were removed (M1) and 30 days after removal (M2). M0 was used as control.

Patients were instructed to perform a mouth wash with water for 20 seconds, to remove possible food remains. The cells from the oral mucosa were collected with the *Universal Collection Medium* (UCM) kit of the DNA-CITOLIQ system (Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil). This was obtained by application of the brush until the longest bristles touched the chosen region, in smooth, turning movements (five turns), in the clockwise direction.

A card containing 12 histological slides (Lamigene™, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) was positioned in a metal press (Prepgene™, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) together with a special filter containing a polycarbonate membrane (Filtrogene™, Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brazil). After this, an aliquot of 200µl of the sample was transferred from inside the flask to the polycarbonate membrane with

the aid of a pipette, and the metal press was closed for 10 seconds, at the end of which there was the 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 patient.

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

Cytomorphometric Analysis

The smears were analyzed by light microscopy, using a binocular microscope, model Olympus BX50 (OlympusTM, Japan), fitted with a WH 10X-H/22 eyepiece and PLAN 40X/0.65 objectives (OlympusTM, Japan). Fifty randomly cells of each slide were examined⁽¹⁰⁾ by one duly calibrated examiner. The areas in which cells were folded and/or agglomerated, or superimposed were avoided. 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.) associated with *Image Pro Plus* program, version 4.5.029 for Windows 98/NR/2000 (Media Cybernetics Inc.). After being saved on the computer, the images of the cells were evaluated with this same program, in which the nucleus and cytoplasm of each cell was delimited by using the digitizer cursor. With the software in the “Measurement” mode, the nuclear area (NA) and cytoplasmic area (CA) were obtained in square micrometers. The values were tabulated, and after this the nucleus-to-cytoplasm 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.

Cytomorphologic Analysis

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

Qualitative analysis was also made of the smears, with a view to identifying the cytological criteria of malignancy, classified in accordance with Papanicolaou⁽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, but not conclusive for malignancy; 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 program (SPSS, Inc., Chicago, IL). The Kolmogorov-Smirnov test was performed to verify whether the samples for the different groups (metal and elastic) at the different moments (M0, M1 and M2) presented normality; and the Levene homogeneity test, to evaluate whether the data presented homogeneity of variances.

As the majority of the variables presented normality and homogeneity, two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was applied, to compare whether there was difference between the nuclear area, cytoplasmic area, and nucleus-

to-cytoplasm ratio according the groups and time, since each patient was his/her own control. When ANOVA indicated that there was significant difference between the groups, the Tukey HSD multiple comparisons test was used to detect which of the groups differed among them. To analyze the predominance of present cells, according to Sugerman and Savage, the Test of difference between two proportions was performed.

RESULTS

A total of 6000 cells were evaluated with regard to cytomorphometry. Initially, the variables NA, CA and NA/CA were evaluated as regards gender. In the male gender, the lowest mean was found in CA and the highest mean in NA/CA at all moments observed for metal ligature, when compared with the values of the female gender. For the elastic ligature, the male gender presented a higher mean in CA than the female gender with the same ligature, from M0 to M2. Nevertheless, in spite of these differences, for all the variables (NA, CA and NA/CA), at all moments, there was no statistically significant difference according to gender.

Table 1 expresses the mean, median and standard deviation of all the variables for the two types of ligatures at the different moments. In the variables NA and NA/CA, the metal ligature presented a higher mean than the elastic ligature at M0 and M2. At M1 these variables presented the highest mean in the elastic when compared with the metal ligature, with both difference not statistically significant. When relating the two ligatures at the same time of observation, no statistically significant difference was verified.

There was a reduction in NA and increase in CA for the metal and elastic ligatures in M1, with a trend towards returning to the initial value at M2 (Table 2). For the NA and CA variables, there was statistically significant difference when intra-

groups were compared at different observation moments ($P>0.05$), except in the elastic ligature when correlating M0 with M2. For the variable NA/CA there was not statistically significant difference (Table 2).

The Test of difference between two proportions, showed difference as regards the layer of superficial and sub-superficial cells, with an increase being observed in the superficial layer 30 days after the accessories were placed (M1) with a subsequent reduction (M2) ($P>0.05$). Nevertheless, when M0 and M1 were compared, statistically significant difference ($P<0.05$) was verified only in the metal ligature. The quantity of smears is described in Table 3.

By the Papanicolaou classification, it was possible to observe that the smears presented normal alterations (Class I 90,83%) and inflammatory alterations (Class II 9,16%).

DISCUSSION

Excisional biopsy has been the only acceptable and reliable method for definitive diagnosis of various diseases that affect the oral mucosa⁽⁷⁾. However, exfoliative cytology is an alternative to exam for suspect oral lesions. This is mainly based on the method of Papanicolaou staining and accepted as a reliable methodology⁽¹⁴⁾.

With regard to cellular differentiation between the male and female genders, the differences observed were not statistically significant, both in the nuclear area and cytoplasmic area, being in agreement with Cowpe et al⁽¹⁰⁾, who also found no differences between the genders, in spite of using conventional exfoliative cytology, which can cause greater cellular agglutination.

When comparing the effects on the NA, CA and NA/CA of the epithelial cells with regard to the different types of ligatures, the results showed that the nucleus area diminished while the cytoplasm area increased significantly 30 days after the accessories were placed. This alteration in the epithelial cells occurs due to an adaptive process. This can be explained by the fact that the oral mucosa normally presents a sub-superficial cell predominance⁽¹⁵⁾, and after the influence of an external stimulus it undergoes an increase in superficial layer cells (hyperplasia associated with reactional hyperparakeratosis).

This stimulus, which can be thermal, chemical or physical, causes alteration in the number of layers of the epithelium⁽¹⁶⁾, because chronic irritation produces an increase in the number of the superficial layer cells, due to acceleration of the normal keratinization process the mucosa undergoes⁽¹⁵⁾, as occurred in the present study. Ramaesh et al⁽¹⁷⁾, also verified these alterations, although these authors did not analyze a physical trauma, but tobacco, a chemical and physical irritant agent, which is also capable of producing functional hyperparakeratosis.

Thirty days after the accessories were bonded, there was an increase in the cytoplasmic area, which occurs to raise cellular metabolism⁽¹⁸⁾. This process was also observed by Shabana et al⁽¹⁹⁾ who verified an increase in the size of traumatic lesion cells in comparison with normal cells. After removal of the stimulus it is expected that the epithelial tissue recovers its normal thickness⁽¹⁸⁾. This process was also noted in this study, since 30 days after removal of the orthodontic accessories (M2), the variables NA, CA and NA/CA tends to return to the initial values (M0).

The period of 30 days of orthodontic appliance use was based on the period of complete renewal of the buccal mucosa epithelium, which is 25 days. This epithelial renewal occurs under physiological conditions, or when influenced by external

stimuli⁽¹⁸⁾. This is the period the young epithelial cells require to reach the more superficial layers, by means of differentiation, and then exfoliate⁽²⁰⁾. In addition to this, the initial discomfort caused by the placement of the accessories disappears within four weeks⁽⁴⁾.

As the oral mucosa presents a non-keratinized, stratified epithelium, the slides obtained at M0 did not show predominance of any cell type; that is, the cells of both the superficial and sub-superficial layers were present equally. After 30 days in contact with the orthodontic accessories (M1), an increase in the number of superficial smears was noted, and thirty days after the removal of the accessories (M2), it was observed that the smears tended to return to the characteristics of M0. Normally, the epithelial tissue is composed of labile cells, is in a “state of equilibrium” (homeostasis), and has the property of functional adaptation, which makes it capable of adapting to various stimuli⁽²⁰⁾.

