

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

TAÍS DE MORAIS ALVES DA CUNHA

**ANÁLISE *IN SITU* DA BIOCOMPATIBILIDADE DA
RESINA ACRÍLICA SOBRE CÉLULAS DA MUCOSA
PALATINA**

CURITIBA

2008

TAÍS DE MORAIS ALVES DA CUNHA

**ANÁLISE *IN SITU* DA BIOCOMPATIBILIDADE DA
RESINA ACRÍLICA SOBRE CÉLULAS DA MUCOSA
PALATINA**

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: Prof. Dr. Odilon Guariza Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima

CURITIBA

2008

Ao meu pai **Neidimir Cunha** e à minha mãe **Aureneide Cunha** em eterno agradecimento por tornarem sempre possível a realização dos meus sonhos.

À minha irmã **Tatiana Cunha** por ser a amiga de todas as horas e por também desejar a minha realização e felicidade.

Ao meu irmão **Tiago Cunha** pelo companheirismo, amizade e exemplo de dedicação e amor à Odontologia.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força que me ergue, me faz ter coragem de lutar e desejar um mundo melhor.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela oportunidade de realizar este mestrado e pela bolsa de estudos parcial concedida.

Ao **Prof. Dr. Odilon Guariza Filho** por ter orientado este trabalho e ter estado sempre disposto a ajudar em todos os momentos.

Ao **Prof. Dr. Adilson Soares de Lima** pela dedicação na co-orientação deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Orlando Tanaka** por todo o conhecimento e sabedoria compartilhado. A sua presença fez toda a diferença.

Aos professores **Dr. Hiroshi Maruo** e **Dra. Elisa Camargo** pela contribuição à minha formação profissional.

Aos professores da disciplina de Ortodontia da Universidade Federal da Bahia, em especial à **Prof^a. Dr^a. Telma Martins de Araújo**, que acompanharam os meus primeiros passos na Ortodontia e fizeram despertar em mim o amor pela especialidade.

À **Prof^a. Dr^a. Ieda Crusoé Rocha Rebello** pelo exemplo de dedicação profissional e competência e por ter me iniciado na pesquisa científica.

Aos meus colegas de Mestrado: **Bruno Cerci, Fernanda Baboni, Jucienne Ribeiro, Luciana Retamoso, Luégia Knop, Luis Filipe Lon, Marcos Sabatoski, Mariana Moschetti, Raul Sampaio, Ricardo Schintcovski e Saulo Régis de Oliveira Junior** pela companhia, aprendizado e amizade.

À **Luégia Knop** e **Saulo Régis** por terem me ensinado tanta coisa durante estes dois anos de convivência e principalmente porque são pessoas que souberam compartilhar.

Às amigas **Luciana Retamoso** e **Tatiana Luz** que estiveram presentes em todas as etapas da realização deste trabalho, pela ajuda e apoio inestimável dispensados a mim.

Aos funcionários da PUCPR, em especial a **Silvana Casagrande Gabardo** e **Neide Reis Borges**, pela atenção e colaboração nas horas que precisei de ajuda.

À **Lisiane Cândido** e à **Prof^a. Dr^a. Maria Ângela N. Machado**, que demonstraram disponibilidade e interesse em me ajudar na obtenção de material para a pesquisa.

À **Dra. Mônica Blaya** do Laboratório de Patologia AnatPat, por ter gentilmente cedido o seu espaço e material para o processamento das lâminas.

Às pessoas que participaram como voluntários desta pesquisa, cuja colaboração foi essencial e fundamental para a concretização do trabalho.

À todas as pessoas que fazem parte da minha vida e que colaboraram na realização deste trabalho, bem como para minha formação pessoal e profissional.

“É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, de tal maneira que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	2
PÁGINA TÍTULO.....	3
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
Citologia Esfoliativa em Base Líquida	9
Análise Citomorfológica.....	10
Análise Citomorfométrica.....	11
RESULTADOS.....	12
DISCUSSÃO.....	14
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS.....	20
TABELAS.....	23
FIGURA	25
LEGENDA.....	26
 2. ARTIGO EM INGLÊS	 27
TITLE PAGE	28
ABSTRACT	29
INTRODUCTION.....	30
MATERIALS AND METHODS.....	32
Liquid-based Exfoliative Citology	34
Cytomorphologic Analysis	35
Cytomorphometric Analysis	36
RESULTS	37
DISCUSSION.....	39
CONCLUSION	43
REFERENCES.....	44
TABLES	47
FIGURE	49
LEGEND	50
 3. APÊNDICE.....	 51
APÊNDICE I – Metodologia Estendida.....	52
APÊNDICE II – Análise Estatística.....	59
APÊNDICE III – Instruções de uso do aparelho e agenda de atendimentos.....	63
APÊNDICE IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	64
 4. ANEXOS.....	 65
ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética	66
ANEXO II – Normas para Publicação – <i>Journal of Dental Research</i>	68

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO**Análise *in situ* da Biocompatibilidade da Resina Acrílica sobre Células da Mucosa Palatina**

Taís de Moraes Alves da Cunha

Antônio Adilson Soares de Lima

Odilon Guariza-Filho*

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

*Autor para correspondência, Rua Imaculada Conceição, 1155 / 80215-901 Curitiba – Paraná – Brasil / Fone: 55 41 3271-1637 / Fax: 55 41 3271-1405 / odilongfilho@gmail.com

Biocompatibilidade do Acrílico em Células Bucais

Palavras-chave: resinas acrílicas; mucosa bucal; citologia

Número de palavras no resumo: 218

Número de palavras no resumo e texto: 2.995

Número de tabelas e figuras: 3

Número de referências bibliográficas: 33

RESUMO

A resina acrílica autopolimerizável utilizada para a confecção de aparelhos ortodônticos apresenta níveis variados de citotoxicidade de acordo com o grau de conversão de seus monômeros. Durante a polimerização, a conversão do monômero em polímero geralmente não é completa e o monômero residual é liberado para o meio bucal, afetando a biocompatibilidade das resinas acrílicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in situ* o efeito da resina acrílica sobre o epitélio da mucosa palatina, considerando diferentes técnicas de manipulação. Foram realizados esfregaços na mucosa palatina por meio de citologia esfoliativa em base líquida de 38 indivíduos, 19 utilizaram aparelhos removíveis confeccionados sob o método de massa e 19 utilizaram aparelhos manipulados por adição. As coletas das células epiteliais foram realizadas antes da instalação do aparelho e após um, sete e trinta dias de uso do aparelho. Os esfregaços foram avaliados quanto à morfologia e à morfometria das células. Os grupos demonstraram comportamento semelhante ($p>0,05$), apresentando inflamação local significativa ($p<0,05$) com o uso do aparelho, não foi observada alteração na área do núcleo e na área do citoplasma das células epiteliais em contato com a resina acrílica nos tempos avaliados. Desta forma, o uso de aparelhos removíveis de resina acrílica provoca uma reação inflamatória na mucosa palatina sem alteração morfométrica das células epiteliais em um período de trinta dias.

INTRODUÇÃO

A resina acrílica quimicamente ativada à base de poli (metilmetacrilato) é amplamente utilizada em Ortodontia para a confecção de aparelhos fixos, removíveis e de contenção (Gonçalves *et al.*, 2006).

Para a confecção de aparelhos ortodônticos, as resinas acrílicas autopolimerizáveis podem ser manipuladas pela técnica de adição ou de massa. A técnica de adição consiste na saturação do pó pelo líquido, por meio da aplicação de incrementos de ambos os constituintes sobre o modelo de gesso da arcada dentária do paciente. Na técnica de massa, pó e líquido são misturados num único momento, sendo o material manipulado quando atinge a fase plástica (Stafford e Brooks, 1985).

A resina acrílica é um material derivado do etileno e composto por polímeros de alto peso molecular, cuja reação de polimerização se dá sem a formação de subprodutos (Anusavice, 1996). Durante o processo de polimerização, a conversão do monômero em polímero geralmente não é completa, permanecendo alguma quantidade de monômero residual, que é liberada para o meio bucal durante o uso de aparelhos ortodônticos (Baker *et al.*, 1988).

O monômero residual ou metilmetacrilato (MMA) em contato com a saliva e mucosa bucal pode causar efeitos adversos e reações alérgicas (Ruiz-Genao *et al.*, 2003). As reações locais provocadas pelo MMA freqüentemente relatadas são: eritema, queimação, necrose e dor (Nealey e Del Rio, 1969; Giunta e Zablotsky, 1976; McCabe e Basker, 1976; Gonçalves *et al.*, 2006). Além disso,

são descritas reações sistêmicas como: edema labial, urticária crônica, dificuldade de deglutição e sialorréia (Lunder e Rogl Butina, 2000; Ruiz-Genao *et al.*, 2003).

O MMA é também considerado citotóxico e, possivelmente, genotóxico (Tsuchiya *et al.*, 1994; Sheridan *et al.*, 1997; Kedjarune *et al.*, 1999; Schweikl *et al.*, 2001; Jorge *et al.*, 2003). Apesar de ter sido relatada a citotoxicidade do metilmetacrilato *in vitro*, não há relatos que demonstrem a ação do MMA nas células da mucosa palatina *in vivo*.

A importância em oferecer aos pacientes um tratamento ortodôntico sem risco significativo de danos às células da mucosa bucal, aliada a escassez de relatos na literatura sobre a análise citológica da mucosa bucal em contato com a resina acrílica autopolimerizável, motivaram a realização deste estudo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in situ* o potencial da resina acrílica, considerando os métodos de manipulação, em causar alterações morfológicas e morfométricas no epitélio da mucosa palatina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o registro nº 2169.

Para a realização do estudo foram selecionados 38 voluntários do curso de Odontologia da PUCPR, que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Os critérios de exclusão foram: tabagismo, etilismo, diabetes *mellitus*, anemia, lesões na mucosa palatina, uso de medicamentos e estar em tratamento ortodôntico.

A amostra foi composta por 8 indivíduos do sexo masculino e 30 do sexo feminino com média de idade de 21,7 (17-32) anos. Os indivíduos foram aleatoriamente divididos em dois grupos de acordo com o método de manipulação do aparelho que utilizaram. Sendo o grupo MM (n=19) composto por voluntários que utilizaram aparelhos manipulados pela técnica de massa e o grupo MA (n=19) composto por indivíduos que utilizaram aparelhos confeccionados pelo método de adição.

Os aparelhos removíveis de resina acrílica quimicamente ativada incolor (Orto Cril® - Dental Vipi Ltda., São Paulo, Brasil) foram confeccionados sobre os modelos de gesso da arcada superior de cada indivíduo. Todos os aparelhos foram confeccionados pelo mesmo operador utilizando a proporção de monômero e polímero indicada pelo fabricante.

A manipulação em massa consistiu na mistura em momento único do monômero e polímero, ao atingir a fase plástica, a resina foi manipulada e assentada sobre o modelo de gesso previamente isolado com o isolante para

resina acrílica Cel-Lac (Dentsply, São Paulo, Brasil). Para a manipulação por adição foram colocados incrementos de líquido e pó diretamente sobre o modelo de gesso previamente isolado com Cel-Lac (Adams, 1987).

Após a completa polimerização, todos os aparelhos foram submetidos ao mesmo protocolo de acabamento e polimento mecânico. O acabamento consistiu em desgaste dos limites cervicais e posterior do aparelho com fresa de tungstênio (nº 1509) e posterior aplicação de lixas com abrasividade decrescente (nº 400 e nº 600). O polimento foi realizado na face do aparelho sem contato com o palato, por meio da aplicação de uma pasta composta por pedra-pomes e água, com o auxílio de escova de cerdas duras em torno de bancada por um minuto. Em seguida, foi realizada a aplicação de roda de flanela associada a uma pasta de branco de Espanha e água, durante um minuto (Adams, 1987).

Ao final do polimento, os aparelhos foram lavados em água corrente e secos com papel absorvente. A instalação foi realizada até um período máximo de 24 horas após a confecção. Neste intervalo, os aparelhos foram armazenados a seco e em temperatura ambiente.

Cada voluntário foi orientado a utilizar o aparelho por trinta dias em período integral, removendo-o apenas para alimentação e higiene e o uso do aparelho foi conferido diariamente. O protocolo recomendado para higienização do aparelho foi escovação com água após as principais refeições, sem a utilização de dentifrícios ou colutórios.

Citologia Esfoliativa em Base Líquida

Estudos citológicos são úteis na avaliação de alterações celulares da mucosa aparentemente normal, ou seja, nos casos em que a biópsia é contraindicada (Burzlaff *et al.*, 2007). Por este motivo, a citologia esfoliativa em base líquida foi o exame escolhido para a realização do presente estudo.

A coleta das células epiteliais da mucosa palatina foi realizada por um único operador em quatro momentos: antes da instalação do aparelho (T0 - controle), após um dia de uso (T1), sete dias após a instalação (T2) e trinta dias após a instalação do aparelho (T3).

A coleta foi realizada com o *kit* do sistema DNA-Citoliq[®] (Digene Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), denominado *Universal Collection Medium* (UCM). Previamente à coleta, os indivíduos realizaram bochecho com água por 30 segundos para remoção de células mortas. A escova de coleta do *kit* foi aplicada no palato, entre canino e pré-molar esquerdo, de forma vigorosa e em movimentos giratórios, com cinco voltas no sentido horário. As lâminas foram processadas em laboratório e submetidas à coloração com a técnica de Papanicolaou modificada, seguindo as orientações do fabricante do Sistema DNA-Citoliq (2002).

Análise Citomorfológica

A avaliação citopatológica foi realizada em um microscópio de luz (*Olympus*[®] BX50, Japão) com aumento original de 400x por um único operador sem conhecimento prévio dos grupos a que pertenciam as lâminas.

Os esfregaços foram classificados de acordo com o tipo celular predominante (Sugerman e Savage, 1996) e a análise morfológica qualitativa foi realizada objetivando também identificar critérios citológicos de malignidade de acordo com a classificação de Papanicolaou (Lange *et al.*, 1972).

Análise Citomorfométrica

Cinqüenta células de cada lâmina citológica foram capturadas por uma câmera *Sony CCD Íris Color Vídeo*, modelo DXC-107A (*Sony Electronics Inc.*, USA). A área do núcleo (AN) e a do citoplasma (AC) de cada célula foi mensurada por um único operador com o auxílio de um programa de análise de imagens para o aumento da precisão e velocidade de mensuração. O programa utilizado foi o *Image Pro Plus*, versão 4.5.029 para *Windows 98/NR/2000* (*Media Cybernetics. Inc. USA*). A delimitação do núcleo e do citoplasma de cada célula foi realizada com o auxílio de um cursor digitador e, então, as áreas nuclear e citoplasmática foram mensuradas pelo programa de imagem. Posteriormente foi obtida a relação núcleo/citoplasma (N/C) de cada célula, de acordo com a técnica descrita por Ogden *et al.* (1999). Foram avaliadas 152 lâminas citológicas dos 38 indivíduos perfazendo um total de 7.600 células mensuradas.

