

**MÔNICA NACAO**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PERIODONTOPATÓGENOS  
NA SUPERFÍCIE DE MINIPARAFUSOS ORTODÔNTICOS  
POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
VARREDURA (MEV) E DA TÉCNICA DE REAÇÃO  
EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

São Paulo

2009

**Mônica Nacao**

**Avaliação da presença de periodontopatógenos na superfície  
de miniparafusos ortodônticos por meio de microscopia  
eletrônica de varredura (MEV) e da técnica de  
reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de concentração: Ortodontia

Orientador: Prof. Dr. André Tortamano

São Paulo

2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nacao M. Avaliação da presença de periodontopatógenos na superfície de miniparafusos ortodônticos por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Jorge e Elisa**, pelo amor, maior fonte de inspiração para concretizarmos nossos sonhos, pelo exemplo de determinação, perseverança e trabalho, e pelos valores agregados em minha formação pessoal e profissional. Obrigada por tudo.*

*Aos meus irmãos, **Denise, Jorge Henrique, Adriana e Annelise**, por tudo que já vivemos unidos pelo amor.*

*Ao **Fábio de Abreu Vigorito**, por estar sempre ao meu lado com todo o seu respeito, por todo seu amor e carinho, por compartilhar e me apoiar em meus sonhos. Sua presença em minha vida é muito importante.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao Professor Doutor **André Tortamano**, pela amizade, por todas as orientações, incentivos e oportunidades. Agradeço a credibilidade para explorar um universo novo na ciência, a seriedade, disposição e dedicação para conduzir os meus trabalhos científicos.*

*Ao Professor Doutor **Fabio Daumas Nunes**, por acreditar e apoiar minha proposta de pesquisa, trabalho inexplorado até o presente momento, por me incentivar no desenvolvimento no campo da ciência e pelo aprendizado incessante e diário no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, de sua responsabilidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo, a Deus, por sua presença e pelas pessoas que colocou em minha vida, pela esperança, coragem, paciência e amor para realizar este trabalho acadêmico original e laborioso.

Ao Professor Doutor Júlio Wilson Vigorito, pela amizade, carinho, apoio, orientações e oportunidades oferecidas para meu aprimoramento.

Ao Professor Doutor João Batista de Paiva, pelo apoio no meu aprimoramento clínico e científico e pelas oportunidades para o meu desenvolvimento em trabalhos científicos.

À Professora Doutora Gladys Cristina Domínguez Morea, pela amizade e oportunidades, que muito contribuíram para minha evolução profissional e pessoal. Agradeço mais uma vez por este mergulho na ciência da Ortodontia e por aprender a lidar com as novas respostas deste universo científico.

Aos Professores Doutores do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da USP, Prof. Dr. André Tortamano, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gladys Cristina Domínguez Morea, Prof. Dr. João Batista de Paiva, Prof. Dr. Jorge Abrão, Prof. Dr. José Rino Neto, Prof. Dr. Júlio Wilson Vigorito, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Mongelli de Fantini, pelos ensinamentos transmitidos com competência, dedicação e pelo desenvolvimento do espírito crítico e científico durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Camillo Morea, professor de periodontia, pela amizade, apoio e incentivo em meu aprimoramento.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, responsável pelo Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados do ICB-USP, bem como a Fernanda Barrence e Gerson Batista da Silva (*in memoriam*) técnicos do ICB-USP, por toda contribuição na microscopia eletrônica de varredura.

Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, responsável pelo Laboratório de Anaeróbios do ICB-USP, pelo apoio, orientações e pelas amostras de cultura de bactérias do controle positivo deste trabalho.

Prof. Dr. Bruno König Junior, professor aposentado do Departamento de Anatomia do ICB-USP, pelo auxílio na análise dos resultados da microscopia eletrônica de varredura.

Ao Toni Ricardo Eugênio dos Santos, mestre em economia pela FEA-USP e Analista do Banco Central do Brasil, pela amizade, elaboração, tabulação e análise dos dados estatísticos.

Ao Prof. Fabio Nicolau Ferreira, professor de português, pelas correções deste manuscrito.

Ao Dr. Fernando Pereira, chefe do Ambulatório de Odontologia do Hospital Regional Sul da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, e aos meus colegas de trabalho deste hospital, Ana Célia Rezende Corrêa, Carlos Eduardo de Mattos Souza, Dalva Cristina Teixeira de Araújo, José Real Junior, Marcia Maria Kiefer, Milton Maluly Filho, Roseli Okamoto Kobayashi, Rute Iannone Macari, pela compreensão e colaboração para que eu pudesse cumprir com os meus deveres às segundas-feiras e aos sábados durante o início do curso de mestrado.

Aos meus colegas de pós-graduação do departamento de Ortodontia, André Felipe Abrão, Gustavo Adolfo Watanabe-Kanno, Hiroshi Miasiro Junior, Miguel Ferragut Attizzani, Belini Augusto Villalba Freire-Maia, Gilberto Vilanova Queiroz, Klaus Barreto dos Santos Lopes Batista, Luciana Flaquer Martins, Ricardo Fidos Horliana, Alael Barreiro Fernandes de Paiva Lino, Cristiane Aparecida de Assis Claro, José Hermenegildo dos Santos Junior, Silvia Augusta Braga Reis, Vilmar Antonio Ferrazo, pelos momentos vividos e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas de pós-graduação do departamento de Patologia, Camila de Oliveira Rodini, Fábio Luiz Coracin, Flávia Caló de Aquino Xavier, Katiúcia Batista da Silva Paiva, Tatiana Nayara Libório dos Santos, Thaís Acquafreda Antunes, Fernanda Amorim, pelo convívio e apoio científico, com destaque especial a Katiúcia Batista da Silva Paiva, pelas incansáveis horas de dedicação para me auxiliar a realizar com todo primor a técnica PCR e contribuir na elaboração deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da FOU SP, Edina Lúcia Brito de Sousa, Viviane Tkackuk Passiano, Marinalva Januária de Jesus, Antônio Edílson Lopes Rodrigues e Ronaldo Carvalho, pelo agradável convívio ao longo destes últimos anos.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Patologia Bucal, Zilda Natalina Ramos Alves, Néia Barbosa dos Santos, Nair Maria Pereira, Débora de Oliveira França, pela atenção e apoio dedicados.

Às bibliotecárias Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Aparecida Pinto, pelo apoio, correções e orientações bibliográficas indispensáveis.



Aos pacientes, por contribuírem no meu aprimoramento clínico durante o curso de mestrado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para meu aprimoramento.