According to Bernstein and Miller⁽²¹⁾, normal cells morphologically exhibit abundant cytoplasm, and a small, centralized, single nucleus. On the other hand, in the oral mucosa cells that present some degree of dysplasia, a morphological change takes place. Ramaesh et al⁽¹⁵⁾ using cytomorphometric analysis demonstrated that a gradual decrease in the diameter of the cytoplasm of normal cells, dysplastic lesions and squamous cell carcinomas occurs. Whereas, the nucleus behaves in a different way, as there is a gradual increase in its diameter. No changes were observed in the morphological characteristics in the cells of smears obtained in the mucosa in contact with orthodontic accessories, with 90.83% of the smears being classified as Papanicolaou Class I (normal) and 9.16% Class II (inflammatory), corroborating the findings of Pereira et al⁽²²⁾. These results were expected, because in order for dysplastic

or even neoplastic alterations to occur, a longer time of aggression would be required, as well as modifications in the genetic material.

Orthodontic bands, brackets and metal wires are universally composed of an austenitic stainless steel alloy containing approximately 18% of Chrome and 8% of Nickel⁽²³⁾. These ions can affect the immunological system, cause contact dermatitis, asthma and other adverse effects, such as cellular cytotoxicity, and are suspected genotoxic agents⁽²⁴⁾. The release of ions in mouth by metal alloys and the reaction of cytotoxicity induced by them in human cells were evaluated by *in vitro* experiments^(23,25-27). These studies demonstrated that ionic release occurs in lower quantities than the daily recommended intake ^(23,25), therefore, they have no potential to induce cytological alterations^(26,27). Therefore, the cellular alterations observed in the present study were probably not caused by reactions of cytotoxicity, but by friction of the bracket/wire/ligature sets against the oral mucosa. Nevertheless, *in vitro* studies are incapable of simulating an ideal clinical condition⁽²⁷⁾.

In view of the results obtained, the orthodontic brackets and wires associated with the metal and elastic ligatures had the potential to induce an adaptive response. Friction of the set against the oral mucosa was probably capable of causing hyperplasia and slight epithelial hyperparakeratosis in response to the type of injury established. As there are few studies related to the time of injury and cell differentiation, it is suggested that additional researches should be conducted, increasing the time and number of orthodontic accessories placed on the teeth.

When considering all the esthetic, functional and oral health benefits that orthodontic treatment provides, and that the adaptive response of the mucosa to the injury caused by the accessories is reversible, the results of orthodontic treatment exceed the discomfort to which patients are submitted.

CONCLUSIONS

It was concluded that metal brackets, stainless steel wires and ligatures can induce cytomorphometric and cytomorphologic alterations in the cells of the oral mucosa, suggesting an adaptive response to the physical stimulus, irrespective of the type of ligature used, and the alterations regress after removal of the stimulus.

REFERENCES

- 1 Faber J. Tying twin brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000;118:101-6.
- 2 Kluemper GT, Hiser DG, Rayens MK, Jay MJ. Efficacy of a wax containing benzocaine in the relief of oral mucosal pain caused by orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002;122:359-65.
- 3 Kvam E, Bondevik O, Gjerdet NR. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989;17:154-7.
- 4 Caniklioglu C, Öztürk Y. Patient discomfort: a comparison between lingual and labial fixed appliances. *Angle Orthod* 2004;75:86-91.
- 5 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.
- 6 Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The cytobrush plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:101-4.
- 7 Maraki D, Yalcinkaya S, Pomjanski N, Megahed M, Boecking A, Becker J. Cytologic and DNA-cytometric examination of oral lesions in lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2006;35:227-32.
- 8 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.
- 9 Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006;23:5-11.

- 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 Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2004;33:398-404.
- 15 Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27:83-6.
- 16 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.
- 17 Ramaesh T, Mendis BRRN, Ratnatunga N, Thattil RO. The effect of tobacco smoking and betel chewing with tobacco on the buccal mucosa: a cytomorphometric analysis *J Oral Pathol Med* 1999;28:385-8.
- 18 Ten Cate AR. Oral histology: development, structure and function. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book: 1998.
- 19 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.
- 20 Mjör IA, Fejerskov O. Human Oral Embryology and Histology, Copenhagen: Munksgaard: 1986.

- 21 Bernstein ML, Miller RL. Oral exfoliative cytology. JADA 1978;96:625-9.
- 22 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.
- 23 Barret RD, Bishara SE, Quinn JK. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. Am J Orthod Dentofac Orthop 1993;103:8-14.
- 24 Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. Am J Orthod Dentofac Orthop 2003;124:687-94.
- 25 Staffolani N, Damiani F, Lilli C, Guerra M, Staffolani NJ, Belcastro S, Locci P. Ion release from orthodontic appliances. J Dent 1999;27:449-54.
- 26 Mockers O, Deroze JC. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. Dent Mater 2002;18:311-7.
- 27 Eliades T, Bourauel C. Intraoral aging of orthodontic materials: the picture we miss and its clinical relevance. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2005;127:403-12.

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	66.853	66.519	7.697	64.073	63.196	5.805	0.183480
	M1	52.208	51.005	7.333	53.321	51.989	4.544	0.934333
	M2	61.594	60.158	6.765	59.637	60.152	4.173	0.563269
CA	M0	2286.349	2325.619	227.107	2338.914	2317.409	188.439	0.787827
	M1	2654.724	2687.452	205.881	2608.837	2659.373	193.384	0.868038
	M2	2410.223	2432.456	196.529	2439.367	2449.534	181.960	0.979464
NA/CA	M0	0.030	0.030	0.003	0.054	0.027	0.081	0.285673
	M1	0.028	0.021	0.036	0.021	0.020	0.002	0.986988
	M2	0.026	0.027	0.002	0.026	0.025	0.003	1.000000

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 and NA/CA

Variables	Metal			Elastic		
	M0xM1	M0xM2	M1xM2	M0xM1	M0xM2	M1xM2
NA	0.000122*	0.000441*	0.000122*	0.000122*	0.004011*	0.000129*
CA	0.000122*	0.034358*	0.000122*	0.000122*	0.142981	0.001028*
NA/CA	0.999991	0.999498	0.999971	0.050000	0.128840	0.998774

NA: nuclear area; CA: cytoplasmic area; NA/CA: nucleus-to-cytoplasm area ratio; M: moment

* Values statistically significant when $P < 0.05$ **Tabela 3** – Smears cell predominance according to moment and type of ligature

Moment	Superficial	Sub-superficial	Spinosum	Basale
M0 Metal	11	9	0	0
M0 Elastic	12	8	0	0
M1 Metal	17	3	0	0
M1 Elastic	16	4	0	0
M2 Metal	14	6	0	0
M2 Elastic	14	6	0	0
Total	84	36	0	0

M: moment

ILLUSTRATIONS

Illustration 1. Brackets and wire united by metal ligatures.



Illustration 2. Brackets and wire united by elastic ligatures.

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), com parecer nº 1389/08 (Anexo III, página 58).

Amostra

Os indivíduos que se encaminharam para a Clínica de Odontologia da PUCPR para a realização de tratamento odontológico foram convidados a participar deste estudo. Os objetivos específicos desta pesquisa foram explicados de forma detalhada a cada indivíduo e/ou responsável (se menor), e quando houve concordância de participação na pesquisa, foi assinado um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos IV e V, páginas 60 e 61).

Foram selecionados indivíduos com ausência de história de tabagismo e etilismo, doenças debilitantes, uso de colutórios bucais, tratamento com antibióticos ou esteróides no período do estudo, que não apresentassem prótese total ou parcial removível, ou qualquer tipo de lesão na mucosa bucal. Portanto, a amostra deste estudo foi composta de 20 indivíduos com idade média de 22,7 anos, variando entre 14 e 36 anos, sendo 10 do gênero feminino e 10 do gênero masculino.

Benefícios

Todos os indivíduos que participaram da pesquisa receberam como benefícios instrução de higiene bucal, acessórios para escovação (escova, dentífrico e fio dental), orientações sobre a sua maloclusão, se esta fosse diagnosticada, a importância do tratamento ortodôntico e, existindo interesse, o próprio tratamento ortodôntico corretivo.

Riscos

Como possível risco para o participante da pesquisa, algum dos acessórios poderia descolar da superfície do dente caso ele mastigasse alimentos duros e/ou pegajosos. Neste caso, os acessórios poderiam ferir a mucosa bucal causando desconforto, portanto, o participante foi orientado a procurar o pesquisador, que os removeria. Esta região da mucosa bucal não seria incluída na pesquisa, uma vez que células na área da injúria poderiam sofrer alterações.