Para medir o erro casual foram mensuradas a AN e a AC de 30 células de lâminas aleatórias em dois momentos. Foi realizada então, a correlação de Pearson, e o cálculo do poder de reprodutibilidade foi obtido através do erro de Dalberg.

RESULTADOS

Na análise citomorfológica dos esfregaços dos grupos MM e MA, foram verificadas apenas células epiteliais com aspecto de normalidade e prevalência de células das camadas superficiais e sub-superficiais do epitélio. Muitas lâminas apresentaram infiltrado inflamatório característico, com presença de halo perinuclear, neutrófilos e linfócitos. Portanto, foram observados apenas esfregaços Classe I e II da classificação de Papanicolaou (Figura 1, página 25).

Os grupos MM e MA não diferiram quanto ao grau de inflamação pelo teste qui-quadrado (Tabela 1, página 23). Ambos apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) do número de esfregaços com inflamação (Classe II de Papanicolaou) de T0 para T1, aumento este que permaneceu em T2 e diminuiu em T3 (teste de Mc-Nemar- Tabela 1, página 23).

As medidas celulares apresentaram normalidade e homogeneidade de variância entre os grupos, permitindo a aplicação do teste ANOVA a dois critérios com medidas repetidas a um nível de significância de 5%. A média, o desvio-padrão e o valor p obtidos para as medidas de AN, AC e N/C estão descritos na Tabela 2 (página 24). Não houve diferença estatisticamente significativa para as medidas AN, AC e N/C entre os grupos investigados ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) das medidas em relação aos tempos observados para nenhum dos grupos investigados (Tabela 2, página 24). Além disso, os valores do erro de Dalberg foram 0,2% para a AC e 3,5% para a AN, demonstrando alto poder de reprodutibilidade das medidas realizadas.

Para verificar se havia interferência do gênero nas medidas celulares, e considerando que um dos grupos não apresentou distribuição normal, foi aplicado o teste U de Mann Whitney, por meio do qual foi constatado que a AN e a AC não diferiram segundo gênero ($p > 0,05$) em nenhum dos tempos observados. Além disso, foi verificada fraca correlação ($r < 0,30$) entre as medidas celulares AN e AC e a idade dos indivíduos (Correlação de Pearson).

DISCUSSÃO

A resina acrílica autopolimerizável é um material utilizado rotineiramente em Ortodontia e há diversos relatos de casos na literatura referentes a reações adversas ao acrílico (Devlin e Watts, 1984; Ruiz-Genao *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2006). Em função da possibilidade de envolvimento sistêmico, estas reações podem colocar em risco a vida do paciente, portanto é crescente o interesse em estudos com o propósito de avaliar a biocompatibilidade deste material (Gonçalves *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro* demonstram o potencial citotóxico do acrílico (Tsuchiya *et al.*, 1994; Sheridan *et al.*, 1997; Kedjarune *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Schweikl *et al.*, 2001; Jorge *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2008b). No entanto, ainda não foram realizados estudos experimentais *in vivo* para estabelecer o efeito biológico deste material. Sabe-se que as reações adversas estão relacionadas com a liberação de componentes tóxicos da resina acrílica, tais como: formaldeído, peróxido de benzoíla e especialmente o metilmetacrilato residual (Devlin e Watts, 1984).

Backer *et al.* (1988) encontraram concentração de monômero residual na saliva adjacente à superfície palatina de aparelhos confeccionados à base de resina acrílica quatro vezes maior do que na saliva total, e esta maior concentração local do monômero é responsável pela maior incidência de reações alérgicas confinadas à mucosa palatina. Por este motivo o palato foi a região bucal selecionada neste estudo para a investigação das possíveis

alterações celulares provocadas pelo uso de aparelhos confeccionados com resina acrílica.

Os trabalhos são unânimes em demonstrar a presença de monômero residual na massa acrílica, e é descrito que uma maior quantidade de monômero é liberada nas primeiras vinte e quatro horas após a polimerização e decresce com o tempo (Lamb *et al.*, 1982; Stafford e Brooks, 1985; Baker *et al.*, 1988; Gonçalves *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2008). Tal fato pode ser explicado pela conversão tardia do monômero em polímero e difusão do monômero para o meio externo (Baker *et al.*, 1988).

Neste estudo, foi verificado que a presença de células inflamatórias aumentou de forma significativa após um dia e sete dias de uso do aparelho, havendo uma diminuição da inflamação após trinta dias de uso. Este resultado permite inferir que o monômero residual liberado em maior quantidade nas primeiras 24 horas provoca uma reação inflamatória subclínica.

Entretanto, a utilização de aparelhos ortodônticos removíveis favorece a formação de biofilme e altera a microbiota bucal normal (Batoni *et al.*, 2001). Estes microorganismos, portanto, também podem ter exercido algum papel no desencadeamento da reação inflamatória local.

No que se refere ao maior acúmulo de microorganismos decorrente do uso de aparelhos ortodônticos e o seu papel na alteração epitelial, houve uma preocupação em controlar esta variável na composição da amostra. Este estudo foi realizado com voluntários estudantes de Odontologia que, presumivelmente, apresentam um padrão de higiene bucal elevado e pertencem a uma faixa etária

jovem. Estes fatores reforçam a possibilidade da reação inflamatória ter sido provocada pelos agentes tóxicos do acrílico. No entanto, sugere-se a realização de estudos semelhantes a este, com análises microbiológicas para mensurar a formação de biofilme nos aparelhos e avaliar o impacto que a possível alteração da microbiota pode exercer na inflamação da mucosa palatina.

No presente estudo, não foi encontrada alteração nas variáveis AN, AC e na relação N/C das células epiteliais que permaneceram em íntimo contato com a resina acrílica. Embora tenha provocado uma reação inflamatória, o uso do aparelho em resina acrílica por trinta dias não alterou o padrão morfométrico celular de maneira estatisticamente significativa.

Considerando que aparelhos fixos ou removíveis em acrílico permanecem em íntimo contato com as células epiteliais da mucosa bucal e que o metilmetacrilato liberado é alergênico e citotóxico, uma possível justificativa para a manutenção da integridade de células em contato com o monômero *in vivo* é a proteção natural oferecida pela camada queratinizada do epitélio da mucosa. Aliado ao fato de existir maior probabilidade de a mucosa bucal jovem ser mais resistente à irritação química do que a de pacientes idosos (Austin e Baker, 1980).

Além disso, a película salivar adquirida pode ser uma barreira para a difusão do monômero. Enzimas oxidativas na saliva como a mieloperoxidase, podem também estar envolvidas na degradação do metilmetacrilato, que ocorre mais rapidamente na saliva do que em água (Baker *et al.*, 1988).

O fato dos grupos MA e MM terem se comportado de maneira semelhante está de acordo com o trabalho de Gonçalves *et al.* (2008a), que demonstraram por meio de um estudo com cromatografia gasosa, que a liberação de monômero residual por aparelhos confeccionados pelos métodos de massa e adição não apresenta diferença estatisticamente significativa.

Cowpe *et al.*, 1985 em um estudo que avaliou a influência da idade e do gênero nas medidas nucleares e citoplasmáticas de células epiteliais, demonstraram que o gênero não interfere nas medidas celulares e que a área do núcleo varia significativamente com o avançar da idade. No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa da AN e AC entre os gêneros, além disso, a idade dos indivíduos também não influenciou na área nuclear e citoplasmática.

Para um material odontológico ser biocompatível, uma resposta apropriada do hospedeiro é necessária; isto significa ausência de reações adversas (Schmalz e Browne, 1995). A resina acrílica autopolimerizável causa reações alérgicas e tóxicas (Ruiz-Genao *et al.*, 2003), além de inflamação tecidual constatada por este estudo.

Embora em alguns países seja crescente o uso da resina acrílica fotopolimerizável, considerada não citotóxica, a resina autopolimerizável ainda é a mais utilizada mundialmente e a de menor custo (Gonçalves *et al.*, 2008b). Portanto, para este material ser utilizado, deve ser manipulado de maneira apropriada, seguindo as recomendações do fabricante, e os aparelhos de

acrílico devem conter a menor concentração possível de monômero residual (Gonçalves *et al.*, 2008a).

Sendo assim, algumas medidas durante a confecção de aparelhos ortodônticos em resina são reportadas na literatura para reduzir a frequência de reações de hipersensibilidade e garantir a segurança para a saúde dos pacientes, tais como: polimerização em água ou sob pressão, utilização da proporção de monômero e polímero correta e o armazenamento em água por 72 horas após a polimerização (Baker *et al.*, 1988; Rose *et al.*, 2000; Nunes de Mello *et al.*, 2003).

Na medida em que alterações ocorrem ao nível molecular antes da detecção ao microscópio e antes que ocorram alterações clínicas (Mehrotra *et al.*, 2006), sugere-se a realização de estudos que avaliem as alterações moleculares da mucosa em contato com o metilmetacrilato com acompanhamento a longo prazo.

CONCLUSÃO

Baseado nos achados deste estudo pode-se concluir que:

1. A resina acrílica autopolimerizável provocou reação inflamatória na mucosa palatina que diminuiu antes de trinta dias;
2. A resina acrílica autopolimerizável não provocou alterações na morfologia das células epiteliais da mucosa palatina em um período de trinta dias;
3. A resina acrílica autopolimerizável não provocou alterações nas áreas do núcleo e do citoplasma das células epiteliais da mucosa palatina em um período de trinta dias;
4. O método de manipulação da resina acrílica autopolimerizável parece não influenciar o efeito biológico deste material.

REFERÊNCIAS

Adams CP (1987). Aparelhos ortodônticos removíveis. São Paulo, Brazil: Santos; 241-244.

Anusavice KJ (1996). Phillip's Science of Dental Materials Philadelphia: WB Saunders.

Austin AT; Basker, RM (1980). The level of residual monomer in acrylic denture base materials. *Br Dent J* 149(10): 281-86.

Baker S, Brooks SC, Walker DM (1988). The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *J Dent Res* 67(10):1295-9.

Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, et al. (2001). Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. *Eur J Oral Sci* 109(6):388-92.

Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, Visioli F, Sant'Ana Filho M, da Silva VD, et al. (2007). Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 18(6):367-75.

Cowpe JG, Longmore RB, Green MW(1985). Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J R Soc Med* 78:995-1004.

Devlin H, Watts DC (1984). Acrylic 'allergy'? *Br Dent J* 157(8):272-5.

Giunta J, Zablotzky N (1976). Allergic stomatitis caused by selfpolymerizing resin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 41: 631-7.

Gonçalves TS , Morganti MA, Campos LC, Rizzatto SM, Menezes LM (2006). Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129(3):431-5.

Gonçalves TS, de Menezes LM, Silva LE (2008a). Residual monomer of autopolymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. *Angle Orthod* 78(4):722-7.

Gonçalves TS, Minghelli Schmitt V, Thomas M, Lopes de Souza MA, Macedo de Menezes L (2008b). Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod* 78(5):926-30.

Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC (2001). Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* 14(5):439-43.

Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE (2003). Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent* 90(2):190-3.

Kedjarune U, Charoenworakul N, Koontongkaew S (1999). Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* 44(1):25-30.

Lamb DJ, Ellis B, Priestley D (1982). Loss into water of residual monomer from autopolymerizing dental acrylic resin. *Biomaterials* 3(3):155-9.

Lange DE, Meyer M, Hahn W (1972). Oral exfoliative cytology in the diagnosis of viral and bullous lesions. *J Periodontol* 43(7):433-7.

Lunder T, Rogl-Butina M (2000). Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis* 43:232-3.

McCabe JF, Basker RM (1976). Tissue sensitivity to acrylic resin. A method of measuring the residual monomer content and its clinical application. *Br Dent J* 140(10):347-50.

Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R (2006). Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 5(11): 1-9.

Nealey ET, Del Rio CE (1969). Stomatitis venenata: reaction of a patient to acrylic resin. *J Prosthet Dent* 21:480-4.

Nunes de Mello JA, Braun KO, Rached RN, Del Bel Cury AA (2003). Reducing the negative effects of chemical polishing in acrylic resins by use of an additional cycle of polymerization. *J Prosthet Dent* 89(6):598-602.

Ogden GR, Wight AJ, Rice P (1999). Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* 28(5): 216-20.

Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF (2000). Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. Measurement of their residual monomer output and cytotoxicity. *J Orofac Orthop* 61(4):246-57.

Ruiz-Genao DP, Moreno de Vega MJ, Sanchez Perez J, Garcia-Diez A (2003). Labial edema due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis* 48(5):273-4.

Schmalz G, Browne RM (1995). The biological evaluation of medical devices used in dentistry. The influence of the European Union on the preclinical screening of dental materials. *Int Dent J* 45(4):275-8.

Schweikl H, Schmalz G, Spruss T (2001). The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 80(7):1615-20.

Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT (1997). Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 10(1):73-7.

Silva WJ, Rached RN, Rosalen PL, Del Bel Cury AA (2008). Effects of nystatin, fluconazole and propolis on polymethylmethacrylate resin surface. *Braz Dent J* 19(3): 190-6.

Stafford GD, Brooks SC (1985). The loss of residual monomer from acrylic orthodontic resins. *Dent Mater* 1(4):135-8.

Sugerman PB, Savage NW (1996). Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent J* 41(2):71-4.

Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N (1994). Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 71(6):618-24.