*Investigar ... pesquisar*

*é a busca metódica da coerência dos fatos que*

*compõem a vida, entrelaçada ao desafio*

*intelectual,*

*inspirada no amor à vida,*

*abraçada à fé no caminho do conhecimento,*

*nem desatada e*

*sem des-a-fio do DNA.*

*Mônica Nacao*

Nacao M. Avaliação da presença de periodontopatógenos na superfície de miniparafusos ortodônticos por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

## RESUMO

Os miniparafusos ortodônticos auto-rosqueáveis de liga de titânio têm sido utilizados como recurso de ancoragem durante a movimentação dentária ortodôntica. Estudos têm mostrado uma maior porcentagem de insucesso dos miniparafusos em comparação aos implantes dentários, e a presença de periodontopatógenos tem sido citada na literatura como possível causa da periimplantite. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença dos periodontopátogenos na superfície dos miniparafusos por meio da MEV, e identificar, no grupo experimental, as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e *Prevotella intermedia* (*Pi*) pela amplificação do DNA por meio da técnica de PCR. Os miniparafusos do grupo experimental e do grupo controle foram colhidos de pacientes do gênero feminino e masculino, com boa saúde bucal, ausência de doença periodontal, não fumantes e não diabéticos. Os resultados obtidos mostraram, quando analisados pela MEV, a adesão de colônia de bacilos e células inflamatórias na superfície dos miniparafusos no grupo experimental, e adesão de coágulo e malha fibrilar no grupo controle. A técnica PCR revelou 100% de freqüência da *Pi* em ambos os grupos analisados, a presença de *Aa* em 31,25% no grupo controle contra 13,3% no grupo experimental e a presença de 37,4% da *Pg* no grupo controle contra 33,33% no grupo experimental. O teste exato de Fisher não mostrou associação significativa entre a presença e a ausência de *Aa* ( $P = 0,39$ )

e *Pg* ( $P = 0,70$ ) e os grupos analisados, bem como o OR não revelou associação significativa da *Aa* (OR = 0,34; IC 95%: 0,05-2,10) e da *Pg* (OR = 0,61; IC 95%: 0,13-2,79) com a periimplantite.

Palavras-Chave: Procedimentos de Ancoragem Ortodôntica; Microbiologia; Reação em Cadeia da Polimerase; Microscopia Eletrônica de Varredura.

Nacao M. Evaluation of periodontopathogen presence on orthodontic mini-screw surfaces by scanning electron microscopy (SEM) and polymerase chain reaction (PCR) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

## ABSTRACT

Self-tapping titanium alloy orthodontic mini-screws have been used as bony anchorage during orthodontic tooth movement. Studies have shown a higher failure rate of mini-screw than dental implants, and the presence of periodontopathogens has been mentioned in the literature as a possible reason for peri-implantitis. The aim of this study was to evaluate the presence of periodontopathogens on the mini-screw surface by SEM and to identify the bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Prevotella intermedia* (*Pi*), by DNA amplification using PCR. Mini-screws of the experimental and control groups were collected from both male and female patients, with good oral health and absence of periodontal disease, non-smoker, and non-diabetic. The results, when analyzed by SEM, showed the adhesion of bacilli and inflammatory cells to the surface of the mini-screws in the experimental group and the adhesion of blood clots and fibril array in the control group. DNA amplification revealed *Pi* in all cases of both groups analyzed. *Aa* presence was observed in 31.25% of the control group against 13.3% in the experimental group and *Pg* presence in 37.4% of the control group against 33.33% in the experimental group. Fisher's exact test did not show significant association between both presence and absence of *Aa* ( $P = 0.39$ ) and *Pg* ( $P = 0.70$ ) and the analyzed groups. Furthermore, odds ratio (OR) revealed no significant

association of *Aa* (OR = 0.34; 95% CI: 0.05-2.10) and *Pg* (OR = 0.61; 95% CI: 0.13-2.79) with peri-implantitis.

Key-words: Orthodontic Anchorage procedures; Microbiology; Polymerase Chain Reaction; Microscopy, Electron, Scanning.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Fotomicrografia dos miniparafusos removidos após a ancoragem óssea do grupo controle. (A) Aumento menor do corpo do miniparafuso. (B) Presença de tecido hematopoiético, predominantemente, hemácias e fibrinas na superfície do miniparafuso. (C) Malha fibrilar. (D) Interface entre o corpo e a rosca do material onde é possível verificar apenas a adesão de fibras no corpo. (E) Malha fibras com células destacadas. Aumento: 50x (A), 400Xx (D), 550x (C), 1000x (B) e 1800x (E)..... 63
- Figura 5.2 - Fotomicrografia dos miniparafusos do grupo experimental. (A) Aumento menor do corpo do miniparafuso. (B) Corpo do miniparafuso. (C) células inflamatórias sobre a superfície dos miniparafusos. (D) colônias de bacilos. Aumento: 10x (A), 100x (B), 1000x (C) e 1500x (D) ..... 64
- Figura 5.3 - Gel de agarose a 2% mostrando a amplificação do DNA das bactérias, de acordo com o controle positivo (C+) da *Aa* (556pb), *Pi* (163pb) e *Pg* (404pb). (A) amplificação da *Aa* das amostras do grupo experimental 9 e 12, e do grupo controle 17, 18, 27, 28, 29. (B) amplificação da *Pi* de todas amostras do grupo experimental e controle. (C) amplificação da *Pg* das amostras do grupo experimental 1, 6, 11, 12, e do grupo controle 18, 19, 23, 24, 25, 26..... 66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Características dos pacientes do grupo experimental da PCR.....	51
Tabela 4.2 - Características dos pacientes do grupo controle da PCR .....	52
Tabela 4.3 - Características dos pacientes do grupo experimental da MEV .....	52
Tabela 4.4 - Características dos pacientes do grupo controle da MEV .....	53
Tabela 4.5 - Características dos primers utilizados .....	59
Tabela 5.1 - Associação do <i>Aa</i> entre os grupos analisados .....	67
Tabela 5.2 - Associação do <i>Pg</i> entre os grupos analisados .....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ABS	Absorbance (absorbância)
C+	controle positivo
C-	controle negativo
IC	intervalo de confiança
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	<b>E</b> thylene <b>D</b> iamine <b>T</b> etra <b>A</b> cetic acid (ácido etilendiamino tetra-acético)
et al	et alii (e outros)
Jr.	Junior
MBT	Mecânica de tratamento ortodôntico de McLaughlin, Bennett e Trevisi
NiTi	Níquel Titânio
OD	densidade óptica
OR	Odds Ratio
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico

PCR	reação em cadeia da polimerase
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PK	proteínase K
qsp	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
SDS	sódio dodecilsulfato
sp	single species
spp	several species
TAE	tris-acetato
Tm	<i>Melting temperature</i> (temperatura de anelamento)
TOMAS	<i>temporary orthodontic micro anchorage system</i>
UV	ultravioleta
USP	Universidade de São Paulo
x g	força centrífuga relativa (RCF) à aceleração da gravidade
5' - 3'	desenho da seqüência do fragmento do DNA da extremidade 5' a 3'
A	2'-desoxiadenosina 5' – trifosfato
T	2'-desoxitimidina 5' – trifosfato
C	2'-desoxicitidina 5' – trifosfato
G	2'-desoxiguanosina 5' – trifosfato

## LISTA DE SÍMBOLOS

mm	milímetro
M	massa molar (expressa em g/mol)
$\mu\text{l}$	microlitro
mM	milimolar
$\text{MgCl}_2$	cloreto de magnésio
mg	miligrama
ml	mililitro
g	gramas
NaCl	cloreto de sódio
Tris-HCl	tris-hidroximetil aminometano ácido clorídrico
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\text{CaCl}_2$	cloreto de cálcio
$\mu\text{g}$	micrograma
$\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$	acetato de potássio
KCl	cloreto de potássio
ng	nanograma
nm	nanômetro

U unidade ou unidades

nmol nanomol

$\mu\text{M}$  micromolar

V volts

# SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO .....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	24
2.1 Aplicação clínica dos miniparafusos ortodônticos .....	24
2.2 Insucesso de miniparafuso ortodôntico e implantes dentários .....	39
2.3 Fator microbiológico relacionado ao insucesso de miniparafuso ortodôntico e implantes dentários .....	41
2.4 Periodontopatógenos .....	45
3 PROPOSIÇÃO .....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	50
4.1 Material .....	50
4.1.1 Seleção da amostra .....	50
4.1.2 Colocação dos miniparafusos .....	53
4.1.3 Protocolo para remoção dos miniparafusos .....	54
4.2 Métodos .....	54
4.2.1 MEV .....	54
4.2.2 PCR .....	56
4.2.2.1 <i>Extração do DNA das amostras</i> .....	56
4.2.2.2 <i>Extração do DNA das culturas de bactérias</i> .....	58
4.2.2.3 <i>Quantificação do DNA</i> .....	58
4.2.2.4 <i>PCR</i> .....	59
4.2.2.5 Métodos estatísticos .....	61
5 RESULTADOS .....	62
5.1 MEV .....	62
5.2 PCR .....	64
6 DISCUSSÃO .....	68

7 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS.....	79

## 1 INTRODUÇÃO

Os miniparafusos ortodônticos auto-rosqueáveis de liga de titânio têm sido utilizados como recurso de ancoragem óssea fim de evitar que os dentes, utilizados como ancoragem, movimentem-se no sentido não desejado. A falta de controle de ancoragem do movimento dentário ortodôntico prejudica o plano e o resultado do tratamento.