Colagem dos *brackets*

Os locais de escolha para a fixação dos *brackets*¹ foram os primeiros e segundos pré-molares superiores, sendo dois *brackets* metálicos do lado direito e dois *brackets* metálicos do lado esquerdo, totalizando quatro brackets em cada indivíduo.

Para a colagem dos *brackets*, foi realizada a profilaxia da superfície vestibular dos dentes com taça de borracha, pedra-pomes e água por 20 segundos, para a remoção da placa bacteriana e película adquirida (figura 1A, página 44).

Após isolar o campo de trabalho com afastador e rolos de algodão para controle da saliva, o ácido fosfórico a 37%² para o condicionamento ácido da superfície foi aplicado sobre a superfície do esmalte por 30 segundos³, seguido de enxágüe abundante com água (figura 1B, página 44). Após os dentes estarem completamente secos (figura 1C, página 44), o adesivo do *kit* do Transbond XT^{®4}, foi aplicado com a ajuda de um *microbrush* e polimerizado segundo a orientação do fabricante (20 segundos).

¹ Generus[®] *Straight Wire*, GAC, Bohemia, NY, USA.

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.

Após a colocação de uma porção do compósito resinoso Transbond XT^{®5} na base do *bracket*, este em seguida foi posicionado com uma pinça clínica na superfície vestibular do dente, e a remoção dos excessos realizada com auxílio de uma sonda exploradora. Para que os *brackets* ficassem posicionados em um mesmo eixo horizontal, foi utilizado um guia de fio de aço inoxidável⁶ redondo com espessura de 0,020 polegada posicionado nos *slots* dos *brackets*. Após os *slots* ficarem em um mesmo eixo horizontal (figura 2A, página 44), a polimerização por meio de luz halógena foi realizada por 40 segundos, sendo 10 segundos em cada face do *bracket* (figura 2B, página 44). O fio guia foi mantido em posição até a completa polimerização.

Após a colagem, foi inserido nos *slots* dos *brackets* um segmento de fio de aço inoxidável⁷ com espessura de 0,020 polegada, passivo, em cada lado. Uma vez que os *slots* de cada conjunto de dois *brackets* estavam alinhados, os segmentos de fio não apresentaram dobras, exceto nas extremidades mesial e distal que foram dobradas uma no sentido palatino e outra no sentido oclusal para evitar o deslizamento do fio e provocar fricção adicional na mucosa bucal adjacente, o que poderia trazer viés aos resultados.

Foram, também, colocadas ligaduras metálicas⁸ com espessura de 0,012 polegada (figura 3A, página 44) e elásticas⁹ (figura 3B, página 44) de forma alternada, duas ligaduras do mesmo tipo em cada lado, envolvendo todas as aletas dos *brackets* com o intuito de fixar esses fios. Em 50% dos indivíduos escolhidos aleatoriamente,

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

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

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

⁸ Dentalloy[®], TP Orthodontics, La Porte, IN, USA.

⁹ Mini Stix Ligature Ties Non-Coated[®], TP Orthodontics, La Porte, IN, USA

foram colocadas ligaduras metálicas do lado direito e elásticas do lado esquerdo e nos demais 50% os lados foram invertidos.

Citologia em base líquida

A coleta das células foi realizada em três tempos: antes da colagem dos *brackets* (T0), trinta dias após a colagem dos *brackets*, antes da remoção dos mesmos (T1), e trinta dias após a remoção dos *brackets* (T2). O grupo T0 foi utilizado como controle.



Figura 1. **A** Profilaxia; **B** Condicionamento ácido; **C** Superfície do esmalte seca e pronta para a colagem

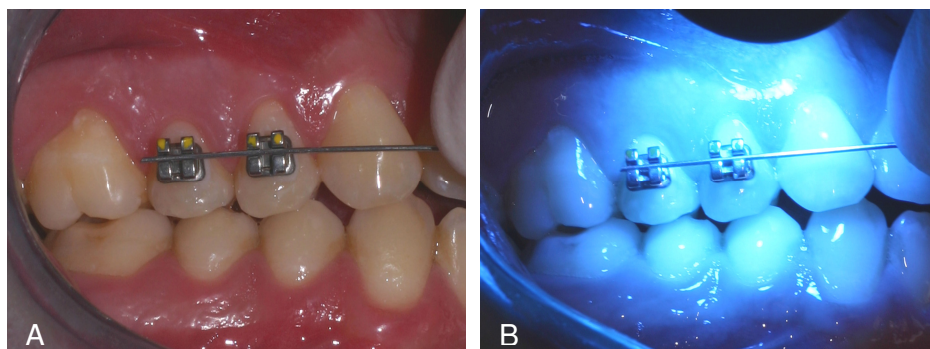


Figura 2. **A** Posicionamento por meio do guia de fio de aço; **B** Polimerização

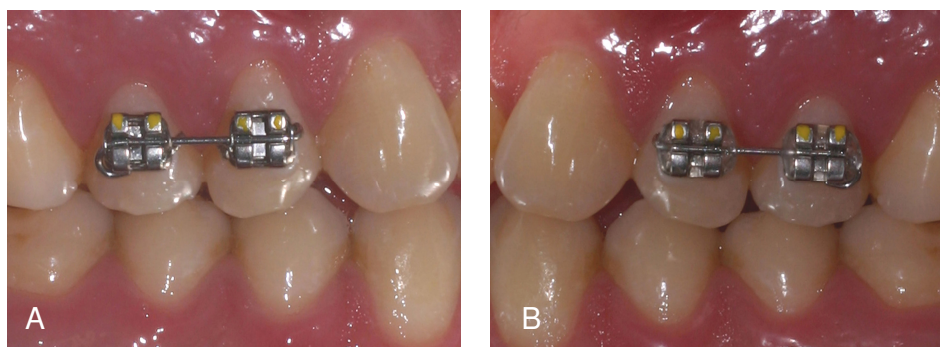


Figura 3. **A** *Brackets* e fio unidos por ligaduras metálicas; **B** *Brackets* e fio unidos por ligaduras elásticas

Os pacientes foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água durante 20 segundos para remover possíveis restos alimentares. A coleta de células foi realizada com um *kit* do sistema DNA-CITOLIQ¹⁰, denominado *Universal Collection Medium* (UCM), cujo registro no Ministério da Saúde está sob o número 10322550015. Este *kit* composto por um frasco, contendo 1ml de UCM e uma escova citológica com cabo longo (figura 4A e B, página 47). A solução UCM é composta por N-Butanol, polietilenoglicol, ácido acético glacial, azida sódica, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e água deionizada.

A coleta das células da mucosa analisada foi obtida por meio da aplicação da escova até que as cerdas maiores tocassem a região escolhida (figura 5, página 47), de forma suave e em movimentos giratórios no sentido horário (cinco voltas). Com o frasco já aberto, foi acondicionada a escova com o material coletado em seu interior sempre verificando se a escova estava totalmente imersa pela solução UCM (figura 6A, página 47). O cabo da escova foi quebrado no local pré-determinado pelo fabricante. O frasco tampado foi agitado por um período mínimo de 30 segundos para permitir que o material colhido (células) ficasse totalmente imerso no meio líquido (figura 6B, página 47).

A escova permaneceu imersa neste líquido com o frasco fechado até o momento em que as células foram transferidas para a superfície de uma lâmina de vidro no processamento histológico.

¹⁰ Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

Processamento Histológico

Uma cartela contendo 12 lâminas histológicas (Lamigene[®])¹¹ foi adaptada numa prensa metálica (Prepgene[®])¹² juntamente com um filtro especial composto por uma membrana de policarbonato (Filtrogene[®])¹³. As lâminas foram previamente identificadas com o nome do indivíduo, lado da cavidade bucal no qual foi realizada a coleta, tipo de ligadura utilizada e tempo da coleta. Para a transferência das células contidas no líquido, inicialmente foram colocados os frascos no *UCM rack* (figura 7A, página 47). A seguir, os frascos foram homogeneizados por meio da colocação sobre um aparelho agitador de tubos do tipo vórtex¹⁴ (figura 7B, página 47) em alta velocidade e por tempo mínimo de 20 segundos.