TABELAS

TABELA 1. PORCENTAGEM DE ESFREGAÇOS COM INFLAMAÇÃO NOS GRUPOS MASSA E ADIÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS

GRUPO	TEMPO	n	%
MASSA	Dia 0	9	47,4 ^a
	Dia 1	16	84,2 ^b
	Dia 7	16	84,2 ^b
	Dia 30	15	78,9 ^{a,b}
ADIÇÃO	Dia 0	5	26,3 ^a
	Dia 1	16	84,2 ^b
	Dia 7	15	78,9 ^b
	Dia 30	11	57,9 ^{a,b}

NOTA: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$, por meio do teste de significância das mudanças de Mc-Nemar
Os esfregaços com inflamação correspondem a Classe II de Papanicolaou

TABELA 2. MÉDIAS, DESVIOS - PADRÃO E VALORES p , SEGUNDO GRUPOS E DIAS

PARÂMETRO	DIA	MM	MA
		Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Área do núcleo	0	45,96 $\pm$ 6,53	48,02 $\pm$ 4,31
	1	46,01 $\pm$ 5,47	48,42 $\pm$ 5,21
	7	47,49 $\pm$ 7,78	49,32 $\pm$ 8,81
	30	46,71 $\pm$ 5,73	48,52 $\pm$ 4,01
Área do citoplasma	0	1.130,37 $\pm$ 241,74	1.215,25 $\pm$ 225,72
	1	1.095,30 $\pm$ 150,93	1.227,02 $\pm$ 262,84
	7	1.151,16 $\pm$ 280,28	1.204,98 $\pm$ 144,55
	30	1.101,94 $\pm$ 203,20	1.175,63 $\pm$ 183,41
Relação núcleo/citoplasma	0	0,042 $\pm$ 0,006	0,040 $\pm$ 0,006
	1	0,043 $\pm$ 0,008	0,041 $\pm$ 0,007
	7	0,043 $\pm$ 0,010	0,041 $\pm$ 0,006
	30	0,043 $\pm$ 0,007	0,042 $\pm$ 0,006

NOTA: não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhuma das medidas

LEGENDA: MM – método de massa / MA – método de adição

FIGURA

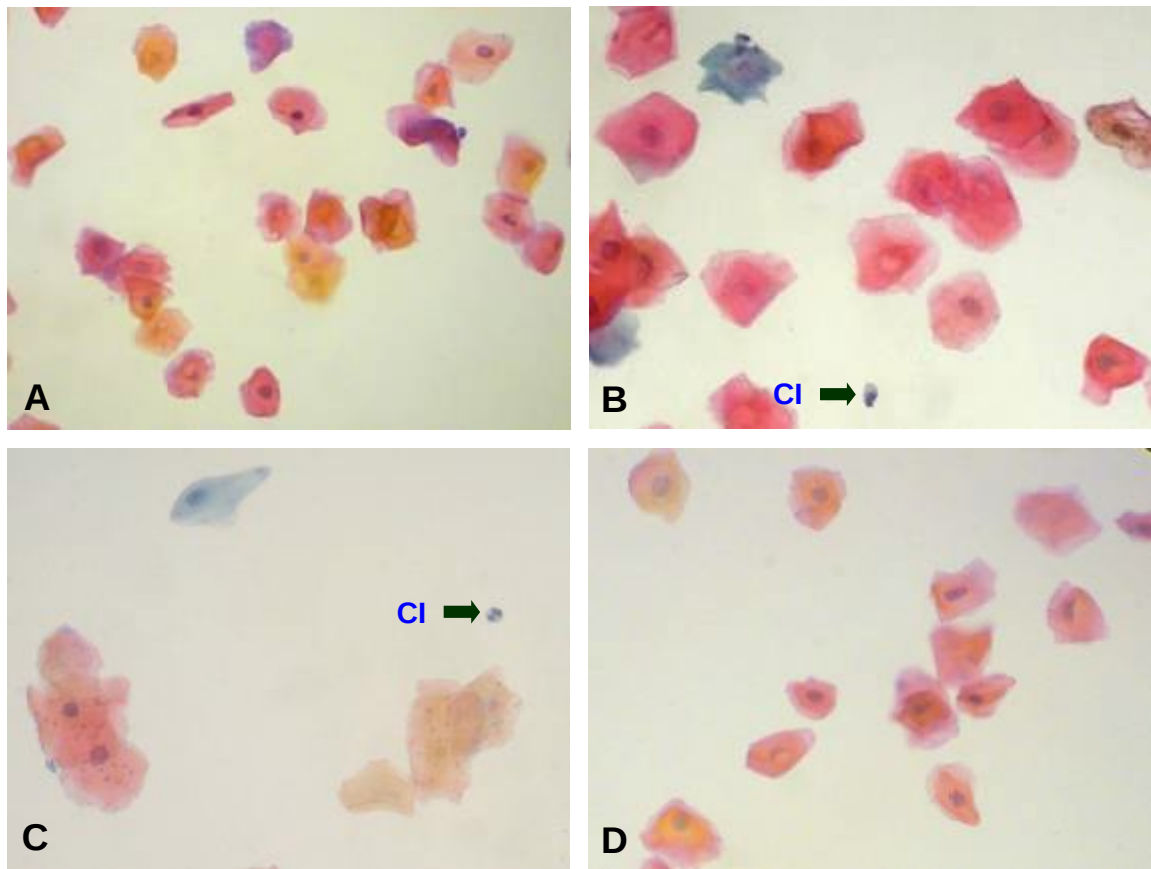


FIGURA 1

Aumento original 400x

LEGENDA

FIGURA 1 – Fotomicrografias de esfregaços da mucosa palatina. **A.** Células epiteliais superficiais da mucosa palatina em T0; **B.** Esfregaço Classe II de Papanicolaou e predomínio de células superficiais em T1; **C.** Células epiteliais superficiais da mucosa palatina em esfregaço Classe II em T2 e **D.** Células epiteliais da mucosa palatina em T3. (Papanicolaou 400x) **LEGENDA** – CI indica célula inflamatória.

2. ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE***In situ* Biocompatibility of Acrylic Resin in Palatal Mucosa Cells**

Taís de Moraes Alves da Cunha

Antônio Adilson Soares de Lima

Odilon Guariza-Filho*

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil

*corresponding author: Rua Imaculada Conceição, 1155 / 80215-901. Curitiba – Parana – Brazil / Phone: 55 41 3271-1637 / Fax: 55 41 3271-1405 / odilongfilho@gmail.com

Short title: Biocompatibility of Acrylic Resins

Key words: acrylic resins; oral mucosa; cytology

Number of words in the abstract: 187

Number of words in the abstract and the text: 2.546

Number of tables and figures: 3

Number of cited references: 32

ABSTRACT

Autopolymerized acrylic resin, which is used to prepare orthodontic appliances, shows different levels of cytotoxicity according to the monomer conversion grade. During the curing process, the conversion of monomer into polymer is often incomplete; thus, monomer leaches from the resin to the oral environment, affecting the acrylic resins biocompatibility. The aim of this study was to assess the *in situ* effect of acrylic resins on the palatal mucosa epithelium, comparing two manipulation techniques. Smears were collected by liquid-based exfoliative cytology from the palatal mucosa of 38 subjects: 19 used removable appliances built by the mass technique and 19 wore appliances built by the addition method. The epithelial cells were collected before the appliance placement, after one, seven, and thirty days. The smears were analyzed morphologically and morphometrically. Both groups demonstrated similar behavior ($p>0.05$). There was significant local inflammation due to appliance wearing ($p<0.05$); however, there were no significant changes in the nuclear and cytoplasmic areas of the epithelial cells. Thus, the removable acrylic resin appliances were able to induce a significant inflammatory reaction on palatal mucosa within 30 days, with no morphometric changes in the epithelial cells.

INTRODUCTION

Poly (methyl methacrylate) acrylic resin is widely used in orthodontics to build removable or auxiliary fixed appliances as well as retainers. The retention stage is extremely important for orthodontic treatment success, and the acrylic appliances must be worn full time in this stage (Gonçalves *et al.*, 2006).

There are two different techniques that are used to manipulate this material: the addition technique (or salt and pepper), in which the polymer is saturated by its monomer, and the mass technique, in which powder and liquid are mixed together (Stafford and Brooks, 1985). However, during the curing process, the monomeric conversion is never complete, so the residual monomer is released into the oral environment while the patient is wearing the orthodontic appliance (Baker *et al.*, 1988).

The residual monomer, or methyl methacrylate (MMA) may cause adverse and allergic reactions when it contacts the oral mucosa and saliva (Ruiz-Genao *et al.*, 2003). The local adverse reactions are erythema, a burning sensation, edema, fissures, necrosis, and pain (Nealey and Del Rio, 1969; Giunta and Zablotsky, 1976; McCabe e Basker, 1976; Gonçalves *et al.*, 2006). It can even cause systemic reactions such as labial edema, chronic urticaria, difficulty in swallowing, and hypersalivation (Lunder and Rogl Butina, 2000; Ruiz-Genao *et al.*, 2003).

MMA is considered cytotoxic as well as possibly genotoxic (Tsuchiya *et al.*, 1994; Sheridan *et al.*, 1997; Kedjarune *et al.*, 1999; Schweikl *et al.*, 2001; Jorge *et al.*, 2003). Although the MMA cytotoxic potential *in vitro* is described in

the scientific literature, there are no studies that demonstrate the impact of MMA on epithelial cells *in vivo*.

This study was developed due to the importance of offering patients an orthodontic treatment with no significant risk to the oral mucosa cells, and because of the lack of reports providing a cytological analysis of oral mucosa exposed to MMA. The aim of this study was to evaluate, *in situ*, the potential of acrylic resin, considering two manipulation techniques, to produce morphometric and morphologic changes in the palatal mucosa epithelium.

MATERIALS AND METHODS

The ethical committee of the Pontifical Catholic University approved this experimental protocol. Volunteers were recruited among undergraduate dentistry students. A total of 38 selected subjects took part in the study and signed an agreement form. The exclusion criteria were alcoholism, history of smoking, diabetes mellitus, anemia, palatal mucosa lesions, and orthodontic or medicamentous treatment during the experiment.

The mean age of the volunteers was 21.7 (17-32) years, and 8 subjects were male and 30 female. The subjects were randomly divided into two experimental groups according to the appliance resin manipulation method. The MM group (n=19) were the volunteers that wore acrylic appliances manipulated by the mass technique, and the MA group (n=19) were those that wore appliances prepared by the addition technique.

Cast models of each subject were obtained to construct an autopolymerized acrylic resin (Orto Cril® - Dental Vipi Ltda., São Paulo, Brazil) appliance with no clasps. The appliances were made by the same operator following the monomer: polymer ratio recommended by the manufacturer.

For the mass manipulation, polymer and monomer were mixed together, and the resin was poured into the cast previously isolated with Cel-Lac (Dentsply, São Paulo, Brazil). For the addition technique, powder and liquid were gradually poured into each cast (Adams, 1987).

All appliances were submitted to the same ground and mechanical polishing protocol. Gridding was done with a tungsten bur (#1509) and abrasive paper

(#400 and #600) using a portable micromotor. The polishing was done on the acrylic surface that was not in contact with the palatal mucosa. A black brush and felt wheel with pumice slurry were used on a lathe. After that, a soft wheel was applied with chalk powder also on a lathe. These were applied to each instrument for a minute (Adams, 1987).

After polishing, the appliances were washed and dried with absorbent paper. The appliances were delivered to the subjects within 24 hours. The individuals were instructed to wear the appliance full time for thirty days, removing only for meals and oral hygiene. Also individuals were recommended to clean the appliance with water and a dental brush with no toothpaste. In addition, the wearing of the appliance was checked every day.

Liquid-based Exfoliative Cytology

Cytological studies may be useful as a screening tool to assess the cellular changes in apparently normal mucosa, in which case a biopsy is not indicated (Burzlaff *et al.*, 2007). Thus, liquid-based exfoliative cytology was selected for this study development.

The same operator collected smears at four times: immediately before appliance placement (T0 - control), one day after appliance placement (T1), 7 days after appliance placement (T2), and 30 days after placement (T3).

The squamous epithelial cells were collected using the Universal Collection Medium (UCM) kit of DNA-Citoliq[®] System (Digene Brazil Ltda., São Paulo, Brazil). Before smear collection, subjects were instructed to rinse their mouth with water for 30 seconds to remove debris. The collection brush was firmly applied with a rotating movement at the palatal mucosa. The palatal region selected was between the left cuspid and premolar. Slides were stained using the Papanicolaou technique modified according to the DNA-Citoliq manufacturer's recommendations.

Cytomorphologic Analysis

The cytopathologic analysis was performed by a blind operator using light microscopy (*Olympus*[®] BX50, Japan) at x400 magnification.

The predominant cell type in each smear was analyzed (Sugerman e Savage, 1996), and morphologic qualitative analysis was also performed according to the criteria set in the Papanicolaou classification system for identification of malignant cells (Lange *et al.*, 1972).

Cytomorphometric Analysis

Fifty cells from each cytological slide were captured by a Sony CCD Iris Color Video camera (Sony model DXC-107A, Towada, Japan) at x400 magnification. For nuclear (NA) and cytoplasmic (CA) area measurement, the Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring MD), version 4.5.029 for Windows 98/NR/2000, was used to increase the precision and speed of measurement. The NAs and CAs were obtained by drawing around the nuclear and cell boundaries using the digitizer cursor and measuring mode of the image analysis system, then the nuclear/cytoplasmic ratio (N/C) was obtained (Ogden *et al.*, 1999). A total of 7,600 cells were examined and measured from 152 cytological slides from the 38 subjects.

To obtain the casual error, the NA and CA of 30 cells randomly selected were measured at two moments. The Pearson correlation was performed, and the reproducibility power was obtained by the Dalberg error.

RESULTS

All smears from both groups showed normal epithelial cells. The superficial and sub-superficial epithelial cells were predominant in all cytological slides screened. A large number of smears presented inflammatory characteristics such as a perinuclear halo, polymorphonuclear leukocytes, and lymphocytes. Thus, in this study, we only identified smears that were classified as Papanicolaou class I and II (Figure 1).

According to the Chi-square test, the MA and MM groups showed no difference in inflammatory grade (Table 1). The number of inflammatory smears (Papanicolaou class II) in both groups increased ($p < 0.05$) from T0 to T1 and T2 and showed a decrease at T3 ($p < 0.05$) (Mc-Nemar test – Table 1).

The normality test of Kolmogorov-Smirnov and homogeneity of variance Levene's test revealed that the data showed a normal distribution and homogeneous variance between groups, allowing application of the two-way repeated measures analysis of variance ANOVA (Table 2) with a 5% significance level. The mean, standard deviation, and p value for the NA, CA, and N/C ratio are illustrated in Table 2. The behavior of the measurements were similar in both groups, and there were no difference ($p > 0.05$) in the measurements related to the observed times (Table 2). The Dalberg error was 0.2% for CA and 3.5% for NA; thus, there was high reproducibility power for the measurements obtained.

To verify if there were differences in the NA and CA between the sexes for all time points, the Mann Whitney U test was used. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the measurements between males and females.

Furthermore, this test verified a weak correlation ($r < 0.3$) between the age of the subjects and the cellular measurements (Pearson Correlation).

DISCUSSION

Autopolymerized acrylic resin is widely used in orthodontics. However there have been several case reports relating adverse reactions to acrylic (Devlin e Watts, 1984; Ruiz-Genao *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2006). Concern about the biocompatibility of this material arose as these reactions can lead to systemic involvement and may put the patient's life at risk (Gonçalves *et al.*, 2006).