Os miniparafusos apresentam estabilidade quando submetidos à carga, sendo utilizados temporariamente para controlar o movimento dentário ortodôntico, e removidos no final do tratamento.

Observa-se, na literatura, uma incidência maior de perdas de miniparafusos ortodônticos - de 7,9% a 16% (MARASSI; LEAL; HERDY, 2004; MIYAWAKI et al., 2003; MOREA et al., 2007) - do que ocorre com os implantes dentários osseointegrados - 3% a 5% (ORENSTEIN et al., 1998; RIBEIRO; KERBAUY; LIMA, 2007).

Os a mobilidade dos miniparafusos está possivelmente relacionada a fatores mecânicos, à densidade óssea maxilar e mandibular e à presença de periodontopatógenos no sulco peri-implante entre outros fatores (MIYAWAKI et al., 2003).

Os periodontopatógenos são microorganismos anaeróbios que apresentam papel importante na doença periodontal. A identificação dos microorganismos anaeróbios por meio de cultura requer muito tempo e é muito onerosa. Outro método eficaz e mais preciso indicado para estudar microorganismos anaeróbios é a técnica

da reação em cadeia da polimerase (PCR), dada as suas características: especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez.

A PCR é uma técnica *in vitro* na qual é amplificada, de forma específica e exponencial, uma seqüência de DNA por meio da reação em cadeia promovida por uma enzima polimerase de DNA. Desta maneira, é gerada quantidade suficiente de DNA para manipulação e análise subseqüentes (MULLIS et al., 1986).

Devido à controvérsia na literatura a respeito dos periodontopatógenos envolvidos na periimplantite e da ausência de estudos realizados em miniparafusos ortodônticos auto-rosqueáveis perdidos por mobilidade, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de patógenos por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e PCR na superfície dos miniparafusos perdidos por mobilidade.



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Aplicação clínica dos miniparafusos ortodônticos**

O conceito de componentes metálicos sendo parafusados na maxila e mandíbula para servir de ancoragem durante o tratamento ortodôntico foi relatada pela primeira vez por Gainsforth e Higley (1945). Os autores consideraram possível a utilização de implantes como ancoragem intrabucal. Utilizaram, então, parafusos de vitallium e fios de aço inoxidável em mandíbulas de cães para servirem como elemento de ancoragem durante a realização da movimentação ortodôntica. Neste experimento, obtiveram pequena movimentação dos dentes, visto que ocorreu a perda dos parafusos em poucas semanas, entre 16 e 31 dias. Este estudo serviu de subsídios para outras pesquisas.

O conceito de osseointegração foi introduzido por Brånemark et al. em 1969 após estudo por meio de microscopia óptica. A osseointegração é a união anatômica e funcional direta entre o osso vivo remodelado e a superfície do implante capaz de receber cargas funcionais. Os autores observaram que a camada metálica de titânio puro, implantado em mandíbula de cães, foi incorporada ao osso, tornando-o intimamente aderido às superfícies de titânio e formando uma firme área de ancoragem.

As vantagens do uso de miniparafusos ortodônticos em relação aos implantes osseointegrados de titânio foram descritas por Kanomi (1997). Os implantes osseointegrados de titânio são usados com muito sucesso para substituir dentes ausentes. No entanto, os mesmos apresentam limitações de espaço se utilizados somente como ancoragem óssea. Os implantes convencionais, utilizados exclusivamente como ancoragem, devem ser instalados em locais específicos. Em áreas edêntulas são muito grandes para tração ortodôntica horizontal, além dos aspectos cirúrgicos produzirem um desconforto no início da cicatrização e dificuldade de higienização bucal. Com a finalidade de ancoragem óssea, o autor indica o uso de miniparafuso, pois seu tamanho é pequeno o suficiente para possibilitar a colocação em qualquer área do rebordo alveolar, até mesmo no osso apical. O processo cirúrgico da instalação do miniparafuso é simples, sendo facilmente realizada tanto pelo ortodontista como pelo clínico geral. Tal processo deve produzir uma rápida cicatrização, e a remoção do miniparafuso após a tração ortodôntica deve ser fácil. Neste mesmo estudo, o autor descreveu o uso de miniparafusos para intrusão dos incisivos inferiores. Foi utilizado um miniparafuso na superfície alveolar inferior, na região apical dos incisivos centrais, em um paciente de 44 anos do gênero masculino com mordida profunda e curva de Spee acentuada. A instalação do miniparafuso foi feita, sob anestesia local, com retalho mucoperiosteal, descobrimento ósseo e uso de mini-chave de parafuso. Em seguida, foi feito o reposicionamento do retalho e, posteriormente, feita a sutura. A posição do miniparafuso foi verificada por meio de radiografia periapical. Após a cicatrização e osseointegração, fez-se a remoção do tecido gengival e adaptou-se uma placa de titânio com dois orifícios à cabeça do miniparafuso para funcionar como um gancho. Este gancho foi unido aos braquetes dos incisivos com amarrilho metálico e cadeia

elástica para promover a sua intrusão. Após quatro meses de tratamento ortodôntico, houve intrusão de 6mm dos incisivos inferiores, corrigindo a curva de Spee e o trespasse vertical sem comprometimento periodontal ou radicular. O autor concluiu que o miniparafuso pode ser utilizado como ancoragem óssea por apresentar dimensões reduzidas e ser indicado para a maioria das áreas do osso alveolar e palatino.

Em 1999, Melsen e Verna discutem os aspectos biológicos do controle de ancoragem, especificamente o impacto do sistema de forças ortodônticas e forças oclusais sobre a resposta celular do tecido periodontal dos dentes de ancoragem. Também discutem vários tipos de aparelhos de ancoragem considerando sua interação nas direções vertical e sagital do desenvolvimento dentofacial, uma vez que estes se apóiam em dentes e perturbam o equilíbrio das células no ligamento periodontal. Os autores defendem o uso de uma nova proposta intrabucal e não apoiada em estruturas dentárias. Trata-se de uma alternativa de ancoragem, que é intra-óssea, por meio de miniparafusos que osseointegram quando submetidos à carga imediata. Os miniparafusos podem ser inseridos em diversos locais e servem de ancoragem para uma variedade de movimentos dentários tanto na maxila como na mandíbula, além de serem fáceis de colocar e remover e apresentarem baixo custo.