Em seguida, uma alíquota de 200µl da amostra foi transferida do interior do frasco para a membrana (Filtrogene[®]) com o auxílio de uma pipeta (figura 8A, página 48) e depois a prensa metálica foi fechada por aproximadamente 10 segundos (figura 8B, página 48), havendo, ao final, o *imprint* do material sobre a lâmina (figura 9, página 48).

¹¹ Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

¹² Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

¹³ Digene Brasil LTDA, São Paulo, Brasil.

¹⁴ Vortex, Bionatic[®], 2.500 rpm.

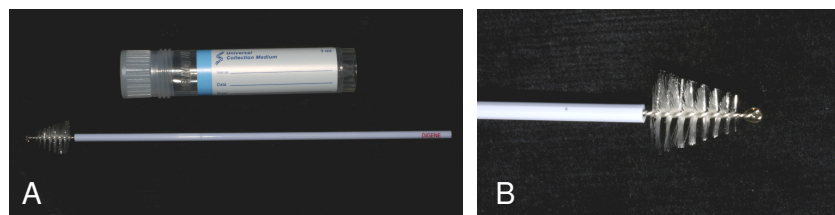


Figura 4. **A** Kit do sistema DNA-CITOLIQ; **B** Escova do kit



Figura 5. Coleta das células da mucosa bucal

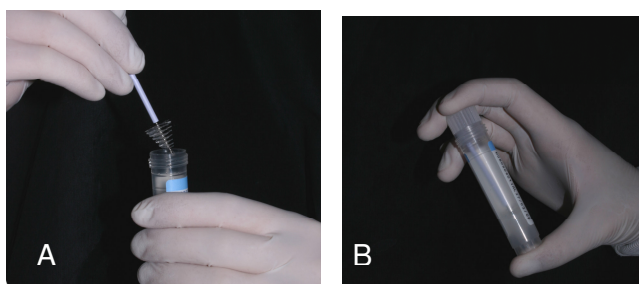


Figura 6. **A** Escova sendo imersa na solução UCM; **B** Agitação do frasco



Figura 7. **A** Frascos posicionados no UCM rack; **B** Homogeneização do frasco no vórtex

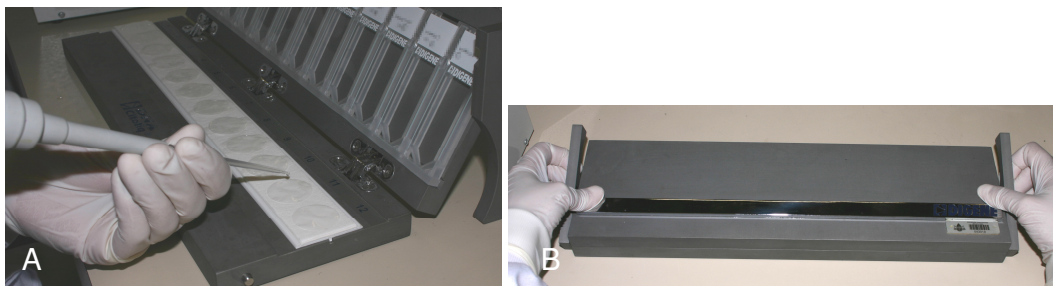


Figura 8. **A** Transferência do meio líquido para a membrana (Filtrogene®) com a pipeta; **B** Prensa para o *imprint* das células

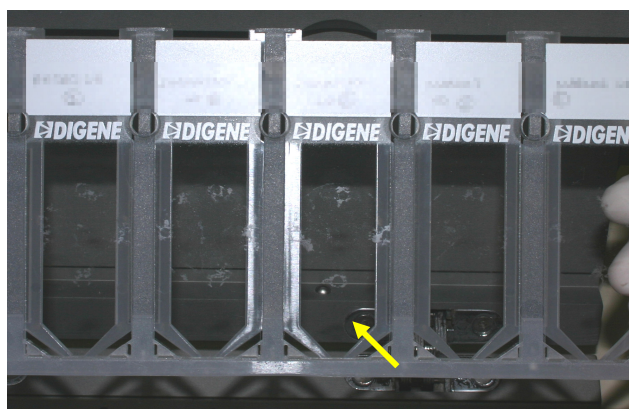


Figura 9. *Imprint* das células sobre as lâminas



Figura 10. **A** Lâminas imersas em álcool absoluto; **B** Coloração de Papanicolaou modificada

As células dispostas sobre as lâminas foram imersas em uma solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos para sua fixação (figura 10A, página 48). A seguir, foi procedida a coloração com a técnica de Papanicolaou (figura 10B, página 48) conforme o Quadro 1 (página 49).

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		

Análise Citomorfométrica

Por meio de microscopia de luz, foi realizada a análise dos esfregaços, utilizando-se um microscópio binocular, modelo Olympus BX50¹⁵, adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65¹⁶ (figura 11, página 51). Previamente à leitura das lâminas, estas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar vies. Foram examinadas 50 células de cada lâmina aleatoriamente¹⁷, por um examinador devidamente calibrado. Áreas em que as células se apresentavam dobradas e/ou

¹⁵ Olympus®, Japão.

¹⁶ Olympus®, Japão

¹⁷ 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.

aglomeradas ou sobrepostas (figura 12A e B, página 51) foram evitadas, visto que dificultariam a delimitação da área celular. A captura da imagem dos campos citológicos foi feita em ampliação de 400 vezes por uma câmera Sony CCD Íris Color Vídeo, modelo DXC-107A¹⁸ associada ao programa *Image Pro Plus*, versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000¹⁹. A avaliação das imagens das células foi feita por meio deste mesmo programa, em que, após serem salvas em computador, foram delimitados o núcleo e o citoplasma de cada célula, usando-se o cursor digitador. Com o programa no modo “Medida”, a área do núcleo (AN) e a área do citoplasma (AC) foram obtidas²⁰ (figura 13, página 52). Estes valores foram tabulados no programa Microsoft Excel e, então, foi obtida a relação núcleo/citoplasma (AN/AC) de cada célula.

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

Análise Citomorfológica

As células epiteliais são diferenciadas pelo método de coloração Papanicolaou, de acordo com o grau de ceratinização dentro das células. A afinidade dos constituintes citoplasmáticos (ex: ceratina) com os corantes (EA-36, Hematoxilina e Orange G) é que determina a coloração de cada célula.

Durante a maturação das células epiteliais ocorre um aumento na quantidade de ceratina, o que torna o citoplasma mais denso. Desta forma, os corantes de maior peso molecular (EA-36) penetram apenas nos citoplasmas menos densos, presentes nas

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.

células imaturas. Já os corantes com menor peso molecular (Hematoxilina e Orange G) têm a capacidade de penetrar no citoplasma denso das células ceratinizadas.