Several studies demonstrated the acrylic resin cytotoxic potential *in vitro* (Tsuchiya *et al.*, 1994; Sheridan *et al.*, 1997; Kedjarune *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Schweikl *et al.*, 2001; Jorge *et al.*, 2003; Goncalves *et al.*, 2008b); however, the present study is the first to examine the *in vivo* biocompatibility of acrylic resins. It is known that reactions are linked to the elution of toxic components such as dibutylphthalate, formaldehyde, and especially its own residual monomer, methyl methacrylate (Devlin and Watts, 1984).

Backer *et al.* (1988) found residual monomer concentrations in the salivary film from the fitting surface of the acrylic appliances over four times higher than in the rest of the saliva. This higher local concentration of the monomer would be more likely to sensitize or elicit an allergic response in the palatal mucosa. For this reason, the palate was the oral site selected to assess epithelial changes due to wearing of the acrylic resin appliance.

Independent of the activation method, previous studies have shown the presence of residual monomer in the acrylic mass. The greatest drop in residual monomer concentration usually occurs during the first 24 hours of use. The major

dilution also occurs mainly in the first 24 hours and decrease with time (Lamb *et al.*, 1982; Stafford e Brooks, 1985; Baker *et al.*, 1988; Gonçalves *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2008). It has been suggested that two mechanisms could be responsible for this 24-hour reduction: late conversion of residual monomer into polymer, once there are free radicals that remain on the appliance after curing, and diffusion of monomer out of the acrylic appliance (Baker *et al.*, 1988).

This study verified the significant increase of inflammatory smears after one and seven days of appliance wearing, and a decrease in inflammation after 30 days. This result allowed us to infer that the residual monomer greater leaching in the first 24-hours leads to an inflammatory reaction.

However, wearing the removable appliance induce accumulation of continuous dental plaque and alter the oral microbiota (Batoni *et al.*, 2001). Microorganisms could also be involved in development of the local inflammatory reaction. In an attempt to control this variable, the sample was composed only of dentistry students; these subjects probably presented a high oral hygiene standard. This strengthened the possibility that the inflammatory reaction was induced by the toxic acrylic agents. However, we suggest the development of similar studies with microbiologic analysis to measure biofilm formation on the appliances and assess the impact the microbiota may exert on the palatal mucosa.

In our study mucosal smears did not present alterations in NA, CA, and N/C of epithelial cells that remained in contact with the acrylic resin appliance. Nevertheless an inflammatory reaction was observed.

Considering that acrylic appliances remain in intimate contact with epithelial cells from the oral mucosa and that MMA is allergen and cytotoxic, maintenance of the *in vivo* cellular integrity could be due to the oral mucosa keratinized cover that provides a natural defense. In addition, young oral mucosa is more resistant to chemical injuries than elderly mucosa (Austin and Baker, 1980).

Furthermore, the acquired salivary pellicle may also provide a barrier to diffusion. Oxidative salivary enzymes, such as myeloperoxidase might also be involved in the degradation of MMA, which occurs more rapidly in saliva than in water (Baker *et al.*, 1988).

The MM and MA groups showed similar behavior according to Gonçalves *et al.* (2008a). Using gas chromatographic analysis, they demonstrated that residual monomer that leached from appliances prepared by either the mass or addition technique showed no statistical difference.

In a study that assessed the influence of sex and age on the nuclear and cytoplasmic areas of epithelial cells, Cowpe *et al.* (1985) demonstrated that sex does not interfere with the cellular measurements and that the nuclear area is influenced by patient age. In our study, there were no differences in the NA and CA between males and females, and the age of the individuals also did not influence the cellular measurements.

Schmalz and Browne (1995) stated that, for biocompatibility of dental materials, an appropriate host response is necessary, meaning there can be no adverse reaction of a living system to the material. Acrylic resins cause toxicity,

allergic reactions (Ruiz-Genao *et al.*, 2003), and, as shown by the present study, local inflammatory tissue reaction.

Although in some countries the use of photopolymerized acrylic resin, which is considered non-cytotoxic, has increased in the past few years, self-cured resin is still the most popular and least expensive material (Gonçalves *et al.*, 2008b). Therefore, this material must be manipulated in a proper way, and all efforts should be made to minimize the levels of residual monomer in the acrylic appliance (Gonçalves *et al.*, 2008a).

Some measures should be taken to reduce the frequency of allergic reactions and help guarantee the patient's well being. These measures are polymerization in water or under pressure, maintaining the right proportion of powder to liquid, hot water storage for at least one hour after confection, and water immersion for 72 hours before delivery (Baker *et al.*, 1988; Rose *et al.*, 2000; Nunes de Mello *et al.*, 2003).

Changes occur at the molecular level before they can be observed under the microscope and before clinical changes occur (Mehrotra *et al.*, 2006). Thus, we suggest the development of studies that assess molecular changes of the mucosa exposed to the MMA in a long-term follow-up.

CONCLUSIONS

Autopolymerized acrylic resin is able to induce inflammatory changes in the oral epithelium.

Acrylic resin did not induce morphologic cellular changes on the palatal mucosa within 30 days.

Acrylic resin did not induce changes in the nuclear or cytoplasmic areas of palatal mucosa epithelial cells within 30 days.

The method of manipulating the acrylic resin did not influence the biological effect of the material.

REFERENCES

Adams CP (1987). Aparelhos ortodônticos removíveis. São Paulo, Brazil: Santos; 241-244.

Austin AT; Basker, RM (1980). The level of residual monomer in acrylic denture base materials. *Br Dent J* 149(10): 281-86.

Baker S, Brooks SC, Walker DM (1988). The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *J Dent Res* 67(10):1295-9.

Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, et al. (2001). Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. *Eur J Oral Sci* 109(6):388-92.

Burzlauff JB, Bohrer PL, Paiva RL, Visioli F, Sant'Ana Filho M, da Silva VD, et al. (2007). Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 18(6):367-75.

Cowpe JG, Longmore RB, Green MW(1985). Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J R Soc Med* 78:995-1004.

Devlin H, Watts DC (1984). Acrylic 'allergy'? *Br Dent J* 157(8):272-5.

Giunta J, Zablotzky N (1976). Allergic stomatitis caused by selfpolymerizing resin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 41: 631-7.

Gonçalves TS , Morganti MA, Campos LC, Rizzatto SM, Menezes LM (2006). Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129(3):431-5.

Gonçalves TS, de Menezes LM, Silva LE (2008a). Residual monomer of autopolymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. *Angle Orthod* 78(4):722-7.

Gonçalves TS, Minghelli Schmitt V, Thomas M, Lopes de Souza MA, Macedo de Menezes L (2008b). Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod* 78(5):926-30.

Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC (2001). Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* 14(5):439-43.

Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE (2003). Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent* 90(2):190-3.

Kedjarune U, Charoenworarluk N, Koontongkaew S (1999). Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* 44(1):25-30.

Lamb DJ, Ellis B, Priestley D (1982). Loss into water of residual monomer from autopolymerizing dental acrylic resin. *Biomaterials* 3(3):155-9.

Lange DE, Meyer M, Hahn W (1972). Oral exfoliative cytology in the diagnosis of viral and bullous lesions. *J Periodontol* 43(7):433-7.

Lunder T, Rogl-Butina M (2000). Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis* 43:232-3.

McCabe JF, Basker RM (1976). Tissue sensitivity to acrylic resin. A method of measuring the residual monomer content and its clinical application. *Br Dent J* 140(10):347-50.

Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R (2006). Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 5(11): 1-9.

Nealey ET, Del Rio CE (1969). Stomatitis venenata: reaction of a patient to acrylic resin. *J Prosthet Dent* 21:480-4.

Nunes de Mello JA, Braun KO, Rached RN, Del Bel Cury AA (2003). Reducing the negative effects of chemical polishing in acrylic resins by use of an additional cycle of polymerization. *J Prosthet Dent* 89(6):598-602.

Ogden GR, Wight AJ, Rice P (1999). Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* 28(5): 216-20.

Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF (2000). Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. Measurement of their residual monomer output and cytotoxicity. *J Orofac Orthop* 61(4):246-57.

Ruiz-Genao DP, Moreno de Vega MJ, Sanchez Perez J, Garcia-Diez A (2003). Labial edema due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis* 48(5):273-4.

Schmalz G, Browne RM (1995). The biological evaluation of medical devices used in dentistry. The influence of the European Union on the preclinical screening of dental materials. *Int Dent J* 45(4):275-8.

Schweikl H, Schmalz G, Spruss T (2001). The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 80(7):1615-20.

Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT (1997). Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 10(1):73-7.

Silva WJ, Rached RN, Rosalen PL, Del Bel Cury AA (2008). Effects of nystatin, fluconazole and propolis on polymethylmethacrylate resin surface. *Braz Dent J* 19(3): 190-6.

Stafford GD, Brooks SC (1985). The loss of residual monomer from acrylic orthodontic resins. *Dent Mater* 1(4):135-8.

Sugerman PB, Savage NW (1996). Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent J* 41(2):71-4.

Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N (1994). Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 71(6):618-24.

TABLES

TABLE 1. PERCENTAGE OF INFLAMMATORY SMEARS IN THE MASS AND ADDITION GROUPS

GROUP	TIME	n	%
MASS	Day 0	9	47.4 ^a
	Day 1	16	84.2 ^b
	Day 7	16	84.2 ^b
	Day 30	15	78.9 ^{a,b}
ADDITION	Day 0	5	26.3 ^a
	Day 1	16	84.2 ^b
	Day 7	15	78.9 ^b
	Day 30	11	57.9 ^{a,b}

NOTE: Different letters indicate statistical difference ($p < 0,05$) – Mc-Nemar test

TABLE 2. MEANS, STANDARD DEVIATIONS AND p VALUES, ACCORDING TO GROUPS AND TIMES

VARIABLE	Day	MM	AM
		Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Nuclear area	0	45.96 $\pm$ 6.53	48.02 $\pm$ 4.31
	1	46.01 $\pm$ 5.47	48.42 $\pm$ 5.21
	7	47.49 $\pm$ 7.78	49.32 $\pm$ 8.81
	30	46.72 $\pm$ 5.73	48.52 $\pm$ 4.01
Cytoplasmic area	0	1,130.37 $\pm$ 241.74	1,215.25 $\pm$ 225.72
	1	1,095.30 $\pm$ 150.93	1,227.02 $\pm$ 262.84
	7	1,151.16 $\pm$ 280.28	1,204.98 $\pm$ 144.55
	30	1,101.94 $\pm$ 203.20	1,175.63 $\pm$ 183.41
Nuclear/Cytoplasmic ratio	0	0.042 $\pm$ 0.006	0.040 $\pm$ 0.006
	1	0.043 $\pm$ 0.008	0.041 $\pm$ 0.007
	7	0.043 $\pm$ 0.010	0.041 $\pm$ 0.006
	30	0.043 $\pm$ 0.007	0.042 $\pm$ 0.006

NOTE: There were no statistical significant difference ($p>0,05$)

LEGEND: MM – mass method / AM – addition method

FIGURE

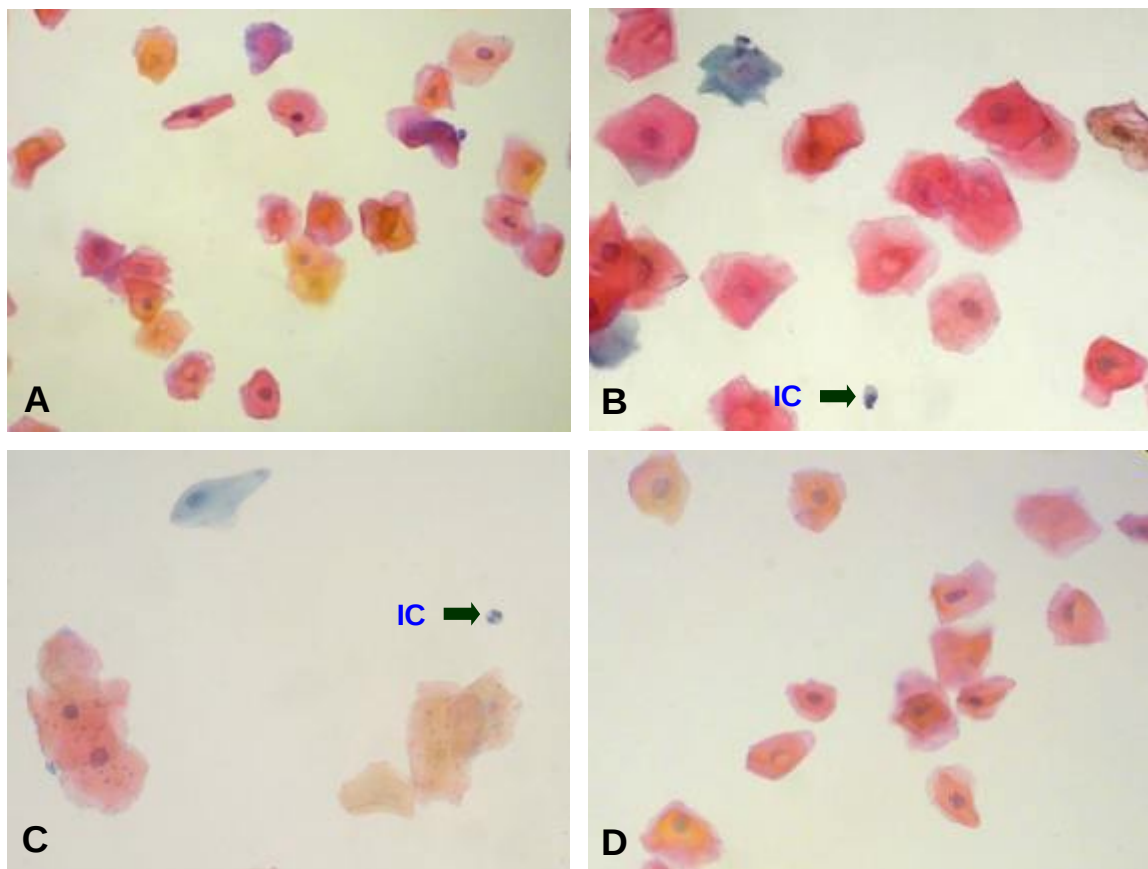


FIGURE 1

(Papanicolaou x400)

LEGEND

FIGURE 1 – Photomicrograph of palatal mucosa smears. **A.** Superficial epithelial palatal mucosa cells at T0; **B.** Papanicolaou Class II smear and superficial cells were predominant at T1; **C.** Superficial epithelial palatal mucosa cells in Class II smears at T2; **D.** Epithelial palatal mucosa cells at T3 (Papanicolaou X400);

LEGEND – IC indicates inflammatory cells.