A mesialização de molares inferiores com carga imediata sobre os miniparafusos ortodônticos foi relatada por Freudenthaler, Haas e Bantleon (2001). Os autores avaliaram oito pacientes com idade média de 22 anos que necessitavam controle crítico da posição e inclinação dos incisivos anteriores inferiores durante a

movimentação dos molares. Após análise das telerradiografias e radiografias panorâmicas de cada paciente, foi planejado o melhor local de inserção dos miniparafusos individualmente, de acordo com os seguintes critérios: disponibilidade adequada de osso, quantidade de espaço entre os dentes adjacentes, condições dos tecidos moles (gengiva inserida e gengiva livre), posição do forame mental e o espaço da extração. Após a instalação dos miniparafusos, sob anestesia local, os mesmos foram submetidos à carga imediata por meio de molas de NiTi ou ligaduras elásticas presas a cabeça do miniparafuso e esticadas ao fio .018" X .025" de aço com formato de cantiléver adaptado ao molar. A linha de ação das forças ortodônticas coincidiu com o centro de resistência dos molares, tornando possível um movimento de translação favorável. Os resultados mostraram que o uso de miniparafusos foi favorável e seguro no controle de ancoragem dos dentes anteriores.

O uso de miniparafuso com a finalidade de ancoragem óssea também foi descrito por Bae et al. (2002). Os autores descreveram como recurso acessível. Possuem baixo custo e, devido ao seu diâmetro pequeno e seus diferentes comprimentos, torna-se possível a inserção em diferentes locais desejáveis, como espaço inter-radicular. Podem ser submetidos à carga imediata, resistindo à forças de 200g-300g ao longo de todo o tratamento. Além disso, não ocorre osseointegração, diferentemente do implante dentário, e podem ser facilmente removidos pelo ortodontista. Os procedimentos cirúrgicos utilizados para a colocação foram: pré-medicação, quando necessária; medição do local de inserção com uma barra guia em radiografia periapical com asa de mordida; anestesia local; incisão e rebatimento do retalho; perfuração com broca de 1mm apenas na cortical,

com irrigação de refrigeração; e instalação do miniparafuso com chave de parafuso. As forças ortodônticas foram aplicadas após a cicatrização dos tecidos moles que geralmente demora 2 semanas. Neste estudo, também foi relatada a aplicação clínica dos miniparafusos no controle vertical e retração em massa anterior superior de uma paciente de 28 anos com relação de canino em CI II. Os resultados mostraram que os miniparafusos fornecem ancoragem absoluta para a movimentação dentária e foram facilmente removidos após o tratamento.

A verticalização de segundos molares superiores e inferiores inclinados para mesial foi descrita por Park, Kyung e Sung (2002). Os autores relataram 3 casos de verticalização de molares feitas com aplicação de força de 50g a 70g com cadeia elastomérica do miniparafuso ativada ao molar. Os autores mostraram ser possível realizar o movimento de verticalização de molar sem efeito colateral sobre os dentes anteriores.

Em relato de casos clínicos, Park (2003) descreveu o uso de miniparafuso para a intrusão de molares. Ele apresentou o caso de um paciente do gênero masculino de 26 anos de idade, com os segundos molares extruídos. A intrusão destes dentes foi feita com auxílio de miniparafusos, de 1,2mm de diâmetro e 10mm de comprimento, colocados no osso alveolar entre primeiros e segundos molares. Os miniparafusos foram submetidos à carga duas semanas depois da sua colocação. Uma força de intrusão de 100g foi aplicada sobre o miniparafuso durante 6 meses. O outro caso apresentado foi de um paciente do gênero masculino de 23 anos de idade com extrusão dos primeiros molares superiores. Os molares foram intruídos com miniparafusos de 1,2mm de diâmetro e 10mm de comprimento

colocados no osso alveolar palatino entre primeiros e segundos molares, ativados por 7 meses com correntes elastoméricas do miniparafuso ao tubo da bainha da barra palatina, promovendo uma intrusão de 2,5mm. No primeiro caso, foi aplicada força de intrusão apenas na parte vestibular da coroa. Isto resultou num movimento apical da coroa apenas do lado vestibular e nenhum movimento de intrusão no lado lingual. Em outras palavras, não se conseguiu movimento real de intrusão. No segundo caso, para conseguir intrusão verdadeira dos molares, foi colocada barra palatina para evitar rotações indesejáveis e inclinações linguais, e foi possível fazer uma intrusão de 2,5mm. Os autores mostraram que os miniparafusos colocados por lingual ofereceram resultados mais confiáveis que os colocados por vestibular, além de existir mais espaço entre as raízes pelo lado palatino, e a mucosa palatina resistir mais à inflamação. A intrusão com miniparafusos não oferece efeito colateral nos dentes anteriores e pode ser feita sem a utilização de braquetes nos dentes anteriores.

Os miniparafusos ortodônticos de liga de titânio são recursos de ancoragem óssea. São estáveis para controlar o movimento dentário ortodôntico, porém não imóveis quando submetidos à força ortodôntica. A utilização de miniparafusos para retração em massa anterior na maxila também foi avaliada por Liou, Pai e Lin (2004) em 16 pacientes consecutivos do gênero feminino, na faixa etária de 22 anos a 29 anos, por meio da sobreposição de cefalogramas traçados a partir de telerradiografia em norma lateral antes e após 9 meses de retração. Os resultados deste estudo mostraram que, embora as cabeças dos miniparafusos tivessem inclinado para frente significativamente (em média 0,4mm), o deslocamento foi clinicamente insignificante. Os miniparafusos extruíram e inclinaram para frente na direção da

aplicação de força para a movimentação ortodôntica de -1mm a 1,5mm, índice muito maior do que os erros aleatórios nas medidas verticais e horizontais (0,0mm a 0,3mm). Porém, os miniparafusos permaneceram clinicamente estáveis, mas não absolutamente imóveis quando submetidos à força ortodôntica.

Em um relato de caso clínico, Park, Kwon e Kwon (2004), descreveram o tratamento da mordida aberta anterior de uma paciente do gênero feminino com 24 anos de idade. A paciente apresentava relação molar de CI II do lado direito e CI III do lado esquerdo, mordida cruzada nos segundos molares esquerdo, e em oclusão, com contato apenas nos segundos molares. A paciente foi tratada com extração de primeiros pré-molares superiores e segundos pré-molares inferiores. Foram utilizados miniparafusos para controlar o movimento ântero-posterior dos dentes no arco mandibular. Os miniparafusos de 1,2mm de diâmetro e 8mm de comprimento foram colocados no osso inter-radicular entre segundos pré-molares e primeiros molares superiores com inclinação de 30° a 40° em relação ao longo eixo do dente. Isto garante que os ápices dos miniparafusos fiquem longe da raiz. Na mandíbula, os miniparafusos de 1,2mm de diâmetro e 6mm de comprimento foram colocados na cortical óssea entre primeiro e segundo molares, também a 30° e 40° em relação ao longo do eixo do dente. A espessura maior da cortical óssea na mandíbula permite colocar miniparafusos de menor comprimento. Os miniparafusos foram submetidos à carga de 150g de força após 2 semanas da instalação. A inclinação mesial do primeiro molar inferior foi corrigida colocando elástico em cadeia da extremidade distal do fio deste dente ao miniparafuso. Na maxila, a retração dos caninos de ambos os lados foi feita colocando mola de NiTi do miniparafuso ao braquete do canino para produzir espaço para alinhamento. Após o alinhamento, foi feita a

retração em massa na maxila aplicando força sobre os miniparafusos. Na mandíbula, foi aplicada força do miniparafuso ao arco, promovendo um movimento no sentido anti-horário no primeiro molar e força intrusiva no segundo molar. Após 11 meses de tratamento, também foi aplicada, na maxila, força intrusiva com corrente elástica do miniparafuso ao arco. Após a análise cefalométrica, foi observada na maxila a retração dos dentes anteriores e intrusão dos dentes posteriores sem perda de ancoragem. Na mandíbula, foi observada a verticalização dos molares. Este estudo mostrou que os miniparafusos podem ser utilizados, pois fornecem boa ancoragem e possibilitam o fechamento da mordida aberta anterior.