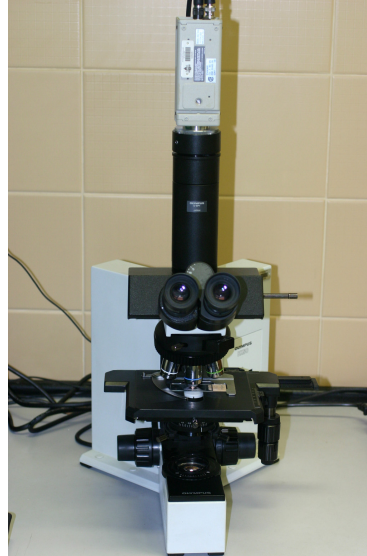


Figura 11. Microscópio binocular, modelo Olympus BX50 acoplado a uma câmera Sony CCD Íris Color Vídeo, modelo DXC-107A

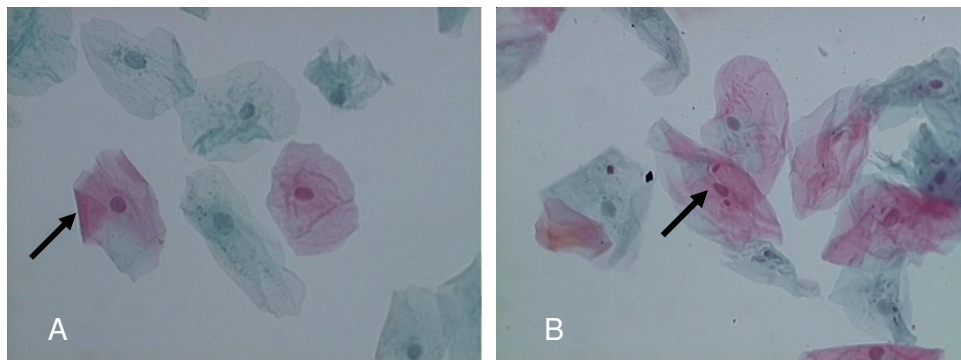


Figura 12. **A** Células dobradas (Papanicolaou 400X); **B** Células aglomeradas (Papanicolaou 400X)

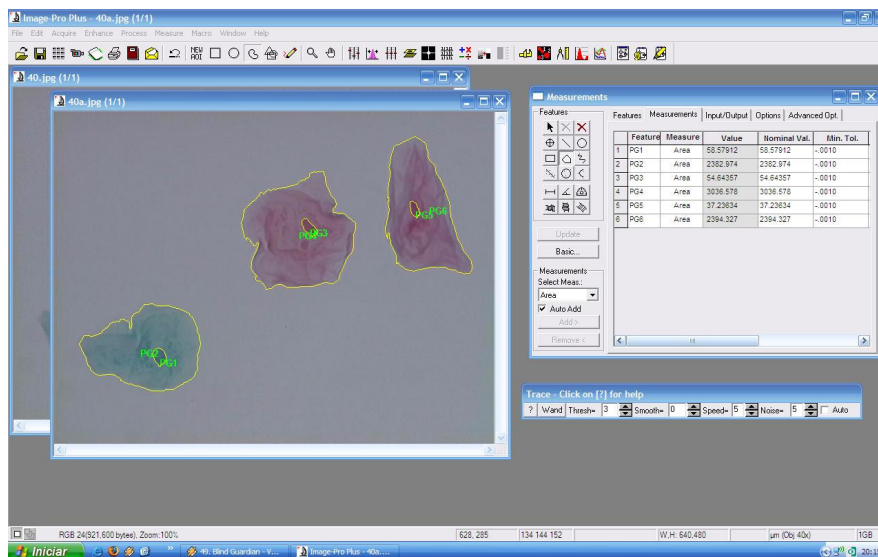


Figura 13. Layout do programa *Image Pro Plus* utilizado na avaliação citomorfométrica

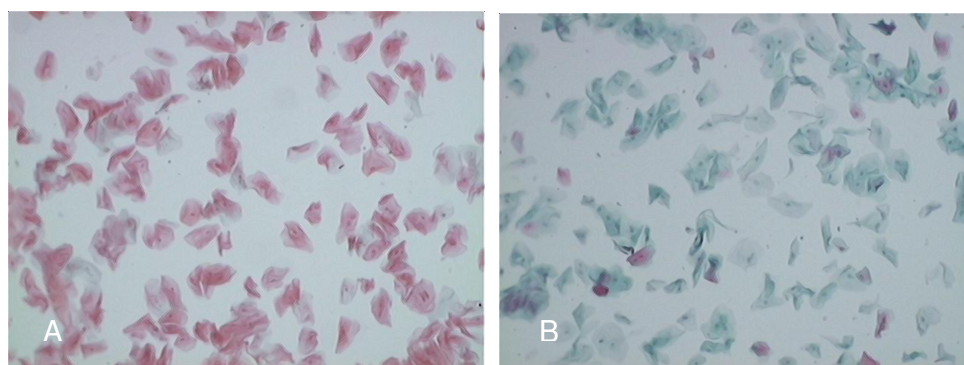


Figura 14. **A** Lâmina com predomínio de células superficiais (Papanicolaou – 100X); **B** Lâmina com predomínio de células sub-superficiais (Papanicolaou – 100X)

Para esta análise, o mesmo microscópio binocular foi utilizado, porém adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 10X/0,25, 20X/0,40 e 40X/0,65. As lâminas foram percorridas em toda a extensão dos esfregaços, classificando-os, assim, de acordo com o predomínio das células presentes (figuras 14A e B, página 52) segundo Sugerman e Savage²¹ em 1996 (Quadro 2, página 53).

²¹ Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. Aust Dent J 1996;41:71-4.

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
Sub-superficial	Estrato granuloso	azul esverdeado/rosa/laranja grânulos de ceratohialina	azul escuro
	Não granular	azul esverdeado/rosa/laranja quadrilátero	azul escuro
Estrato espinhoso		azul esverdeado/rosa/laranja	azul
Estrato basal		ovóide	largo
		verde/azul esverdeado ovóide e pequeno	azul redondo
Fonte: Sugerman e Savage (1996).			

Também foi realizada a análise qualitativa dos esfregaços, visando identificar critérios citológicos de malignidade, classificados de acordo com Papanicolaou²² 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

²² Lange DE, Meyer M, Hahn W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bollous lesions. J Periodontol 1972;43:433-7.

algum sinal de malignidade, porém o citoplasma se mantém normal. Estas alterações 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.

Análise Estatística

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 o teste de homogeneidade de Levene visando avaliar se os dados apresentaram homogeneidade de variâncias.

Como a maioria das variáveis apresentou normalidade e homogeneidade, aplicou-se ANOVA a dois critérios com medidas repetidas visando comparar se existia diferença entre área do núcleo, área do citoplasma e razão núcleo citoplasma segundo amarelo metálico, elástico e tempo, uma vez que cada paciente era seu próprio controle. Quando ANOVA indicou existir diferença significativa 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.

ANEXO II – Tabelas e Gráficos

TABELA I - TESTE DE NORMALIDADE 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	0,1355	20	0,2000	0,1187	20	0,2000
	T1	0,1521	20	0,2000	0,1850	20	0,0712
	T2	0,1838	20	0,0751	0,1619	20	0,1795
AC	T0	0,1189	20	0,2000	0,1153	20	0,2000
	T1	0,1630	20	0,1714	0,1472	20	0,2000
	T2	0,1848	20	0,0717	0,0965	20	0,2000
AN/AC	T0	0,1597	20	0,1950	0,4986	20	0,0000*
	T1	0,4712	20	0,0000*	0,1891	20	0,0590
	T2	0,2284	20	0,0075*	0,1803	20	0,0877

FONTE: Dados da pesquisa

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

NOTA: * Valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.**TABELA II – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS AN, AC, AN/AC SEGUNDO TEMPO E GÊNERO, PUCPR-2008**

		FEMININO (n=10)			MASCULINO (n=10)			VALOR p	
	TEMPO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO		
Metálica	AN	T0	65,872	66,279	8,545	67,834	66,519	7,066	0,583
		T1	52,499	51,620	7,865	51,916	49,850	7,175	0,864
		T2	62,104	63,737	7,866	61,085	58,091	5,845	0,746
	AC	T0	2304,585	2304,408	241,019	2268,114	2354,507	223,735	0,730
		T1	2682,474	2770,710	246,537	2626,974	2672,950	164,293	0,561
		T2	2468,188	2444,076	181,542	2352,258	2406,110	202,767	0,195
	AN/AC	T0	0,029	0,030	0,003	0,031	0,031	0,003	0,326
		T1	0,020	0,020	0,004	0,036	0,021	0,051	0,333
		T2	0,026	0,027	0,003	0,027	0,027	0,002	0,440
Elástica	AN	T0	63,659	62,487	5,754	64,487	65,222	6,136	0,759
		T1	53,680	53,108	4,748	52,962	50,867	4,556	0,734
		T2	60,002	60,727	3,390	59,272	59,523	4,997	0,706
	AC	T0	2319,586	2299,833	204,226	2358,243	2363,367	180,072	0,659
		T1	2591,061	2602,087	176,247	2626,613	2686,907	217,221	0,693
		T2	2424,024	2445,951	160,524	2454,710	2469,064	208,822	0,717
	AN/AC	T0	0,028	0,028	0,003	0,081	0,027	0,111	0,172
		T1	0,021	0,021	0,002	0,021	0,020	0,002	0,431
		T2	0,026	0,025	0,004	0,025	0,023	0,003	0,439