3. APÊNDICE

APÊNDICE I

Metodologia Estendida

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o registro nº 2169 (ANEXO I, página 66).

VOLUNTÁRIOS

Os alunos do curso de graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná foram convidados a participar deste estudo. Foram selecionados 38 voluntários com idades entre 17 e 32 anos, sendo 8 do sexo masculino e 30 do sexo feminino. Os indivíduos ou responsáveis que aceitaram participar do experimento assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE IV, página 64).

Somente foram selecionados indivíduos que não apresentavam histórico de tabagismo e etilismo, doenças debilitantes, anemia, lesões na mucosa palatina e não se encontravam sob tratamento ortodôntico.

PROTOCOLO DE CONFECÇÃO DOS APARELHOS REMOVÍVEIS

Foi realizada a impressão da arcada superior de cada indivíduo com moldeiras (Morelli, Sorocaba, Brasil) e alginato (Jeltrate® - Dentsply, Rio de Janeiro, Brasil) devidamente proporcionado e manipulado de acordo com as instruções do fabricante. Modelos de gesso das arcadas dos pacientes foram confeccionados a partir dos moldes em alginato, com gesso pedra ortodôntico branco (Mossoró®, Guarulhos, Brasil).

Aparelhos removíveis de resina acrílica quimicamente ativada (Orto Cril® - Dental Vipi Ltda.) foram confeccionados sobre os modelos de gesso por um único operador. As medidas de pó foram pesadas em balança analítica e o líquido dosado com o auxílio de uma micropipeta obedecendo à proporção indicada pelo fabricante de 20g de pó para 8 ml de líquido.

Os voluntários foram divididos em dois grupos experimentais, um com pacientes que utilizaram aparelhos manipulados pela técnica de massa (n=19) e outro composto pelos pacientes que utilizaram aparelhos confeccionados pelo método de adição (n=19).

MÉTODOS DE MANIPULAÇÃO

A manipulação da resina acrílica pela técnica de massa consistiu na mistura do monômero e do polímero em um pote paladon, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Durante a fase plástica a resina foi vertida sobre o modelo de gesso (Figura 1 A-C, página 57).

A manipulação por adição consistiu na colocação de incrementos de pó e líquido diretamente sobre o modelo, também respeitando a proporção indicada pelo fabricante (Figura 1 D e E, página 57).

ACABAMENTO E POLIMENTO

As etapas de acabamento e polimento foram iguais para todos os aparelhos. O acabamento consistiu em desgaste dos limites da placa com fresa de tungstênio (nº 1509) acoplada à peça reta e micromotor (Kavo, Joinville, Brasil), de modo que os contornos cervicais dos dentes e porção posterior do palato terminassem em bisel (Figura 1 F, página 57). Posteriormente, lixas com abrasividade decrescente (nº 400 e nº 600) foram aplicadas durante um minuto cada. As lixas foram adaptadas em um mandril para lixas acoplado à peça reta e micromotor (Figura 1 G, página 57).

Imediatamente após o acabamento os aparelhos foram submetidos ao processo de polimento mecânico. Este consistiu inicialmente na aplicação de uma pasta composta por pedra-pomes e água com o auxílio de escova de cerdas duras, adaptada a torno de bancada durante um minuto. Posteriormente foi utilizada roda de flanela associada à pasta de branco de Espanha. A roda de flanela também foi acoplada ao torno e utilizada durante um minuto em cada aparelho.

Ao final do polimento os aparelhos foram lavados em água corrente, secos com papel absorvente e entregues aos voluntários até no máximo 24 horas após a sua confecção (Figura 1 H, página 57).

INSTALAÇÃO DO APARELHO E INSTRUÇÕES DE USO

Os aparelhos removíveis em resina acrílica foram adaptados pelo mesmo operador ao palato dos indivíduos voluntários, de modo a assegurar que se encontravam totalmente passivos na cavidade bucal. Quando constatada alguma área de pressão nos dentes ou interferência na oclusão esta foi removida com fresa de tungstênio em baixa rotação.

Cada voluntário foi orientado a utilizar o aparelho por trinta dias em período integral, removendo-o apenas para alimentação e higiene. Juntamente com o aparelho foi entregue uma caixa plástica para armazenamento do mesmo e as instruções de uso (APÊNDICE III, página 63).

CITOLOGIA ESFOLIATIVA EM BASE LÍQUIDA

A coleta das células epiteliais da mucosa palatina dos voluntários foi realizada por um único operador em quatro momentos. Imediatamente antes da instalação do aparelho (T0 - controle), após um dia de uso (T1), sete dias após a instalação (T2) e trinta dias após a instalação (T3).

Previamente à coleta, os pacientes realizaram bochecho com água por 30 segundos. A coleta propriamente dita foi realizada com o *kit* do sistema DNA-CITOLIQ^{®1}, denominado *Universal Collection Medium* (Figura 2 A, página 57), cujo registro no Ministério da Saúde está sob o número 10322550015. Este *kit* é composto por um frasco contendo 1 ml de UCM e uma escova citológica com cabo longo. A solução UCM é composta por N-Butanol, polietilenoglicol, ácido acético glacial, azida sódica, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) qsq e água deionizada qsq.

A escova de coleta foi aplicada no palato de forma vigorosa e em movimentos giratórios, com cinco voltas no sentido horário (Figura 2 B, página

¹ Digene Brasil Ltda., São Paulo, Brasil

57). O material coletado foi acondicionado no frasco com a solução UCM. Após ser agitado manualmente por 30 segundos, cada frasco foi conservado à temperatura de aproximadamente 5°C até o processamento histológico.

As lâminas foram processadas, e então foi realizada a coloração com a técnica de Papanicolaou modificada, conforme recomendações do fabricante.

ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA

A análise dos esfregaços foi realizada em um microscópio de luz, modelo *Olympus BX50*² adaptado com ocular WH 10X-H/22 e objetivas PLAN 40X/0,65³. Previamente à leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés. Cinquenta células de cada lâmina foram capturadas em uma ampliação de 400 vezes por uma câmera *Sony CCD Íris Color Vídeo*, modelo DXC-107A⁴. Os núcleos e citoplasmas das células foram delimitados com o auxílio de um cursor digitador para a obtenção das áreas nucleares (AN) e citoplasmáticas (AC), e então foi obtida a relação núcleo/citoplasma (N/C) de cada célula.⁵ Estas medidas foram realizadas pelo sistema de análise de imagens *Image Pro Plus*, versão 4.5.029 para *Windows 98/NR/2000*⁶.

ANÁLISE CITOMORFOLÓGICA

O método de coloração Papanicolaou diferencia as células epiteliais de acordo com o grau de ceratinização. Durante a maturação celular ocorre aumento da quantidade de ceratina e, por conseguinte, da densidade citoplasmática.

Os esfregaços foram percorridos em toda a sua extensão e classificados segundo o tipo de células predominantes, de acordo com Sugerman e Savage em 1996⁷ (Quadro 1).

² *Olympus*[®] BX50, Japão.

³ *Olympus*[®], Japão.

⁴ *Sony Electronics Inc.*, USA.

⁵ OGDEN GR, COWPE JG, GREEN MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med.* v.19, p.53-55, 1990.

⁶ *Media Cybernetics. Inc.*, USA.

⁷ SUGERMAN PB, SAVAGE NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent J.* v.41, n.2, p.71, Apr.,1996.

Quadro 1 – Características da mucosa bucal normal de acordo com a coloração Papanicolaou

Camada		Citoplasma	Núcleo
Superficial	Estrato córneo	Vermelho/ laranja / marrom	anucleada
	Não ceratinizado	Vermelho/laranja quadrilátero	Azul picnótico/achatado
Sub-superficial	Estrato granuloso	Azul esverdeado/ rosa/ laranja Grânulos de ceratohialina	Azul escuro
	Não granular	Azul esverdeado/ rosa/ laranja quadrilátero	Azul escuro
Estrato espinhoso		Azul esverdeado/ rosa/laranja ovóide	Azul e largo
Estrato basal		Verde/ azul esverdeado Ovóide e pequeno	Azul redondo
FONTE: Sugerman e Savage (1996)			

Os esfregaços também foram avaliados qualitativamente buscando identificar critérios citológicos de malignidade, de acordo com a classificação de Papanicolaou⁸.

Classificação de Papanicolaou

Classe 0 – material insuficiente ou inadequado para análise

Classe I – células com padrão morfológico 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

⁸ LANGE DE, MEYER M, HAHN W. Oral exfoliative cytology in diagnosis of viral and bollous lesions. *J Periodontol.* v.43, n.7, p433-437. July 1972.

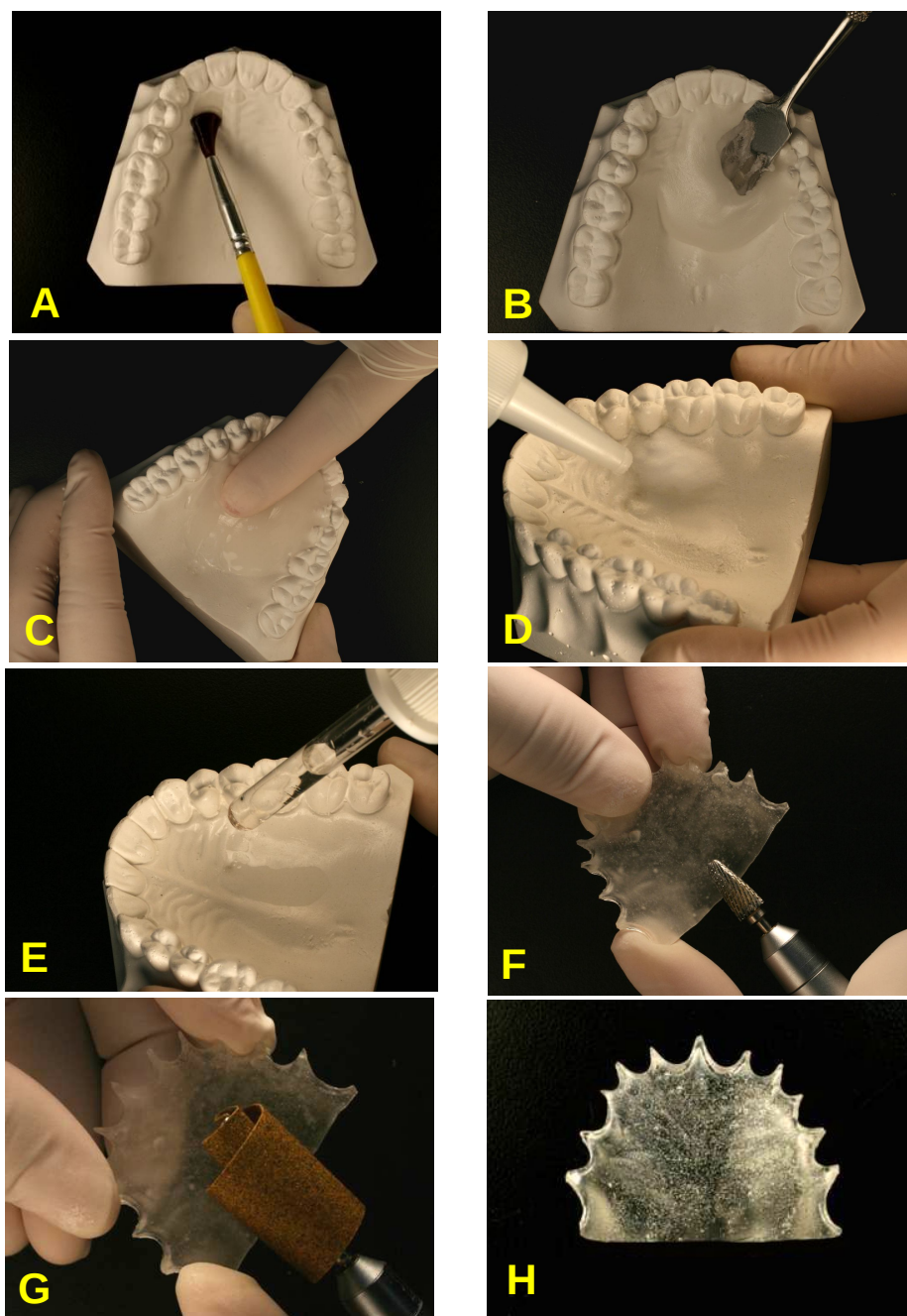


FIGURA 1

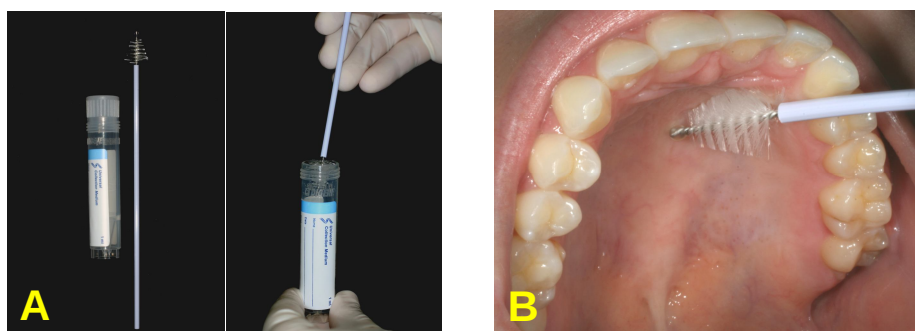


FIGURA 2

LEGENDA

FIGURA 1 – Confeção do aparelho removível de resina acrílica autopolimerizável **A.** Isolamento do modelo de trabalho; **B, C.** Manipulação da resina acrílica pela técnica de massa; **D, E.** Manipulação da resina acrílica pela técnica de adição; **F.** Acabamento do aparelho com fresa de tungstênio e **G.** lixa abrasiva; **H.** Aparelho de resina acrílica utilizado no experimento.

FIGURA 2 – **A.** *kit* do sistema DNA-Citoliq; *Universal Collection Medium* (UCM); **B.** Coleta das células epiteliais da mucosa palatina com a escova do *kit* DNA-Citoliq.