O uso de miniparafuso como ancoragem óssea absoluta foi relatada por Park, Kwon e Sung (2004b). Os autores apresentaram 2 casos clínicos. O primeiro caso foi de uma paciente do gênero feminino com 28 anos de idade, que apresentava relação molar de Cl I de Angle e apinhamento dentário superior e inferior. Na maxila, os miniparafusos de 1,2mm de diâmetro e 8mm e 10mm de comprimento foram colocados no osso alveolar palatino entre primeiro e segundo molares. Na mandíbula, os miniparafusos de 1,2mm de diâmetro e comprimento de 6mm foram colocados no osso alveolar distovestibularmente aos segundos molares. No sentido gengivo-oclusal, os miniparafusos foram colocados o mais baixo possível para contribuir com o aumento do vetor horizontal de força. Após duas semanas de instalação dos miniparafusos, uma cadeia elastomérica foi utilizada para aplicar força ortodôntica do miniparafuso aos primeiros pré-molares, na maxila; e aos botões linguais dos segundos pré-molares, na mandíbula. O alinhamento dos dentes anteriores foi feito dente por dente, após conseguir espaço pela distalização dos dentes posteriores. O segundo caso foi de um paciente do gênero masculino de 13



anos de idade, que apresentava relação molar de Cl I de Angle e apinhamento dentário anterior. Os miniparafusos foram colocados bilateralmente na maxila com 1,2mm de diâmetro e 8mm de comprimento entre o osso inter-radicular vestibular do segundo pré-molar e primeiro molar, e na mandíbula, mini-prafusos de 1,2mm de diâmetro e 6mm de comprimento foram colocados bilateralmente no osso da região retromolar. Após duas semanas de colocação, molas de NiTi e forças elastoméricas foram aplicadas aos caninos de ambos os arcos. A distalização dos dentes possibilitou o fornecimento de espaço para o alinhamento anterior dos dentes. A análise cefalométrica dos casos relatados mostrou que os incisivos superiores e molares superiores e inferiores, de fato, moveram para distal. Em outras palavras, mostrou que os miniparafusos fornecem ancoragem para retração de toda dentadura.

A aplicação clínica de miniparafuso para tratamento de caninos impactados palatinamente foi descrita por Park, Kwon e Sung (2004a). A posição do canino impactado deve ser avaliada por meio de radiografias com diferentes angulações, pois esta técnica não é planejada para produzir movimento radicular. Em outras palavras, ela está contra-indicada para caninos horizontalmente posicionados ou quando a raiz está mais para a palatina do que a coroa. O miniparafuso deve ser colocado em um ângulo 10° a 20° ao rebordo alveolar vestibular e paralelo ao longo eixo do dente. A cabeça do miniparafuso deve ficar localizada mais incisalmente para aumentar o componente vertical de força. Um acessório deve ser colado na superfície vestibular da coroa do canino. Os autores relataram 2 casos clínicos de caninos impactados. Os caninos são tracionados após duas semanas da colocação com força elástica de 50g aplicada da cabeça do miniparafuso ao acessório do

canino. Os resultados mostraram que os caninos foram trazidos para o arco sem efeito deletério na forma do arco.

O movimento ortodôntico distal de grupo de dentes posteriores foi relatado por Park, Lee e Kwon (2005). Eles avaliaram, por meio de radiografias cefalométricas e modelos de gesso, 13 pacientes consecutivos com idade média de 17 anos que necessitavam de correção ortodôntica com movimento dentário distal. A distalização foi realizada aplicando-se força de 200g sobre os miniparafusos da maxila e mandíbula aos caninos e pré-molares. Na maxila, os miniparafusos foram colocados no osso alveolar vestibular entre os segundos pré-molares e primeiros molares, e ativados com molas de NiTi. Na mandíbula, foram colocados no osso distal dos segundos molares e ativados com cadeias elastoméricas. Os resultados mostraram uma porcentagem de sucesso de 90% durante a aplicação de força, com duração média de 12 meses. A ausência de mobilidade indica que houve osseointegração do corpo do implante ao osso. Os primeiros molares e primeiros pré-molares superiores distalizaram, ao passo que não foram observados efeitos colaterais sobre os dentes anteriores superiores. Foram notadas inclinações distais e intrusão de todos os dentes superiores durante a distalização, embora não estatisticamente significativas. Os efeitos na mandíbula mostraram inclinação distal concomitantemente com a verticalização e movimento distal dos dentes anteriores. Não houve rotação horária do plano mandibular.

A correção de molares extruídos com miniparafusos foi descrita por Yao et al. (2005). Os autores avaliaram o resultado da intrusão de molares superiores utilizando mini-placas e miniparafusos por meio de modelos digitalizados

tridimensionalmente antes e após o tratamento em 22 pacientes, com média de idade de 27 anos. A intrusão foi feita aplicando força de 150g a 200g com corrente elástica do miniparafuso ao primeiro molar. Os resultados mostraram que os molares superiores foram intruídos com sucesso em todos os pacientes. A intrusão também foi observada, nos dentes adjacentes, segundos molares e primeiro e segundo pré-molares. A média de intrusão dos primeiros molares superiores foi de 3mm a 4mm, dos segundos molares de 2mm a 2,5mm, dos primeiros pré-molares de 2mm e dos segundos pré-molares de 1mm. Os resultados estatísticos mostraram ainda que a intrusão foi obtida sem significativa inclinação vestibulo-lingual. A utilização de miniparafusos para intrusão de molares causou o mínimo ou nenhuma extrusão dos dentes adjacentes. A incorporação de miniparafuso no tratamento ortodôntico foi uma excelente alternativa para alcançar uma significativa quantidade de intrusão de molar superior.

Em um relato de caso clínico, Ohnishi et al. (2005), descreveram o tratamento de uma paciente do gênero feminino, com 19 anos de idade, com queixa principal de sobremordida profunda acentuada e apinhamento dentário inferior. A paciente apresentava sorriso gengival, mordida profunda de 7,2mm, sobressaliência de 4,8mm, relação molar de CI I de Angle e de canino de CI II de ambos os lados. Além disso, a paciente possuía uma discrepância de modelo negativa, tanto para o arco superior quanto para o arco inferior. Foi planejado tratamento sem extração e com intrusão dos incisivos superiores aplicando força de 20g com elásticos em cadeia sobre o miniparafuso, este instalado no osso alveolar entre as raízes dos incisivos centrais superiores. Ao final do tratamento, os resultados mostraram, por meio de análises cefalométricas e exame clínico, uma melhora da sobremordida de 7,2mm

para 1,7mm e a sobressaliência de 4,8mm para 2,6mm. Não houve nenhuma reabsorção de raiz.