FONTE: Dados da pesquisa

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

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

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

	PROPORÇÃO 1	PROPORÇÃO 2	VALOR p
T0M/T1M	0,55	0,85	0,0453*
T0E/T1E	0,6	0,8	0,1756
T0M/T2M	0,55	0,7	0,3334
T0E/T2E	0,6	0,7	0,5113
T1M/T2M	0,85	0,7	0,2631
T1E/T2E	0,8	0,7	0,4697

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: T: tempo; M: ligaduras metálicas; E: ligaduras elásticas

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

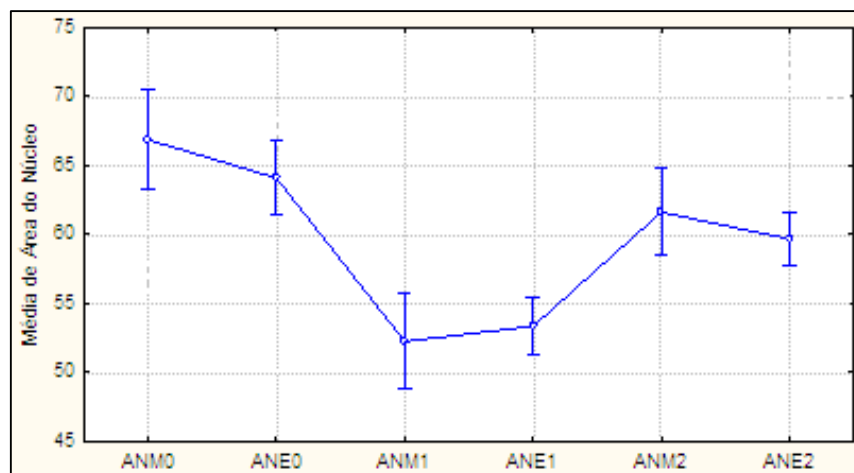
TABELA IV – CLASSIFICAÇÃO DOS ESFREGAÇOS DE ACORDO COM PAPANICOLAOU SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008

	T0M	T0E	T1M	T1E	T2M	T2E
Classe 0	0	0	0	0	0	0
Classe I	19	18	17	18	18	19
Classe II	1	2	3	2	2	1
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: ligaduras metálicas; E: ligaduras elásticas.

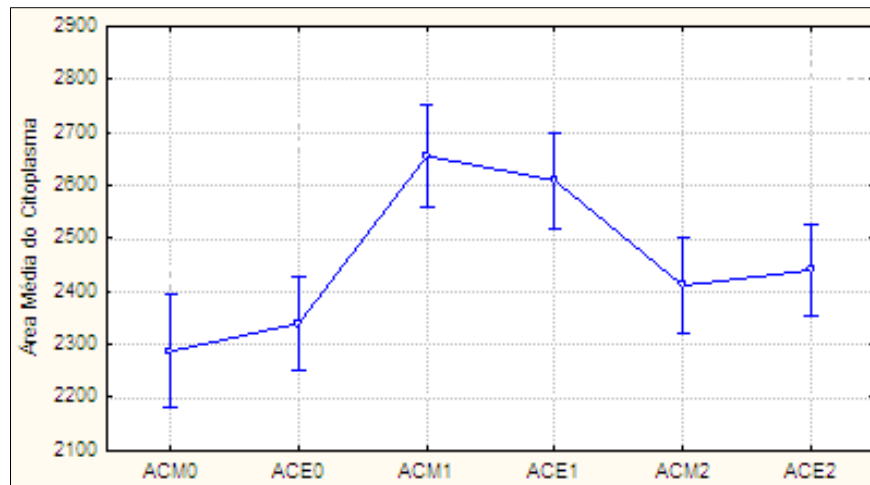
GRÁFICO I - INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DA ÁREA DO NÚCLEO SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008



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.

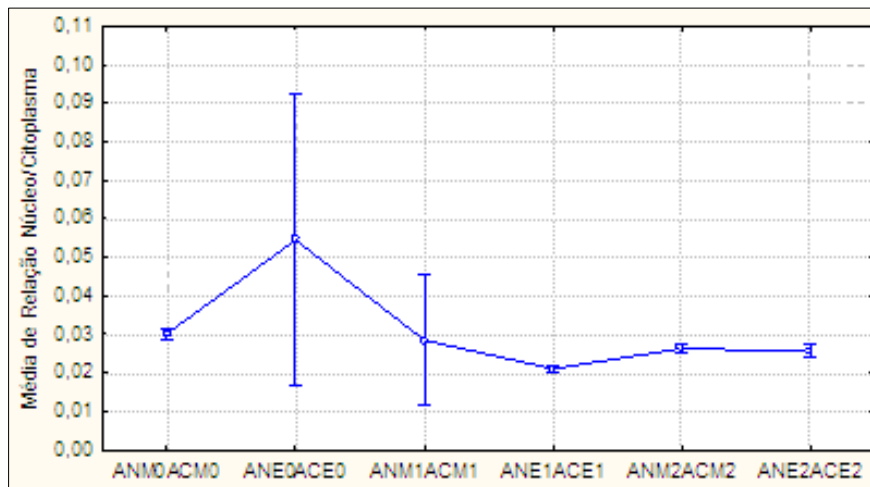
GRÁFICO II – INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DA ÁREA DO CITOPLASMA SEGUNDO TEMPO E TIPO DE LIGADURA, PUCPR-2008



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 DE ACORDO COM O TEMPO E OS TIPOS DE LIGADURAS, 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

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISAParecer Nº **0001389/08**Protocolo CEP Nº **2006**Título do projeto **A influência de brackets metálicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e citomorfológica**Grupo **III**Protocolo CONEP **0281.0.084.000-07**Pesquisador responsável **Elisa Souza Camargo**Versão **4**

Instituição

Objetivos

Analisar as células epiteliais da mucosa bucal, em função da fricção com brackets metálicos, fios de aço inoxidável e ligaduras metálicas e elásticas, se:
Ocorrem alterações morfológicas na área do núcleo e do citoplasma;
Ocorrem alterações morfológicas no núcleo e no citoplasma;
Ocorre alteração na relação núcleo-citoplasma.

Comentários

Trata-se de analisar as características das células epiteliais da mucosa bucal que poderiam ocorrer como consequência da fricção dos "brackets" metálicos, fios metálicos e ligadiuras, tanto metálicas como elásticas.

Considerações

O protocolo é adequado ao que se pretende estudar e não apresenta inadequações de ordem ética.

Termo de consentimento livre e esclarecido

O texto é adequado e a forma como está apresentado contempla todos os requisitos para esclarecer os sujeitos de pesquisa em relação aos pontos relevantes do estudo.

Recomendações

Nenhuma

Conclusões

O projeto, apreciado do ponto de vista ético, tem condições de progredir.

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: **26/03/2008**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

Parecer Nº **0001389/08**

Protocolo CEP Nº **2006**

Título do projeto **A influência de brackets metálicos na mucosa bucal: Análise citomorfométrica e citomorfológica**

Grupo **III**
Versão **4**

Protocolo CONEP **0281.0.084.000-07**

Pesquisador responsável **Elisa Souza Camargo**

Instituição

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, 26 de Março de 2008.



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

ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Menor de Idade

O indivíduo _____, sob responsabilidade de _____, RG _____ está sendo convidado a participar de um estudo denominado: “**A Influência de Brackets Metálicos 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 metal 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 de justificativa.

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 meu filho/a ou indivíduo sob minha responsabilidade foi convidado a participar. Concordo que meu filho/a ou indivíduo sob minha responsabilidade participe da pesquisa, sabendo que nem ele e nem eu receberemos nem pagaremos nenhum valor econômico por sua participação.

Assinatura do responsável pelo sujeito da pesquisa

Assinatura da pesquisadora

Curitiba, _____ de _____ de 2008.