APÊNDICE II

Análise Estatística

TABELA 1. TESTE DE NORMALIDADE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA AS MEDIDAS: ÁREA DO NÚCLEO, ÁREA DO CITOPLASMA E RELAÇÃO NÚCLEO/CITOPLASMA NOS GRUPOS MASSA E ADIÇÃO NOS DIFERENTES TEMPOS, PUCPR - 2008

PARÂMETRO	GRUPOS	ESTATÍSTICA	n	VALOR p
Área do núcleo	MM dia 0	0,1571	19	0,2000*
	MA dia 0	0,2033	19	0,0377
	MM dia 1	0,1626	19	0,2000*
	MA dia 1	0,0951	19	0,2000*
	MM dia 7	0,1638	19	0,1940*
	MA dia 7	0,2041	19	0,0363
	MM dia 30	0,1649	19	0,1867*
	MA dia 30	0,1453	19	0,2000*
Área do citoplasma	MM dia 0	0,1372	19	0,2000*
	MA dia 0	0,1648	19	0,1868*
	MM dia 1	0,1451	19	0,2000*
	MA dia 1	0,1372	19	0,2000*
	MM dia 7	0,1928	19	0,0613*
	MA dia 7	0,1183	19	0,2000*
	MM dia 30	0,1462	19	0,2000*
	MA dia 30	0,1041	19	0,2000*
Relação núcleo/citoplasma	MM dia 0	0,1445	19	0,2000*
	MA dia 0	0,2163	19	0,0197
	MM dia 1	0,1780	19	0,1150*
	MA dia 1	0,1189	19	0,2000*
	MM dia 7	0,2068	19	0,0318
	MA dia 7	0,2219	19	0,0146
	MM dia 30	0,1611	19	0,2000*
	MA dia 30	0,0862	19	0,2000*

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: * indica $p > 0,05$

LEGENDA: MM = método de massa / MA = método de adição

TABELA 2. TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS DE LEVENE PARA A ÁREA DO NÚCLEO, ÁREA DO CITOPLASMA E RELAÇÃO NÚCLEO CITOPLASMA NOS DIFERENTES TEMPOS, SEGUNDO MÉTODOS DE MANIPULAÇÃO, PUCPR - 2008

PARÂMETRO	TEMPOS	ESTATÍSTICA	G.L.1	G.L.2	VALOR p
Área do núcleo	Dia 0	0,8251	1	36	0,3697*
	Dia 1	0,0033	1	36	0,9546*
	Dia 7	0,0000	1	36	0,9995*
	Dia 30	4,6803	1	36	0,0372
Área do citoplasma	Dia 0	0,0220	1	36	0,8829*
	Dia 1	3,3902	1	36	0,0738*
	Dia 7	1,7355	1	36	0,1960*
	Dia 30	0,0144	1	36	0,9052*
Relação núcleo/citoplasma	Dia 0	0,7125	1	36	0,4042*
	Dia 1	0,0115	1	36	0,9151*
	Dia 7	2,0908	1	36	0,1568*
	Dia 30	0,2139	1	36	0,6465*

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: * homogeneidade de variância para $p > 0,05$

TABELA 3. ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA AS MEDIDAS: ÁREA DO NÚCLEO, ÁREA DO CITOPLASMA E RELAÇÃO NÚCLEO CITOPLASMA NOS GRUPOS MASSA E ADIÇÃO NOS DIFERENTES TEMPOS, PUCPR - 2008

PARÂMETRO	DIA	MM			MA		
		Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana
Área do núcleo	0	45,963	6,527	45,416	48,022	4,309	49,552
	1	46,012	5,472	44,470	48,422	5,208	48,880
	7	47,485	7,778	47,290	49,320	8,806	49,091
	30	46,718	5,731	46,638	48,515	4,014	48,359
Área do citoplasma	0	1.130,372	241,743	1.158,790	1.215,246	225,721	1.270,386
	1	1.095,296	150,933	1.140,925	1.227,023	262,837	1.176,674
	7	1.151,158	280,280	1.120,901	1.204,977	144,550	1.179,971
	30	1.101,942	203,197	1.073,007	1.175,632	183,405	1.211,613
Relação núcleo/citoplasma	0	0,042	0,006	0,040	0,040	0,006	0,039
	1	0,043	0,008	0,040	0,041	0,007	0,041
	7	0,043	0,010	0,041	0,041	0,006	0,041
	30	0,043	0,007	0,043	0,042	0,006	0,042

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: MM – método de massa / MA – método de adição

TABELA 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIAS COM MEDIDAS REPETIDAS PARA ÁREA DO NÚCLEO, ÁREA DO CITOPLASMA E RELAÇÃO NÚCLEO CITOPLASMA NOS DIFERENTES TEMPOS E MÉTODOS DE MANIPULAÇÃO, PUCPR - 2008

PARÂMETRO	FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	MS	F	VALOR p
Área do núcleo	Método de manipulação	1	155,9	2,034	0,162
	Momento	3	14,6	0,577	0,631
	Momento-manipulação	3	0,8	0,030	0,993
Área do citoplasma	Método de manipulação	1	281225	2,796	0,103
	Momento	3	11559	0,398	0,755
	Momento-manipulação	3	10385	0,357	0,784
Relação núcleo/citoplasma	Método de manipulação	1	0,000097	0,757	0,390
	Momento	3	0,000018	0,752	0,524
	Momento-manipulação	3	0,000002	0,076	0,973

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: Diferença significativa para $p < 0,05$

TABELA 5. PORCENTAGEM DE ESFREGAÇOS COM INFLAMAÇÃO NOS GRUPOS MASSA E ADIÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS, PUCPR - 2008

GRUPO	TEMPO	n	%
MASSA	Dia 0	9	47,4 ^a
	Dia 1	16	84,2 ^b
	Dia 7	16	84,2 ^b
	Dia 30	15	78,9 ^{a,b}
ADIÇÃO	Dia 0	5	26,3 ^a
	Dia 1	16	84,2 ^b
	Dia 7	15	78,9 ^b
	Dia 30	11	57,9 ^{a,b}

FONTE: Dados da Pesquisa

NOTA: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$, através do teste de significância das mudanças de Mc-Nemar

TABELA 6. ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA AS MEDIDAS ÁREA DO NÚCLEO E ÁREA DO CITOPLASMA PARA O SEXO MASCULINO E FEMININO NOS DIFERENTES TEMPOS, PUCPR - 2008

PARÂMETRO	DIA	MASCULINO			FEMININO		
		Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana
Área do núcleo	0	49,04	5,99	46,77	46,44	5,40	46,64
	1	48,48	6,9	46,98	46,87	4,99	46,46
	7	47,75	11,07	43,82	48,57	7,55	48,77
	30	48,23	4,49	48,55	47,45	5,14	47,60
Área do citoplasma	0	1267,29	252,97	1294,39	1147,61	227,35	1161,37
	1	1289,42	270,20	1225,80	1126,95	198,32	1148,65
	7	1230,71	365,70	1101,2	1164,02	171,54	1174,60
	30	1161,71	186,98	1069,32	1132,67	199,15	1179,22

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para AN e AC entre o sexo masculino e feminino (teste U de Mann Whitney).

Gráfico 1. Comparação da área média do núcleo em relação ao método de manipulação nos diferentes tempos

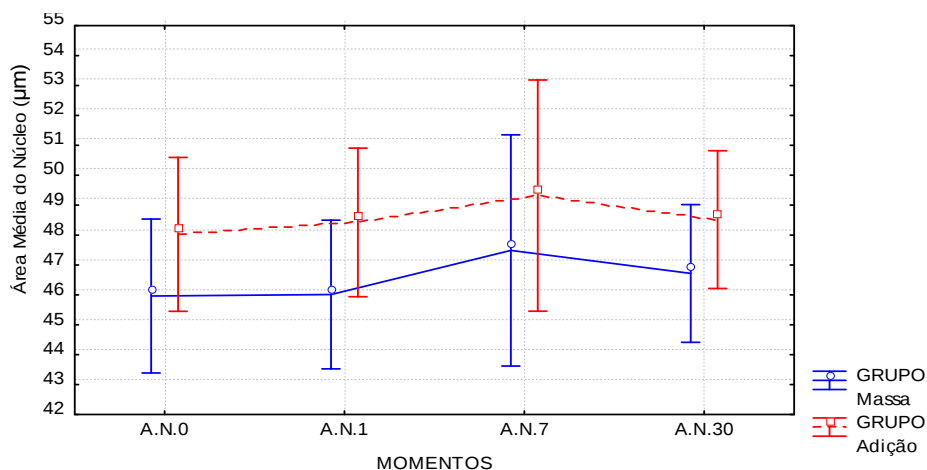


Gráfico 2. Comparação da área média do citoplasma em relação ao método de manipulação nos diferentes tempos

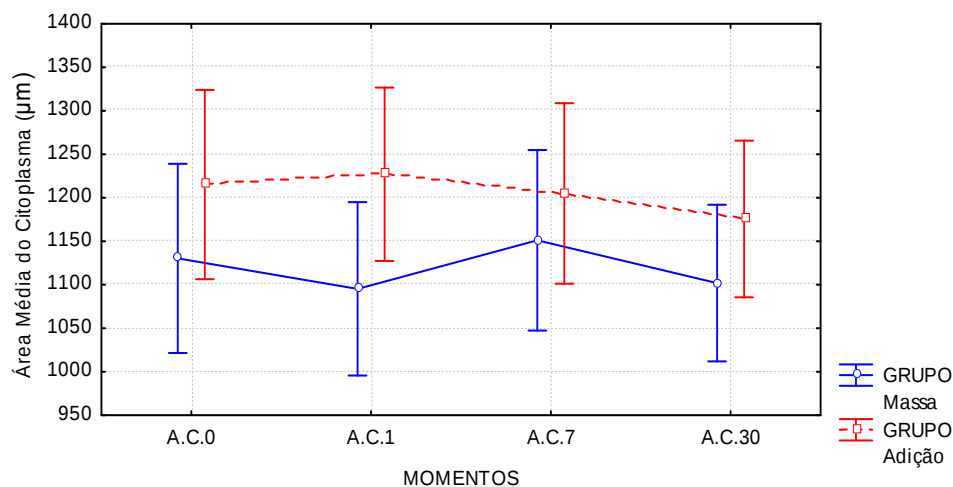
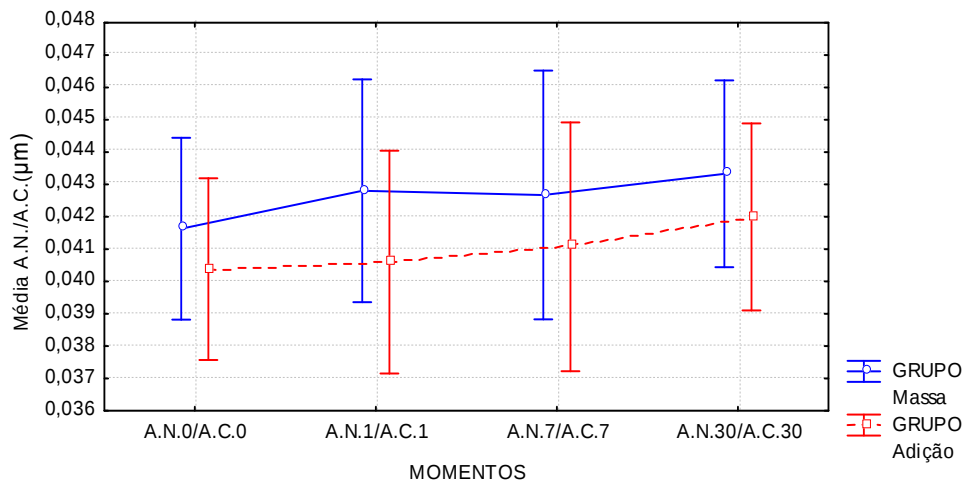


Gráfico 3. Comparação da relação núcleo/citoplasma em relação ao método de manipulação nos diferentes tempos



APÊNDICE III

Instruções de uso do aparelho e agenda de atendimentos

Pesquisador: Taís Cunha

Telefone: 41-8427-1592

- 1)** Utilizar o aparelho durante todo o dia, removendo-o apenas para alimentação e higienização.
- 2)** Quando não estiver utilizando o aparelho, guardar na caixa plástica apropriada.
- 3)** Lavar o aparelho com água e fazer higiene apenas mecânica com escova de dente de cerdas duras.
- 4)** Não realizar bochechos com colutórios bucais.
- 5)** Em caso de dúvida ou qualquer desconforto proveniente do uso do aparelho entrar em contato com a pesquisadora.

Coleta	Data	Horário	Local
Dia 0			
Dia 1			
Dia 7			
Dia 30			

Obrigada por participar da pesquisa. A sua colaboração é fundamental para o êxito do trabalho!!!

APÊNDICE IV

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, RG _____ estou sendo convidado a participar do estudo intitulado: **“Análise *in situ* da biocompatibilidade da resina acrílica autopolimerizável sobre células da mucosa palatina”**.

Caso aceite participar desta pesquisa, o indivíduo deverá utilizar um aparelho removível de resina acrílica autopolimerizável por trinta dias.

Células da mucosa palatina serão coletadas com escova apropriada antes da colocação do aparelho removível, 1 dia, 7 dias e 30 dias após a instalação. Este exame é indolor e não requer cuidados especiais (jejum, dieta específica, entre outros).

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

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

Quanto aos riscos, eles são mínimos e referem-se, principalmente, ao aumento do acúmulo de placa dentária em função do uso do aparelho, assim como a possibilidade de reação alérgica ao acrílico. No entanto, é importante ressaltar que o tratamento ortodôntico com este material é realizado normalmente nos consultórios ortodônticos, e o seu uso perdura por mais de meio século. Na improvável hipótese de ocorrerem prejuízos à saúde decorrente do uso da placa acrílica, estes serão de responsabilidade do pesquisador.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo são: o Prof. Dr. Odilon Guariza Filho e a pós-graduanda Taís de Moraes Alves da Cunha do Mestrado de Odontologia - Área de Concentração em Ortodontia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. A qualquer momento os pesquisadores poderão ser contatados pelos telefones (41)3271-1637 e (41)8427-1592.

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.

Curitiba, ____ de _____ de 2008.

Assinatura do responsável pelo sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador

4. ANEXOS

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética



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

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0001337/08**Protocolo CEP Nº **2169**

Título do projeto **análise in situ da biocompatibilidade da resina acrílica
autopolimerizável sobre células da mucosa palatina**

Grupo **III**Versão **2**Protocolo CONEP **0434.0.084.000**Pesquisador responsável **Tais de Moraes Alves da Cunha**

Instituição

Objetivos

2.1. Analisar as alterações morfológicas no núcleo e/ou no citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.2. Analisar a alteração morfolométrica na área do núcleo e/ou do citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.3. Analisar as alterações na relação núcleo-citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.4. Avaliar a influência de diferentes tipos de manipulação e polimento da resina acrílica para confecção de aparelhos ortodônticos removíveis na indução de alterações celulares na mucosa palatina.
2.5. Avaliar a influência do tempo de contato do aparelho removível de resina acrílica com a mucosa palatina e o aparecimento de alterações celulares.