As áreas recomendadas para a inserção dos miniparafusos na maxila são a crista infrazigomática, o processo alveolar, o palatino e a espinha nasal. Na mandíbula, recomenda-se a região retromolar, o processo alveolar e a sínfise. Melsen e Verna (2005) descrevem o uso de miniparafusos autoperfurantes. Sua inserção é feita diretamente na mucosa. A mucosa é limpa com clorexidina e, então, o miniparafuso é colocado através da mucosa e inserido diretamente no osso. Com relação à mecânica ortodôntica, para a ancoragem direta, caso a linha de ação da força não passe pelo miniparafuso, se produzir um braço de ação, isto é, uma força fora do longo eixo será produzida; desse modo, produzindo um momento que resulta em força de cisalhamento. Como os miniparafusos não são osseointegrados, a força de cisalhamento poderá levar à mobilidade e ao insucesso. Para ancoragem indireta, o miniparafuso pode ser ligado a um grupo de dentes por meio de um fio retangular de aço. Todo o grupo de dente estabilizado com o miniparafuso pode ser utilizado como ancoragem absoluta. Os miniparafusos podem ser submetidos à carga imediata. A quantidade de força recomendada para iniciar o tratamento é 50g. Durante os primeiros 3 meses, é recomendado manter uma quantidade moderada de força.

No preparatório pré-cirúrgico, em alguns casos, pode ser necessário realizar a divergência de raízes para produzir espaço inter-radicular suficiente (MAINO; MURA; BEDNAR, 2005). Durante o procedimento cirúrgico, os autores enfatizam o cuidado que se deve tomar para evitar o contato com estruturas anatômicas locais. Eles

descrevem o uso de um guia confeccionado com resina e fio ortodôntico para auxiliar na determinação da posição de inserção do miniparafuso no osso, bem como o uso de radiografia com a técnica do cone longo para avaliar a posição relativa a estruturas anatômicas. Deve-se ter o cuidado em manter a velocidade de 60rpm a 100rpm da broca durante a perfuração, para permite sentir a transição da perfuração do osso cortical com o osso medular, bem como para minimizar o superaquecimento do osso. A irrigação com soro fisiológico ou água deve ser aplicada ao local durante este procedimento para manter a refrigeração. Finalmente, o miniparafuso é inserido a 20rpm a 30rpm no osso para evitar força excessiva, o que poderia levar a uma fratura do mesmo ( $40\text{Ncm}^2$ ). Ainda com relação à inserção, o miniparafuso deveria ser colocado perpendicularmente à força aplicada, pois no início o mesmo é mantido apenas por retenção mecânica. Após a inserção do miniparafuso, recomenda-se o uso de bochecho com clorexidina a 0,2% durante 7 dias. As forças aplicadas ao miniparafuso variam de 50g a 200g, e, ocasionalmente, a 300g, dependendo da quantidade de osso e da movimentação ortodôntica desejada. Os miniparafusos podem ser aplicados para intrusão que apresentam como efeito colateral a inclinação para a vestibular da coroa do dente. Este efeito colateral pode ser controlado com torque no arco ou com barra palatina. Este controle também pode ser feito com miniparafuso inserido na palatina e aplicação de força palatina e vestibular simultaneamente. O miniparafuso é facilmente removido, pois ocorre o mínimo de osseointegração em superfície lisa de titânio. A remoção pode ser feita sem anestesia local e a reparação ocorre um poucos dias.

O primeiro procedimento para a colocação dos miniparafusos é definir o local exato da inserção dos mesmos. Quando os miniparafusos são colocados em um

rebordo alveolar edêntulo, na área retromolar, no ramo ascendente da mandíbula, na sínfise mandibular, ou em outra região anatômica que não se aproxima dos dentes, deve-se tomar cuidado com qualquer elemento neurovascular. Quando se deseja colocar os miniparafusos no espaço inter-radicular, deve-se determinar a região que não interfira com as raízes dos dentes adjacentes. Um método para avaliar o local de inserção consiste em colocar um fio de latão entre os dentes, sendo sua extremidade correspondente ao local de inserção dos miniparafusos. Uma radiografia periapical é realizada para verificar se o local determinado não interfere com as raízes dos dentes adjacentes. O procedimento de colocação envolve um *punch* de tecido mole de 1,5mm de diâmetro sob anestesia local. Após a remoção do tecido mole utilizando o *punch* faz-se a perfuração da lâmina cortical com uma broca de 1,1mm sob irrigação estéril. O miniparafuso deve ser rosqueado até uma força de 40N/cm para garantir a estabilidade primária, isto é, para ser mantido pelo embricamento do implante com a cortical do osso. Não existe a necessidade de nenhuma técnica de fechamento de tecido mole. Se o miniparafuso não fica estável a uma força de 40N/cm, deve-se substituí-lo por um mais longo. A carga deveria ser imediata e poderia ser aplicada amarrando diretamente na cabeça do miniparafuso. Um segundo protocolo de instalação é realizando retalho mucoperiosteal. Trata-se de um procedimento mais invasivo, mas tem sido preferido por alguns cirurgiões na colocação dos miniparafusos, este é feito sob anestesia local. Os cuidados no pós-cirúrgico são importantes para evitar infecção do tecido mole, incluindo procedimentos de higiene e o uso de um chumaço de algodão com clorexidina. Os miniparafusos podem ser aplicados para intrusão de molares colocando-os na cortical vestibular entre primeiro e segundo molar, com uma inclinação de 10° a 20° com o longo eixo do dente, para permitir a colocação mais

profunda por vestibular. Para evitar o movimento vestibular dos dentes, o miniparafuso pode ser colocado também por lingual evitando-se desta maneira a inclinação vestibular durante o movimento de intrusão, uma vez que será aplicada força por vestibular e lingual do dente a ser intruído. Nos casos de ancoragem máxima, o miniparafuso pode ser colocado no rebordo alveolar por vestibular na mesial do primeiro molar e a retração em massa pode ser ativada com mola de NiTi. Com relação à remoção do miniparafuso, como não ocorre osseointegração, esta é feita com uma chave girando no sentido anti-horário sem necessidade de anestesia. Não é necessário procedimento para fechamento do tecido mole (HERMAN; COPE, (2005).

Uma nova guia cirúrgica para controlar a perfuração cirúrgica tridimensional para o posicionamento preciso, tanto no ângulo como na localização desejados, de miniparafusos ortodônticos auto-rosqueáveis foi descrita por Morea et al. (2005). A guia é confeccionada a partir de modelo de gesso adequado do arco dentário. A orientação do local e ângulo de inserção é feita com um pedaço de tubo de aço de 2,0mm e 1,3mm de diâmetro cortado e fixado com cera no modelo de gesso. A orientação do local e ângulo de inserção para colocação do miniparafuso é confirmada com a inserção de uma broca de 1,2mm no tubo de aço. É feito alívio com cera no modelo ao redor do tubo e nas superfícies oclusais para a confecção da guia em acrílico de polimerização química de espessura final. O procedimento cirúrgico é realizado com anestesia local, posicionando-se a guia cirúrgica armazenada em clorexidina 0,12% por 12h. A perfuração é feita com broca de 1,2mm posicionada no tubo de aço. O miniparafuso é rosqueado com uma chave de fenda.

Justens e De Bruyn (2008) realizaram um estudo clínico para descrever a eficácia clínica dos miniparafusos utilizados como ancoragem óssea no tratamento ortodôntico. Vinte e um pacientes com média de idade de 21 anos foram avaliados para verificar a saúde gengival, a sobrevivência clínica e opinião do paciente sobre o procedimento. O primeiro critério foi avaliado verificando o sangramento à sondagem. O segundo critério avaliado certificando se os miniparafusos permaneceram até o término do tratamento e se atingiram a necessidade do tratamento. Os resultados mostraram que 33 dos 50 miniparafusos suportaram as forças ortodônticas até o final do tratamento e que não houve relação significativa entre sucesso do miniparafuso e gengivite. Em 68% dos casos, os miniparafusos foram funcionais e possibilitaram a obtenção da correção ortodôntica. A afirmação de que os miniparafusos são indolores não foi confirmada pelos resultados da opinião dos pacientes. A experiência negativa dos pacientes foi, no entanto, desconsiderada pelas vantagens que os miniparafusos apresentam como ancoragem óssea.