ANEXO V - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Maior de Idade

O indivíduo _____, RG _____ está sendo convidado a participar de um estudo denominado: “**A Influência de Brackets Metálicos 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 metal 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 de justificativa.

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 VI – Normas da Revista – Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology,
Oral Radiology and Endodontology**

The Official Publication for the American College of Oral and Maxillofacial Surgery, American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology, American Academy of Oral Medicine, American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology, and the Organization of Teachers of Oral Diagnosis

Guide for Authors

Editorial Office

Dr James R. Hupp, Editor-in-Chief, School of Dentistry, The University of Mississippi Medical Center, Rm D216- 08, 2500 North State St, Jackson, MS 39216-4504; telephone: (601)815-1952; fax: (601)984-4949; e-mail: tripleo@sod.umsmed.edu

Publisher

ELSEVIER INC., 11830 Westline Industrial Dr, St Louis, MO 63146-3318

Issue Manager, Jill Shepherd. Telephone: (352)483-8112; fax: (352)483-3417; e-mail: shepherdja@aol.com

**Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology
On-Line Manuscript Submission**

Submission of Manuscripts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/tripleo> authors are stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to the Elsevier Editorial System (EES), authors must provide an electronic version of their manuscript. For this purpose original source files, not PDF files, are required. The author should specify an article type for the manuscript (full length article, review article, case report, etc.), choose a set of classifications from the prescribed list provided online, and suggest the appropriate Journal section. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or Journal procedures to the Editorial Office. Once the submission files are uploaded, the system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions will be communicated by e-mail.

International authors who are not completely fluent in the English language should seek help in the preparation of their manuscripts. Such assistance will enhance the review, improve the chance of acceptance, and greatly reduce the time until publication if the article is accepted.

If your manuscript is accepted, the Editors reserve the right to determine whether it will be published in the print edition or solely in the Internet edition of the Journal. Articles

accepted for publication are subject to editorial revision.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the Editor(s) or publisher, and the Editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the Editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication. Neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of such product or service.

Duality of Interests. Any commercial or other associations that might create a duality of interests in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors including author(s) relationship with a corporate entity involved with the subject of the research or product being espoused in the submission. A cover letter at the time of submission should inform the Editor of pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the manuscript is accepted, the Editor will communicate with the authors how best to disclose the relevant information.

Publication Standards of Ethical Conduct. Submitting manuscripts for publication that contain elements of fabrication, falsification, or plagiarism constitutes a major violation of the universally accepted standards of ethical and scientific conduct.

Articles falling into the following categories are invited for submission:

Review manuscripts. Manuscripts that review the current status of a given topic, diagnosis, or treatment are encouraged. These manuscripts should not be an exhaustive review of the literature, but rather should be a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography should not necessarily be all-inclusive but rather include only seminal, pertinent, and contemporary references deemed to be most important by the author.

Clinicopathologic Conference. Papers submitted for the Clinicopathologic Conference (CPC) should present interesting, challenging, or unusual cases. The presentation should simulate clinical work-up, including a differential diagnosis. The complete diagnostic evaluation, management, and follow-up must be included. CPC articles will be organized into five parts: *Clinical presentation*-describe the clinical and imaging characteristics of the lesion. Use clinical photographs and radiographs as appropriate. *Differential diagnosis*-list and discuss lesions to be considered as reasonable diagnostic possibilities. *Diagnosis*-histopathologic findings illustrated with photomicrographs. *Management*-describe the treatment of the patient and response to treatment. *Discussion*-concentrate on the most interesting aspect(s) of the case.

Medical Management and Pharmacology Update. The Medical Management and Pharmacology Update (MMPU) is intended to provide concise, current reviews of medical problems and how they relate to dentistry. Manuscripts should include a good review of the clinical aspects of the disease, stressing the impact of the disease on the dental management and dental treatment of the patient. Emphasis should be placed on new developments, new research, or new approaches to therapy or management.

Manuscripts should not be an exhaustive review of the literature, but rather a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography need not be all inclusive but rather should include only seminal, contemporary references deemed by the author to be most pertinent. The desired format for manuscripts submitted for the MMPU would include: an abstract; topic introduction/overview; epidemiology/demographics; etiology and pathogenesis; clinical presentation/physical findings; diagnosis (laboratory tests, diagnostic imaging, etc.); medical management and treatment; complications; prognosis; oral manifestations/dental implications and significance; and dental management (of patients with the disease). Manuscripts should not exceed 12 pages in 12 point, double-spaced Times New Roman (Tables and Figures count toward the 12-page limit).

Pharmacology Update is a component section of MMPU that offers the reader the opportunity to obtain concise information regarding drugs used in the practice of medicine, clinical dentistry and dental specialties. Papers submitted should present clearly and concisely background information regarding the disease or condition that is managed, the indications, rational and approved uses of the specific drugs or class of drugs, the advantages and benefits of the drug or drug class over previous drugs, mechanism of action, criteria for selection, usual dosage, pharmacokinetics, adverse effects, drug interactions, and oral health and dental management considerations. Emphasis should be placed on new developments, effectiveness in clinical trials, therapeutic outcomes and safety. Manuscripts should reflect the contemporary thought with respect to the topic. Use of figures to illustrate the mechanism of action, and tables to presents therapeutic outcomes, drug interactions, and adverse effects are encouraged. Manuscripts should utilize the above mentioned categories for formatting the paper. Papers should not exceed 3000 words. The recommended font is 12 point, double spaced Times New Roman. A maximum of 50 references is recommended.

Clinical Notes. The Clinical Notes feature is intended to provide a forum for brief communications of a technical nature. They are not scientific papers; they may report a new instrument, technique, procedure, or, in rare situations, an interesting case report.

Copyright statement. The specified copyright statement that follows the Information for Authors in each issue of the Journal must be completed, **signed by all authors**, and faxed to the Editorial Office at (601)984-4949. If not completed in full, it will be returned to the author for completion. The copyright statement may be photocopied for submission or scanned and e-mailed.

Copyright statement. The copyright-transfer document must be downloaded, completed, signed by the responsible author, scanned and attached as a file in the submission process.

Preparation of manuscripts. Only original manuscripts that have not been published in other forms will be considered for publication. Correct preparation of the manuscript by the author will expedite the reviewing and publication procedures. Manuscripts should be word processed double-spaced. Please note the following requirements and the instructions for online submission at <http://ees.elsevier.com/tripleo>.

The article, including all tables, should be formatted in the latest version of Microsoft Word. The use of appropriate subheadings throughout the body of the text (Methods,

Results, and Discussion sections) is required. Legends for figures and tables should appear after the reference list. If an illustration has been taken from published material, the legend must give full credit to the original source. Illustrations must also be submitted electronically as separate files (not embedded). File specifications are listed below in "Illustrations." Tables should be submitted as separate files (in Microsoft Word (*.doc) format.)

Routine case reports add little to our knowledge, but good case reports may occasionally be published if they meet certain criteria: (1) are of rare or unusual lesions that need documentation, (2) are well documented cases showing unusual or "atypical" clinical or microscopic features or behavior, or (3) are cases showing good long-term follow-up information, particularly in areas in which good statistics on results of treatment are needed.

Title Page. The title page of the manuscript should include the title of the article, the full name of the author(s), academic degrees, positions, and institutional affiliations. Listed authors should include only those individuals who have made a significant creative contribution. The corresponding author's address, business and home telephone numbers, fax number and e-mail address should be given.

Authorship. All persons who are identified as authors must have made substantial contribution to the manuscript through significantly contributing to the conception, design, analysis or interpretation of data; drafting or significantly revising the manuscript; and providing final approval of the manuscript. All three of these conditions must be met by each author. Persons who contribute to the effort in supporting roles should not be included as authors; rather they should be acknowledged at the end of the paper.

Abstract. An abstract of no more than 150 words, typewritten double-spaced, should precede the introduction to the article and must accompany each manuscript.