2.1. Analisar as alterações morfológicas no núcleo e/ou no citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.2. Analisar a alteração morfolométrica na área do núcleo e/ou do citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.3. Analisar as alterações na relação núcleo-citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.4. Avaliar a influência de diferentes tipos de manipulação e polimento da resina acrílica para confecção de aparelhos ortodônticos removíveis na indução de alterações celulares na mucosa palatina.
2.5. Avaliar a influência do tempo de contato do aparelho removível de resina acrílica com a mucosa palatina e o aparecimento de alterações celulares.
2.1. Analisar as alterações morfológicas no núcleo e/ou no citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.2. Analisar a alteração morfolométrica na área do núcleo e/ou do citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.3. Analisar as alterações na relação núcleo-citoplasma das células da mucosa palatina após contato com a resina acrílica autopolimerizável,
2.4. Avaliar a influência de diferentes tipos de manipulação e polimento da resina acrílica para confecção de aparelhos ortodônticos removíveis na indução de alterações celulares na mucosa palatina.
2.5. Avaliar a influência do tempo de contato do aparelho removível de resina acrílica com a mucosa palatina e o aparecimento de alterações celulares.

Parecer Nº **0001337/08**

Protocolo CEP Nº **2169**

Título do projeto **análise in situ da biocompatibilidade da resina acrílica autopolimerizável sobre células da mucosa palatina**

Grupo **III**

Versão **2**

Protocolo CONEP **0434.0.084.000**

Pesquisador responsável **Tais de Moraes Alves da Cunha**

Instituição

Comentários

Objetivos adequados.

Considerações

A metodologia e os objetivos estão adequados.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Correto.

Conclusões

O projeto pode ser aprovado.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **05/03/2008**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 05 de Março de 2008.



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

ANEXO II

Normas para Publicação – Journal of Dental Research

Instructions to Contributors

GENERAL POLICY

Submitted manuscripts must be written clearly and concisely in English and represent unpublished original research that is not being considered for publication elsewhere. The *Journal* seeks to publish (i) concise definitive reports of wide interest to the research community and (ii) topical, concise reviews of the state of the art. Concise definitive reports of findings of unusual significance can be reviewed as (iii) Rapid Communications. Criteria for the acceptance of Rapid Communications will be more stringent than those for regular papers. Authors should request review for Rapid Communications in the cover letter to the Editor. The *Journal* also welcomes (iv) essays that explore seminal events and creative advances in the development of dental research for publication in the "Discovery!" column.

Reports of observations and the development of new methods or techniques may be considered for publication if they are of broad and fundamental interest, but the focus of the *Journal* is on definitive reports demonstrating cause-and-effect relationships. Submission of case reports is generally discouraged.

Letters to the Editor must include evidence to support a position about the scientific or editorial content of the *Journal* and are limited to 250 words. Guest Editorials describe a clear and substantiated position on issues of interest to the community and are also encouraged. These are limited to 1000 words. As appropriate, a brief response to Letters or Guest Editorials will be solicited for concurrent publication. Conference Reports will be considered for publication only if they are topical and brief, highlighting important new data or findings. Final approval for publication rests with the Editor.

Authors considering submitting a Conference Report should first consult the Editor regarding the suitability of the report. Such reports should: (a) be of broad and international interest to the readership of the *JDR*; (b) include the specific aims of the meeting, the pertinent information provided by the speakers (i.e., summary of a few sentences from each talk), then the specific conclusions; and (c) meet the same word limits and figure/table numbers as a regular research report. An abstract is not required. Priority for publication would depend on our publishing schedule for regular research reports, which generally carry higher priority.

Submitted manuscripts must be accompanied by a cover letter with the signatures of all authors certifying that the research is (i) original, (ii) not presently under consideration for publication elsewhere, (iii) free of conflict of interest (e.g., edited by the funding agency or organization), and (iv) conducted by the highest principles of human subject and animal welfare. In the cover letter, contributors should nominate four expert, independent scientific referees and include their names, mailing addresses, telephone/FAX numbers, e-mail addresses, and area of expertise. It is highly encouraged that referees be nominated to avoid delays in the review process. Nominated scientific referees may not be colleagues at the contributors' institutions or present or former collaborators. The receipt of all manuscripts will be acknowledged. The contributors will be notified subsequently by the Editor of (1) acceptance, (2) need for revisions, or (3) rejection.

Also include a list of total words (from Abstract to Acknowledgments), number of words in Abstract, total number of tables and/or figures, and number of references.

All rights in manuscripts shall be transferred to the *Journal of Dental Research* upon submission. Submission of a manuscript shall constitute each author's agreement that the *Journal of Dental Research* holds all proprietary rights in the manuscript submitted, including all copyrights. On acceptance and before publication of a paper, contributors will be asked to sign a formal transfer of copyright.

For clarity, please use only common abbreviations, which will be widely recognized by the more general reader of the *Journal*. A list of all abbreviations used should be provided on the manuscript cover page.

RESEARCH REPORTS

(All submissions must adhere to the following criteria.) These will be limited to a maximum of 2500 words (including abstract, introduction, materials & methods, results, discussion, and acknowledgments, but excluding the reference list and figure legends), an abstract containing a maximum of 150 words, a maximum of 35 references, and a combined total of 4 tables/figures. Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication online only. The appendix must be submitted with the manuscript for review. Research Reports will be published in three categories:

- Clinical
- Biomaterials & Bioengineering
- Biological

CONCISE REVIEWS

With the addition of content from the journal *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, the 'Concise Review' category in *JDR* will be discontinued, and manuscripts for Concise Reviews will no longer be considered.

CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE

Critical Reviews in Oral Biology & Medicine manuscripts cannot be submitted online. Authors must contact the *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* editor, Dr. Dana Graves, at dgraves@iadr.org for submission instructions.

The manuscript should briefly summarize information that is well known and emphasize recent developments over the last three years. This will help focus the manuscript on cutting edge research. Please stress critical issues and concepts that would add excitement to the article. In addition, visual elements should be added to make the manuscript as "approachable" as possible. The manuscript should follow the following guidelines:

- It is important to include several illustrations or diagrams to enhance clarity. Manuscripts that lack figures or diagrams typically receive a low priority score. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors and are approximately \$1000 per figure. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the on-line version of *JDR* with no extra charges.
- Summarize important concepts in tables or flow charts or show critical data in the form of figures. Please note that you will need to obtain permission to reproduce a previously published figure or table.
- The length of the article with references and tables/figures should be approximately 35-40 double spaced, 8 X 11 inch typed pages with a 12 font size. The page limitation is enforced by the Journal. In addition, there should be as few abbreviations as possible. Due to the broad readership abbreviations commonly recognized in one field may not be readily apparent to those in a different field.
- The cover page, abstract (~200 words), text, summary, figure legends and tables should be combined into a single Word document and the Figures sent as a PDF file containing all figures. If the on-line version is to be in color and the printed version in B&W please submit separate PDF files for B&W and color figures. Note that the figures in both PDF files should be identical except that the B&W is in grayscale.
- Examples of recent review articles in *JDR* may be found at the following links:
<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/86/9/800>
<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/85/7/584>

DISCOVERY! ESSAYS

Readers are encouraged to submit *Discovery!* essays/articles that they feel will be of interest to the *JDR* readership. Authors are welcome to submit manuscripts for consideration directly to the *Discovery!* editor, Dr. Marty Taubman, at mtaubman@forsyth.org, or by mail to Dr. Marty Taubman, c/o The Forsyth Institute, 140 The Fenway, Boston, MA 02115, USA. *Discovery!* manuscripts cannot be submitted online. *Discovery!* manuscripts will be limited to 2500 words and two tables or figures.

MANUSCRIPTS

Prepare manuscript, tables, legends, and footnotes as double-spaced text (a minimum of 6 mm between lines) formatted for 8-1/2 x 11-inch paper. Top, bottom, and side margins should be one inch, with no indented paragraphs. Figures and tables should not exceed 8-1/2 x 11 inches. Both Macintosh (FrameMaker, MacWrite, Word, WordPerfect, Works WP, or WriteNow) and IBM PC (DCA-RFT, FrameMaker, MultiMate, Office Writer, Text, Word for Windows, WordPerfect, WordStar, Works WP, or XYWrite) files will be accepted. Manuscripts should be "clean", i.e., free of tabs and codes. Bold and italic type should appear exactly as they will appear on the printed page. Italicize items that will appear in italics; this will include the genus and species of an organism, *g* (for gravitational force), Latin words and abbreviations (for example, e.g., i.e., *in vitro*, *in vivo*, et al.), and journal names in the References section. Tabs should be used to separate columns within tables. **Do not use elaborate table formatting.**

Use a standard font such as Times New Roman or Arial to avoid misrepresentation of your data on different computers that do not have the unusual or foreign language fonts.

Title and Section Headings

Bold type should be used for the title on page 1. Use upper- and lower-case letters. First-level headings, which include ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS & METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGMENTS, and REFERENCES should be bold type, all upper-case letters, as shown. Second-level subheads should be bold type, upper- and lower-case. Third-level subheads should be bold type, upper- and lower-case, with a paragraph indent. Any lower-ranked subheads should be italicized, and in upper- and lower-case. Please type no more than 10 characters per inch. Authors are reminded to include their complete mailing addresses, telephone, FAX, and e-mail addresses, as available. Copies of "in press" and "submitted" manuscripts that will provide essential information for the referees should also be enclosed.

A Few Words About Style

Authors should remember that they are writing to communicate to often-uninformed readers. Here are a few suggestions: Show a clear chronological progression and logic to the development of your ideas throughout the manuscript and within paragraphs and sentences. Speak to the reader in a direct and straightforward voice. Tell the reader your purpose, then provide background, data, and conclusions. You will make your point most effectively by illustrating with a well-chosen example, rather than providing an encyclopedic discourse. In each paragraph and sentence, stick to the subject. For example, if the subject is "biophysical properties", don't write sentences in that paragraph that change the subject to the names of cited contributors. Each sentence should contain only one thought. Write short and simple sentences. Choose the best word so that you say what you mean. To make your information accessible to the widest possible audience, avoid jargon, acronyms, and needless words. Before submission, contributors must review their manuscripts with (i) computer grammar and spelling tools/filters and (ii) a colleague who is expert in English language grammar and syntax. Manuscripts may be returned without review or rejected on the basis of poor English or accepted standards of style. Check to ensure that all listed references, figures, and tables are cited in the text and that all cited references, figures, and tables are presented in appropriate sections. The Editor reserves the right to make changes to improve the clarity of the text. All such changes will be subject to contributors' approval before publication.

Revised Manuscripts

All revisions must be accompanied by a cover letter signed by all authors to the Editor. The letter must (i) detail on a point-by-point basis the contributors' disposition of each of the referees' comments, and (ii) certify that all contributors approve of the revised content and that the manuscript complies with stipulations 'i' through 'iv' in "General Policy". Responses to separate reviewers should be on separate pages. Also include a copy of the revision with all changes highlighted.

RANDOMIZED CLINICAL TRIALS

Effective January 2004, manuscripts reporting a randomized clinical trial should follow the CONSORT guidelines as published in the *Annals of Internal Medicine* (Ann Int Med 134:657-662,

2001). Click [here](#) to download the checklist. This completed checklist file should be uploaded as Supplemental Material.

The *Journal* encourages authors to register their clinical trials in a public trials registry, and we ask authors of manuscripts describing such studies to submit the name of the registry and the study registration number prior to publication. The International Committee of Medical Journal Editors plans to consider clinical trials for publication only if they have been registered (see *N Engl J Med* 2004;351:1250-1 - <http://content.nejm.org/cgi/content/full/351/12/1250>). The following registries meet these requirements: <http://prsinfo.clinicaltrials.gov> and <http://controlled-trials.com/isrctn/submission/>.

GENE DATA

Prior to submission, the *Journal* asks that novel gene sequences be deposited in a public database (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html>, EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>, or DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/sub-e.html>), and the accession number provided to the JDR. Manuscript submissions including microarray data should (a) include the information recommended by the MIAME <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html> guidelines in their submission, and/or (b) identify the submission details for the experimental details to one of the publicly available databases (ArrayExpress <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> or GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

MANUSCRIPT COMPONENTS

The components of a manuscript should be: 1) title page, 2) abstract, 3) introduction, 4) materials and methods, 5) results, 6) discussion, 7) acknowledgments, 8) references, 9) tables, and 10) figure legends. The complete manuscript should be arranged in that order. Number all pages consecutively in the top right-hand corner, including the title page. Label figures clearly. Each figure label must indicate the number corresponding to the citation in the text, an arrow indicating the top, and contributors' abbreviated names.

1) Title Page (page 1)

Type in bold type with only the first letters of the main words capitalized. The title should be brief (not to exceed 60 characters) and illustrative of the key finding. Also type the contributors' initials and last names in upper- and lower-case letters. Use superscript numbers to relate contributors to different departments or institutions, or to indicate a change in address. For the corresponding author who will receive reprint requests, provide the full postal (including ZIP or Postal Code) and e-mail addresses, telephone and FAX numbers, as available. If the corresponding author is not the first author, indicate by a number superscript, and use the phrase "corresponding author", and that individual's e-mail address. The following information must be included on the cover page: 1) a short title (running head) of up to 45 characters; 2) three to five key words; 3) the number of words in the abstract; 4) the number of words in the abstract and the text (excluding tables, figure legends, acknowledgments, and cited references); 5) the number of tables and figures; and 6) the number of cited references. If applicable, include source footnotes on page 1 to indicate prior preliminary publication. For example, state that the work was "Based on a thesis submitted to the graduate faculty, Azimuth University, in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree" or that a preliminary report was presented at, or published in... Report all sources of funding in a later section, "Acknowledgments".

2) Abstract (page 2)

A self-standing summary of the text, this section should not exceed one typed page (about 150 words). Concisely describe the (i) background and rationale, (ii) hypothesis or study objective, (iii) design and key methods, (iv) essential results, and (v) conclusions. Avoid abbreviations. The abstract will be re-published separately by information retrieval services.

3) Introduction (page 3)

Briefly and clearly describe the background and rationale for the stated hypothesis to be tested or objective to be studied. Sufficient detail must be provided to permit the interdisciplinary reader to evaluate the results without review of earlier publications. Describe and cite only the most

relevant earlier studies; avoid presentation of an exhaustive review of the field. Do not include a summary of the results presented in the manuscript.