## **2.2 Insucesso de miniparafuso ortodôntico e implantes dentários**

A porcentagem de insucesso para implantes dentários é de aproximadamente 3% (ORENSTEIN et al., 1998).



O índice de insucesso de implantes dentários aumenta de 5% para 35% em pacientes fumantes ativos (RIBEIRO; KERBAUY; LIMA, 2007). Avaliou-se que o fumo de tabaco é uma das maiores causas do fracasso dos implantes.

Para miniparafusos de 1,5mm de diâmetro, a porcentagem de insucesso foi de 16%, e o fator de risco foi relacionado com casos de inflamação do tecido periimplante (MIYAWAKI et al., 2003).

O índice de insucesso de 9% foi observado por Marassi, Leal e Herdy (2004). Estes autores relataram que para o aumento da taxa de sucesso no uso dos miniparafusos deve-se observar os seguintes cuidados: planejar atentamente o tipo de miniparafuso e o local da instalação; evitar cirurgia traumática, utilizando-se contra-ângulo e irrigação adequada para impedir o aquecimento durante a perfuração; evitar instalação de miniparafusos em mucosa alveolar; utilizar implante mais espesso ou mesmo dois implantes conjugados nos casos de pouco espaço ósseo ou de pacientes dolicofaciais; fornecer orientações pós-operatórias para os pacientes, contendo instruções para uma adequada higiene oral ao redor do implante, e recomendar ao paciente que evite pressionar o implante com a língua ou o dedo.

Park, Lee e Kwon (2005) avaliaram 13 pacientes consecutivos com idade média de 17 anos que distalizaram os dentes posteriores com miniparafuso e observaram uma porcentagem de insucesso de 10% em um período médio de aplicação de força de 12 meses.

Morea et al. (2007) avaliaram 66 miniparafusos inseridos em 19 adolescentes e observaram que os insucessos se deviam à infecções (1,3%), proximidade com as raízes adjacentes (3,9%), resultado de trauma à escovação (1,3%) e de causa desconhecida (1,3%). O índice de insucesso observado neste estudo foi de 7,9%.

### **2.3 Fator microbiológico relacionado ao insucesso de miniparafuso ortodôntico e implantes dentários**

Inúmeros fatores podem estar relacionados à perda de miniparafusos, desde fatores mecânicos, de densidade óssea e até mesmo fatores microbiológicos. Estes fatores causam a periimplantite (MIYAWAKI et al., 2003). O termo periimplantite descreve a perda óssea ao redor do implante dentário (MISCH, 2006).

A presença de um grande número de espiroquetas de tamanho pequeno e médio foi relatada no estudo em microscopia eletrônica de transmissão de Rams e Link Jr. (1983). Constatou-se ainda a presença de bacilos gram-negativos na placa subgingival de implantes que apresentaram insucesso com bolsas periodontais maiores que 10,0mm e perda progressiva do osso alveolar.

As características microbiológicas semelhantes entre as placas subgingivais de dentes naturais e dos implantes dentários foi observada por Holt et al. (1986), utilizando métodos microscópicos e bacteriológicos seletivos. Constatou-se uma alta porcentagem de bacilos gram-negativos – mais de 44% da microbiota cultivável – e,

pela análise em microscopia, verificou-se que mais de 50% da microbiota era composta por bacilos e espiroquetas de tamanho pequeno, médio e grande.

As características da microbiota do sulco subgengival, de implantes bem e mal sucedidos, foram observadas por Mombelli et al. (1987) em um estudo caso-controle por meio de imunofluorescência, imuno-histoquímica e cultura de bactérias. Os autores observaram alta proporção de bacilos gram-negativos anaeróbios, mais de 50% pelo método de cultura. Estavam presentes *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium* spp. No grupo de implantes bem sucedidos, observou-se baixa contagem de bactérias anaeróbias. O método de microscopia revelou a predominância de morfotipos cocos, acima de 50%, em implantes saudáveis. Por outro lado, nos implantes com insucesso, verificou-se uma proporção elevada de morfotipos espiroquetas, fusiforme, e bacilos.

O estudo de Becker et al. (1990), utilizando o método de DNA em sítios de implantes que apresentaram insucesso, observou um nível moderado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*.

Os microorganismos mais isolados da periimplantite, segundo Rosenberg, Torosian e Slots (1991) são: *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium* spp, *Cândida albicans* (todos nos sítios em proporção média superior a 10%), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*,

*Pseudomonas aeruginosa* (todos com 1% a 10%) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (todos com 0,1% a 1%). Nos casos em que o insucesso ocorreu devido ao trauma oclusal após a colocação da prótese, e não devido à formação de placa bacteriana patogênica, os microorganismos mais citados foram *Streptococcus sanguis* (taxas superiores a 10%), *S. morbillorum* e *Actinomyces* spp (0,1% a 1%), espécies bacterianas também isoladas de implantes bem sucedidos.

Num estudo *in vitro* da capacidade de aderência de sorotipos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* à superfície de implante de titânio em microscopia eletrônica de varredura, Ötke et al. (1999) observaram relação de aderência mais alta para o sorotipo a (ATCC 29523) (estatisticamente significante,  $P < 0,01$ ). Os sorotipos b, c, d (ATCC 43718, ATCC 33384, e IDH 781) fixaram igualmente bem, ao passo que o sorotipo e (IDH 1705) teve uma capacidade de aderência estatisticamente baixa.

Os fatores associados com a estabilidade de parafusos de titânio na região posterior para ancoragem óssea em 41 pacientes com maloclusões foi avaliado por Miyawaki et al (2003). Analisaram retrospectivamente 134 parafusos de titânio de 3 tipos, e 17 miniplacas. O índice de sucesso de miniparafuso com 1,0mm de diâmetro ou menos foi significativamente menor do com os outros miniparafusos com 1,5mm ou 2,3mm diâmetro ou com as miniplacas. Os fatores de risco associados com a mobilidade (falha) dos miniparafusos após a implantação foram um ângulo plano mandibular alto (isto é, osso cortical fino) e inflamação do tecido periimplante. Os

autores não detectaram uma associação significativa entre o índice de sucesso e as seguintes variáveis: comprimento do miniparafuso, tipo de cirurgia de instalação do miniparafuso, carga imediata, localização de inserção, idade, gênero, apinhamento dentário, relação ântero-posterior das bases ósseas, periodontite controlada, e sintomas de desordem temporomandibular.

A adesão de bacilos gram-negativos na superfície lisa de titânio num estudo *in vitro* por meio da microscopia eletrônica de varredura foi observado por Kuula et al. (2004). Os autores notaram uma fraca adesão da *Fusobacterium nucleatum* e maior adesão da *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*. Apenas pequenas diferenças foram observadas na quantidade de células aderidas entre as cepas dentro de cada grupo de bactéria.

Embora a periimplantite possa estar relacionada à presença de periodontopatógenos, Leitão et al. (2005) observaram, por meio da técnica PCR, a ausência de relação entre a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* no fluido do sulco periimplante e sinais clínicos da periimplantite em 19 pacientes parcialmente edentados que apresentavam implante dentário.