Structured abstract. A structured abstract limited to 150 words must be used for data-based research articles. The structured abstract is to contain the following major headings: *Objective(s)*; *Study Design*; *Results*; and *Conclusion(s)*. The *Objective(s)* reflects the purpose of the study, that is, the hypothesis that is being tested. The *Study Design* should include the setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention, and the type of statistical analysis. The *Results* include the outcome of the study and statistical significance if appropriate. The *Conclusion(s)* states the significance of the results.

Methods. The methods section should describe in adequate detail the experimental subjects, their important characteristics, and the methods, apparatus, and procedures used so that other researchers can reproduce the experiment. When the paper reports experiments on human subjects, the methods section must indicate that the protocol was reviewed by the appropriate institutional review board (IRB) and that each subject in the project signed a detailed informed consent form.

Animals. Please indicate that protocols were reviewed by the appropriate institutional committee with respect to the humane care and treatment of animals used in the study.

References. References should be cited selectively. Personal communications and unpublished data are not to be cited as references; instead, are to be cited in parentheses at the appropriate place in the text. Make sure all references have been verified and are cited consecutively in the text (not including tables) by superscript numbers. Reference list format must conform to that set forth in "Uniform Requirement for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47). A copy of these Requirements may be viewed/printed online at www.icmje.org. References to articles in press must include authors' surnames and initials, title of article, and name of journal. The reference list should be typed double-spaced on a separate page and numbered in order as the reference citations appear in the text. For journal citations, include surnames and initials of authors, complete title of article, name of journal (abbreviated according to the Cumulated Index Medicus), year of publication, volume, number, and inclusive page numbers. For book citations, surnames and initials of authors, chapter title (if applicable), editors' surnames and initials, book title, volume number (if applicable), edition number (if applicable), city and full name of publisher, year of publication, and inclusive page numbers of citation.

EXAMPLES (if six or fewer authors, list all; if seven or more list first six and add *et al*):

Format for periodical references: Pullon PA, McGivney J. Computer utilization in an oral biopsy service. Int J Oral Surg 1977;6:251-5.

Format for book references: Seakins J, Saunders R, editors. Treatment of inborn errors of metabolism. London: Churchill Livingstone: 1973; p. 51-6.

Format for chapter references: Hudson FB, Hawcroft J. Duration of treatment in phenylketonuria. In: Seakins J, Saunders R, editors. Treatment of inborn errors of metabolism. London: Churchill Livingstone; 1973. p. 51-6.

Journal article on the Internet: Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Illustrations. Illustrations should be numbered and provided with suitable legends.

A reasonable number of halftone illustrations or line drawings will be reproduced at no cost to the author, but special arrangements must be made with the Editor-in-Chief for color plates, elaborate tables, or extra illustrations. Typewritten or freehand lettering on illustrations is not acceptable. All lettering must be done professionally, and letters should be in proportion to the drawings or photographs on which they appears.

Illustrations must be submitted in electronic format. All images should be at least 5 inches wide. Images should be provided in TIF or EPS format, per the instruction for online submission at <http://ees.elsevier.com/tripleo> . Macintosh or PC is acceptable. Graphics software such as Photoshop and Illustrator (not presentation software such as PowerPoint, CorelDraw, or Harvard Graphics) should be used in the creation of the art. Color images need to be CMYK, at least 300 DPI, and be accompanied by a digital color proof, not a color laser print or color photocopy. Note: This proof will be used at

press for color reproduction. Gray scale images should be at least 300 DPI accompanied by a proof. Combinations of gray scale and line art should be at least 1200 DPI accompanied by a proof. Line art (black and white or color) should be at least 1200 DPI with a proof.

For best possible reproduction, avoid using shading or dotted patterns; if unavoidable, submit this type of illustration in the form of a glossy photograph for best results. Use thick, solid lines and bold, solid type. Place lettering on a white background; avoid reverse type (white lettering on a dark background). Typewritten or freehand lettering is unacceptable. All lettering must be done professionally and should be in proportion to the drawing graph, or photograph. Do not send original art work, radiograph films, or electrocardiographic strips. Any special instructions regarding sizing should be clearly noted.

Legends to illustrations. Each illustration must be accompanied by a legend. These should be typed double-spaced on a separate page. If an illustration has been taken from published material, the legend must give full credit to the original source.

Tables. The tables should be typewritten double-spaced, including column heads, data and footnotes, and submitted on separate pages. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. All table reference citations should be repeats of numbers assigned within the text, not initial citations. A concise title should be supplied for each table. All columns should carry concise headings describing the data therein. Type all footnotes immediately below the table and define abbreviations. If a table or any data therein have been previously published, a footnote to the table must give full credit to the original source.

Video and Computer Graphics. Authors are encouraged to submit videos and computer-generated graphics; eg, a slide presentation with or without animation and sound. An author who wishes to supply such material should notify the editors in the cover letter and note this intention in the Author Comments area of the online submission. Although the publisher will not edit any video or computer graphic, editors and reviewers may suggest changes. All patient-identifying information must be removed or masked.

The maximum length of a video or computer graphic is 8 minutes. Longer submissions may be divided into smaller clips, each of which should be identified at the beginning of the section (eg, Video Clip 1, Graphic 1). A concise legend for each video clip or computer graphic presentation must be included with the manuscript. Videos are to be submitted in MGE-1 or MPEG-2 (*.mpg) or QuickTime (*.mov) format. More detailed instructions can be found at <http://www.elsevier.com/artwork>. Videos and computer graphics accompanying a manuscript declined for publication will not be accepted separately. If the manuscript is accepted for publication, the presentation will be archived at www.mosby.com/tripleo.

Permissions. Direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted material must be accompanied by **written permission** for their use from the copyright owner and original author along with complete information with respect to source. Photographs of identifiable persons must be accompanied by signed releases showing informed consent. Articles appear in both the print and online versions of the journal, and wording should specify permission in all forms and media. Failure to obtain

electronic permission rights may result in the images not appearing in the the print or online versions.

NOTE: FOLLOW INSTRUCTIONS FOR ONLINE SUBMISSION AT 

[HTTP://EES.ELSEVIER.COM/TRIPLEO](http://ees.elsevier.com/tripleo)

Announcements. Announcements must be received by the Editorial Office at least ten weeks before the desired month of publication. Items published at no charge include those received from a sponsoring society of the Journal; courses and conferences sponsored by state, regional, or national dental organizations; and programs for the dental profession sponsored by government agencies. All other announcements selected for publication by the Editor carry a charge of \$60 US, and the fee must accompany the request to publish.

Reprints. Because of the extremely high cost of preparing color articles, author reprints for articles containing color illustrations have to be prepared as overprints (overrun pages). Order forms will be sent to the **corresponding author** of articles containing color illustrations, so that overprints of those articles can be ordered the month of publication. No complimentary overprints or reprints will be provided.

Checklist for authors

- ☐ Signed copyright transfer statement (signed by all authors) (FAXED to Editorial Office)
- ☐ Letter of submission
- ☐ Title page
 - ☐ Title of article
 - ☐ Full names(s), academic degree(s), affiliation(s) and titles of author(s)
 - ☐ Author to whom correspondence, galley, and reprint request are to be sent, including address and business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address
- ☐ Structured abstract (double-spaced)
- ☐ Article proper (double-spaced)
- (Figures and tables should not be part of the text of the manuscript but added as separate files)
- ☐ Statement of IRB review (stated in manuscript)
- ☐ References (double-spaced on a separate page)
- ☐ Reprint requests line (on a separate page)
- ☐ Tables (double-spaced, on separate pages)
- ☐ Legends (double-spaced, on a separate page)
- ☐ Illustrations, properly formatted (as separate files)
- ☐ Video/computer graphics, properly formatted (as separate files)
- ☐ Acknowledgments (on a separate page)
- ☐ Source of funding for research (on a separate page)
- ☐ Signed permission to reproduce previously published material, in all forms and media (scanned in as a file)
- ☐ Signed permission to publish photographs of identifiable persons from the individual specifying permission in all forms and media (scanned in as a file)
- ☐ Financial interest disclosure, if applicable (on a separate page)
- ☐ If this paper was presented at a meeting identification of organization, city, and year (on a separate page)