4)Materials & Methods

To provide sufficient technical information so that the experiments can be repeated, the (i) experimental or study design, (ii) specific procedures, and (iii) type of statistical analysis must be described clearly and carefully. Use section subheadings in a logical order to title each category or method. Previously published methods should be named (e.g., "ultrasonic treatment" rather than mention of the cited contributors' names) and cited. New methods must be described completely. Present the data that validate the new method. A method used for only part of one experiment may be described briefly in the "Results" section, table footnote, or figure legend. Present descriptive information about large numbers of experimental reagents, microbes, test materials, primer sequences, in tabular form with a brief explanation in the text. Proprietary names and sources of supply of all commercial products must be given in parentheses in the text (name and model of product, company, city, and state or country). Report generic names and terms wherever possible. For protocols involving the use of human subjects or specimens, indicate succinctly that subjects' rights have been protected by an appropriate institutional review board and informed consent was granted. When laboratory animals are used, indicate the level of institutional review and assurance that the protocol ensures humane practices.

5)Results

This section serves only to introduce data in the (i) text, (ii) tables, and (iii) figures and to call attention to their significant parts. Report results concisely, using tables and figures to present important differences or similarities that cannot otherwise be presented or summarized in the text. The rationale and design of experiments should be made clear in the previous sections of the manuscript. Reserve subjective comments, interpretation, or reference to the previous literature for the "DISCUSSION". Number tables and figures in the order in which they are described and cited in the text. All tabular data should identify and report (i) either standard deviation values or standard errors of the means, (ii) the number of replicate determinations or human or animal subjects, and (iii) probability values and name(s) of statistical test(s) for reported differences. Restrict presentation of photo- and electron micrographs to those essential to the results. If essential to the results, color can be published at the discretion of the Editor. (The cost for color in reprints, however, must be borne by the author. For cost estimates, contact the Central Office at 703-548-0066, or FAX 703-548-1883, e-mail publications@iadr.org.)

6)Discussion

Explain and interpret the results with a scientifically critical view of the previously published work in the field. Highlight the advances made by the new data. Indicate the limitations of the findings. State the conclusions of the report, and explain why they are merited by the data. This is the only proper section for subjective comments.

7)Acknowledgments

Recognize individuals who provided assistance to the project. Report all sources of grant and other support for the project or study, including funds received from contributors' institutions and commercial sources, and do not refer to a study being only partially funded by the cited sources. Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed, with statements such as "This investigation was supported in part by USPHS Research Grant DE-0000-00 from the National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892".

8)References (maximum, 35)

This section will list all sources cited in the paper. Arrange the citations in alphabetical order by last name of the first author without numbering. When citing a reference in the text, provide attribution for the subject under discussion. For example, "Cold fusion has been difficult to replicate (Williams and Jones, 1988), but some recent modifications in experimental design (Jones et al., 1989) continue to stimulate new investigation." Avoid "Jones et al. (1989) found..."

or "In a recent study, Jones (1990) found...", which creates vague statements because the subject is shifted from "cold fusion" to the names of the cited contributors. Use "et al." (in italics) when the cited work is by three or more contributors. When the cited work is by two contributors, use both surnames separated by "and". When citing multiple references by the same author(s) in the same year, use "a", "b", etc. (e.g., Jones, 1980b). Multiple references should be listed in chronological order of publication, separated by semi-colons. "Unpublished observations" and "personal communications" may be inserted into and cited (in parentheses) in the text with written permission from the correspondents, but are not to be used as references. Abbreviate journal names according to the style used in Index Medicus. Other titles should be formatted with slight modifications of the style used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. Examples of reference citation formats are illustrated below. Avoid using abstracts as references. Data from abstracts should be referenced as "personal communication" or "unpublished observations" as appropriate. When citing a Web site, list the authors and title if known, then the URL and the date it was accessed (in parentheses). Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add "(in press)". Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as "unpublished observations" (in parentheses). The references must be verified by the author(s) against the original documents and checked for correspondence between references cited in the text and listed in the "References" section.

Examples of correct forms of references are listed below. They are single-spaced here for illustration but should be double-spaced in the manuscript.

ARTICLES IN JOURNALS

1. Standard journal article

(List all authors, but if the number exceeds six, give six authors' names followed by *et al.*) West DJ, Snavelly DB, Zajac BA, Brown GW, Babb CJ (1990). Development and persistence of antibody in a high-risk institutionalized population given plasma-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* 8:111-114.

2. Organization as author

The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team (1977). Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 2:742-744.

3. No author given Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial) (1981). *Br Med J* 283:628.

4. Article in a foreign language

Massone L, Borghi S, Pestarino A, Picini R, Gambini C (1987). Localisations palmaires purpuriques de la dermatite herpétiforme. *Ann Dermatol Veneréol* 114:1545-1547.

5. Volume with supplement

Magni F, Rossoni G, Berti F (1988). BN-52021 protects guinea pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 20(Suppl 5):75-78.

6. Issue with supplement

Gardos G, Cole JO, Haskell D, Marby D, Paine SS, Moore P (1988). The natural history of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 8(4 Suppl):31S-37S.

7. Volume with part

Hanly C (1988). Metaphysics and innateness: a psychoanalytic perspective. *Int J Psychoanal* 69(Pt 3):389-399.

8. Issue with part

Edwards L, Meyskens F, Levine N (1989). Effect of oral isotretinoin on dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 20(2 Pt 1):257-260.

9. Issue with no volume

Baumeister AA (1978). Origins and control of stereotyped movements. *Monogr Am Assoc Ment Defic* (3):353-384.

10. No issue or volume

Danoek K (1982). Skiing in and through the history of medicine. *Nord Medicinhist Arsb*:86-100.

11. Pagination in Roman numerals

Ronne Y (1989). Ansvarsfall. Blodtransfusion till fel patient. *Vardfacket* 13:XXVI-XXVII.

12. Type of article indicated as needed

Spargo PM, Manners JM (1989). DDAVP and open heart surgery (letter). *Anaesthesia* 44:363-364. Fuhrman SA, Joiner KA (1987). Binding of the third component of complement C3 by *Toxoplasma gondii* (abstract). *Clin Res* 35:475A.

13. Article containing retraction

Shishido A (1980). Retraction notice: Effect of platinum compounds on murine lymphocyte mitogenesis (Retraction of Alsabti EA, Ghalib ON, Salem MH. In: *Jpn J Med Sci Biol* 1979; 32:53-65). *Jpn J Med Sci Biol* 33:235-237.

14. Article retracted

Alsabti EA, Ghalib ON, Salem MH (1979). Effect of platinum compounds on murine lymphocyte mitogenesis (Retracted by Shishido A. In: *Jpn J Med Sci Biol* 33:235-237, 1980). *Jpn J Med Sci Biol* 32:53-65.

15. Article containing comment

Piccoli A, Bossatti A (1989). Early steroid therapy in IgA neuropathy: still an open question (comment). *Nephron* 51:289-291. Comment on: *Nephron* 51:289-291, 1989.

16. Article commented on

Kobayashi Y, Fujii K, Hiki Y, Tatenos S, Kurokawa A, Kamiyama M (1988). Steroid therapy in IgA nephropathy: a retrospective study in heavy proteinuric cases (see comments). *Nephron* 48:12-17. Comment in: *Nephron* 51:289-291, 1989.

17. Article with published erratum
Schofield A (1988). The CAGE questionnaire and psychological health (published erratum appears in *Br J Addict* 84:701, 1989). *Br J Addict* 83:761-764.

BOOKS AND OTHER MONOGRAPHS

18. Authored

Colson JH, Armour WJ (1986). Sports injuries and their treatment. 2nd rev. ed. London: Butterworth Heinemann.

19. Editor(s), compiler as author

Diener HC, Wilkinson M, editors (1988). Drug-induced headache. New York: Springer-Verlag.

20. Organization as author and publisher

Virginia Law Foundation (1987). The medical and legal implications of AIDS. Charlottesville, VA: The Foundation.

21. Chapters in a book

Weinstein L, Swartz MN (1974). Pathologic properties of invading microorganisms. In: Pathologic physiology: mechanisms of disease. Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. Philadelphia: Saunders, pp. 457-472.

22. Conference Proceedings

Vivian VL, editor (1985). Child abuse and neglect: a medical community response. Proceedings of the First AMA National Conference on Child Abuse and Neglect, Mar 30-31, 1984, Chicago. Chicago, IL: American Medical Association.

23. Conference Paper

Harley NH (1985). Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium, Oct 29-31, 1984, Knoxville, TN. Gammage RB, Kaye SV, editors. Chelsea, MI: Lewis Publishers, pp. 69-78.

24. Scientific and technical report

Akutsu T (1974). Total heart replacement device. Apr. Report No.: NIH-NHLI-69-2185-4. Bethesda, MD: National Heart and Lung Institute of the National Institutes of Health.

25. Dissertation

Youssef NM (1988). School adjustment of children with congenital heart disease (dissertation). Pittsburgh, PA: Univ. of Pittsburgh.

26. Patent

Harred JF, Knight AR, McIntyre JS, inventors (1972). Dow Chemical Company, assignee. Epoxidation process. US patent 3,654,317. Apr 4.

UNPUBLISHED MATERIAL

35. In press

Lillywhite HB, Donald JA (1993). Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. *Science* (in press).

9) Tables and 10) Figures (maximum, four total)

9) Tables

Type one table per page. In the order of mention in the text, number each table consecutively with Arabic numerals in the heading. In the heading, follow the table number with a brief descriptive title, generally highlighting the key result. Design tables to highlight key results and comparisons. Make every effort to make the presentation of data clear, simple, and uncluttered. As column headings, use accurate descriptors instead of symbols, acronyms, and abbreviations. To avoid overlong titles and cumbersome tables, use explanatory footnotes whenever possible. In the table or title, indicate the order of footnotes with superscript a,b,c,d,e,f, ... If needed in footnotes, cite the short form of references in parentheses. In tabular columns and the text, decimals less than unity must have the decimal point preceded by a zero. To ensure that the presentation is clear, report only the number of significant digits appropriate to the sensitivity and discrimination of the measure and the differences to be illustrated. Column headings should be simple and clear so that tables will be understandable without consultation of the text. Generally, column headings identify dependent variables, while independent variables are identified by row descriptors on the left. Tables will usually be printed either 3-1/4 or 7 inches wide.

10) Figures

Figures are illustrative materials, including photomicrographs, radiographs, charts, and graphs. When possible, an electronic copy of the figure should be provided on a diskette with the text of the manuscript. Digitized figures must be certified by the contributors to be an accurate representation of the original data and not electronically edited. Figures must be discussed thoroughly in the text. Black-and-white photographic prints, laser-quality reproductions, and original drawings on opaque white paper are preferred. Color reproductions will be published free at the discretion of the Editor. Authors wishing to pay to publish color figures should contact the Publications Department at the Central Office, at 703-548-0066, e-mail publications@iadr.org. Prices are listed on the Page Charge/Reprint Order Form. An original and two copies of each figure must be submitted. Each set should be placed in a protective folder, one labeled "for printer" and the other two "for review". On the back of each figure, oriented upright, label with contributors' names and figure number (and letter) in sequence corresponding to its mention in the text. Figures will generally be printed column-width, 1-1/2 columns' width, or page-width. Extraneous material should be cropped out to ensure minimal reduction. If crop marks are necessary, do not place them directly on the figure. Mount the figure on a sheet of paper and place the crop marks on the paper. Photomicrographs must include a scale of the form [____], clearly labeled with a convenient unit of length, e.g., 50 μ m. Graphs should be labeled briefly and clearly at the abscissa and ordinate, including the units of measure. All figures must be labeled to allow for easy readability and visualization if reduced by 50% or more. If possible, determine the percentage reduction at which the figure will be reproduced (e.g., 3-1/4 or 7 inches wide). Print a copy at that percentage to see how all elements will be affected. Consider that any line or rule thinner than 1/2 point may not reproduce. Patterns used in bar charts can become illegible, thus rendering useless any keys provided for graphs. Ideally, all figures should be provided at the optimum size for publication. The title and other identification may appear in the legend.

Legends

Legends for all figures, including charts and graphs, must be typed together on a separate page and should be understandable without reference to the text. Include a title highlighting the key result and a key for any symbols or abbreviations used in the figure.

AUTHORITATIVE REFERENCES

The Random House Dictionary of the English Language (Unabridged) will be used as the authority for spelling of non-medical terms. Where two plural forms are provided, the American

English form will be used. For anatomical nomenclature, *Nomina Anatomica* (5th ed.) and *Dorland's Illustrated Dictionary* will be considered authoritative.

NOMENCLATURE

Authors should refer to the International System of Units (SI), D.T. Goldman and R.J. Bell, Eds., NBS Special Publication 330 (1981). This booklet is available from the US Dept. of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Washington, DC 20234. Use of correct symbols includes m for milli-, μ for micro-, and L for liter (as in mL, L, etc.). Express grams as g, hours as hr, seconds as sec, and centrifugal force as g (e.g., 10,000 g). Use nm rather than Angstroms. Concentrations should be expressed as mol/L or mmol/L, etc. Insert leading zeros in all numbers less than 1.0 in the text, tables, and figures. Numbers of ten and fewer should be written out (e.g., ten subjects), except when indicating inanimate quantities (e.g., 10 mL), and numbers that are greater than ten should appear as digits. Always use digits to express dates, dimensions, degrees, doses, periods of time, percentages, proportions, ratios, sums of money, statistical results, weights, and measures, or to enumerate animals (but not people), culture cells and organisms, organs, and teeth. Leave a space between numbers and their accompanying units (e.g., 10 mg, not 10mg), and around the = and signs. Micro-organisms should be referred to in accordance with the International Rules of Nomenclature. When applicable, the nomenclature for bacteria presented in *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* (current edition) will be followed. The first reference to an organism by genus and species must be in full (e.g., *Lactobacillus casei*); subsequent mention may abbreviate genus (*L. casei*). When a common name of a bacterium or group is mentioned, do not italicize (e.g., "some lactobacilli" or "sanguis group streptococci").

Authors of papers containing primary nucleotide sequencing data are expected to deposit this information in an appropriate database (e.g., GenBank/EMBL). Pertinent accession numbers should be provided with the submitted manuscript. Published articles will include a footnote indicating the accession number and database in which the information was deposited. For examples of format not specified here, contributors should consult the Council of Biology Editors Style Manual (current edition) and current issues of the Journal. The complete names of individual teeth must be given in full in the text of articles (e.g., "permanent upper right first premolar"). In Tables, these names may be abbreviated by Viohl's Two-digit System. As approved by the International Standards Organization, the first digit indicates the quadrant and the second digit the type of tooth within the quadrant. Starting at the upper right side and rotating clockwise, quadrants are assigned the digits 1 to 4 for the permanent and 5 to 8 for the deciduous teeth; within the same quadrant, teeth from the midline backward are assigned the digits 1 to 8 (deciduous teeth, 1 to 5). For example, the permanent lower right first molar is designated '46' and the deciduous upper left canine, '63'.