No entanto, a periimplantite tem sido relacionada à presença de bactérias anaeróbias na interface miniparafuso e sulco periimplantar. O estudo *in vitro* de Proff et al. (2006) mostra a presença de *Porphyromonas gingivalis*, após 24 horas pelo meio de cultura em 12 miniparafusos. Houve penetração do patógeno da doença periodontal no espaço do miniparafuso e do apoio.

## 2.4 Periodontopatógenos

A identificação de microorganismos anaeróbios pode ser feita por meio de cultura bem como pela técnica PCR entre outros métodos. O meio de cultura de acordo com o estudo de Ashimoto et al. (1996) mostrou ser menos sensível quando comparado com a técnica PCR na análise de periodontopatógenos do fluido gengival de 50 pacientes adultos com periodontite avançada, 50 pacientes adultos com gengivite e 50 crianças com gengivite. Este trabalho revelou, ainda, uma forte correlação entre a doença periodontal avançada e microorganismos *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forshythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola*.

A periodontite avançada ocorre, segundo Nisengard e Newman (1997), da fase pós-puberal até a faixa de 35 anos de idade e observa-se em exame microbiológico a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e espiroquetas pequenos. A *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* são bastonetes gram-negativos anaeróbios. Segundo Slots (1999), os principais supostos periodontopatógenos são *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, relacionados com a periodontite avançada.

A avaliação da placa subgengival de 50 pacientes com doença periodontal e 50 pacientes saudáveis, por meio do método PCR, no estudo de Avila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002), revelou a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forshythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella*

*corrodens*, *Prevotella intermedia*, e *Treponema denticola*. Em contraste, o meio de cultura mostrou a associação de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forshythus*, *Prevotella intermedia* com a periodontite. Entretanto, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *Fusobacterium nucleatum* não foram significativamente relacionados à doença.

Em outro estudo, analisando também amostras subgingivais de 50 pacientes com periodontite e 50 pacientes saudáveis, Malheiros e Avila-Campos (2004) relataram a amplificação de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* da placa subgingival e sugerem que o PCR é um método mais sensível e altamente específico na detecção de microorganismos quando comparado com o meio de cultura.

A semelhança entre a microbiota dos sítios comprometidos por periodontite e por periimplantite foi descrita por De Lorenzo (2004). Em ambos os sítios, dominados por bactérias gram-negativas anaeróbias estritas, as espécies mais associadas à periimplantite têm sido *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium* spp, *Campylobacter rectus* e espiroquetas. Existe a participação de microorganismos superinfectantes como *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. A constatação da presença de espiroquetas em sítios periimplantares, como na doença periodontal, pode ser um bom indicador da existência de microbiota anaeróbia estrita e da severidade da lesão. Assim, a periimplantite pode ser considerada como uma

infecção sítio-específica induzida por microorganismos causadores de periodontite em dentes naturais.

Em um estudo utilizando amostras de placas dentais entre 60 membros de família por meio da técnica PCR, foi observado por Okada et al. (2004), a prevalência de co-infecção entre pais e filhos dos seguintes periodontopatógenos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteróides forsythus*) e *Prevotella intermedia*.

Embora a microbiota dos sítios de periimplantite seja similar a dos sítios de periodontite e apresentem prevalência expressiva de bastonetes e espiroquetas proteolíticos anaeróbios gram-negativos, Leitão et al. (2005) observaram, por meio da técnica PCR, a ausência de relação entre a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* no fluido do sulco periimplante e sinais clínicos da periimplantite em 19 pacientes parcialmente edentados que apresentavam implante dentário.

A avaliação, por meio da técnica PCR, no estudo de Lee et al. (2005) de amostras de placas subgingivais de 19 pacientes não submetidos ao tratamento ortodôntico e 17 pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico evidenciou a presença de 6 supostos periodontopatógenos: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*Bacteróides forsythus*), *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actionomycetemcomitans*. Foi significativa a presença das bactérias *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Prevotella nigrescens* nas amostras de pacientes submetidos ao tratamento



ortodôntico quando comparado com os pacientes controles não submetidos ao tratamento ortodôntico.

### 3 PROPOSIÇÃO

A análise da literatura de implantes dentários permitiu observar a associação entre a presença de periodontopatógenos ao redor do implante e o seu insucesso. Como não existem relatos da associação dos periodontopatógenos com os miniparafusos ortodônticos, o propósito deste estudo foi:

- 3.1 Verificar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a presença de microorganismos aderidos à superfície dos miniparafusos perdidos por mobilidade.
- 3.2 Avaliar, por meio da técnica de PCR, a presença dos seguintes periodontopatógenos na superfície dos miniparafusos:
  - 3.2.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,
  - 3.2.2 *Porphyromonas gingivalis* e
  - 3.2.3 *Prevotella intermedia*
- 3.3 Investigar a possível relação entre estes microorganismos com a periimplantite nos casos de insucesso na ancoragem óssea.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Seleção da amostra

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado com o protocolo 112/07 de acordo com a resolução CNS 196/96 (Anexo A).

Neste estudo caso-controle, foram coletados miniparafusos ortodônticos auto-rosqueáveis de liga de titânio TOMAS® (Dentaurum, Turnstrasse 31, D – 75228 Ispringen, Germany) e ortho implant Globtek (Globtek implant system, Coreia) de 6mm a 10mm de comprimento por 1,2mm a 1,6mm de diâmetro, esterilizados com raios gama. Foram observados os miniparafusos de 27 pacientes, consecutivos, da clínica de pesquisa MBT que utilizaram este recurso de ancoragem que não apresentaram mobilidade alguma e que apresentaram mobilidade (insucesso).

A amostra para metodologia PCR foi dividida em dois grupos: (I) grupo experimental - 15 miniparafusos perdidos por mobilidade (no tempo de 7 a 731 dias após a colocação); (II) grupo controle - 16 miniparafusos colhidos após a ancoragem óssea ter sido finalizada (no tempo de 169 dias a 1023 dias), ou seja, miniparafusos que tiveram êxito durante o tratamento.

Os pacientes estudados tinham como características serem do gênero masculino e do gênero feminino, na faixa etária de 13 anos a 40 anos, com relação molar Classe I, Classe II divisão 1ª e CI III de Angle e boa saúde bucal. Foram excluídos os pacientes com presença de doença periodontal, com diabetes e fumantes (Tabela 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1 - Características dos pacientes do grupo experimental da PCR

Grupo Experimental								
ID	Paciente	Idade	Gênero	Saúde sistêmica	Saúde bucal	Região	Tempo (d)	Torque de remoção (N)
1	B. C. S. G.	18a 7m	F	Boa	Boa	15-16	311	0
2	G. H.	19a 8m	M	Boa	Boa	26-27	209	0
3	T. A. C.	18a 8m	M	Boa	Boa	15-16	183	0
4	T. A. C.	18a 8m	M	Boa	Boa	45-46	49	0
5	L. T. S.	19a 2m	F	Boa	Boa	15-16	48	0
6	C. P.	16a 8m	F	Boa	Boa	36-37	17	0
7	E. H.	18a 4m	M	Boa	Boa	15	319	0
8	S. M.	19a 7m	F	Boa	Boa	44	7	0
9	T. J. S.	16a 5m	F	Boa	Boa	36	7	0
10	L. A. S	16a 11m	M	Boa	Boa	32-33	177	0
11	L. M.	18a 3m	F	Boa	Boa	15-16	15	0
12	L. T. S.	19a 9m	F	Boa	Boa	45-46	29	0
13	C. L. S.	21a 2m	F	Boa	Boa	45-46	57	0
14	A. S. S.	18a 5m	F	Boa	Boa	35-36	15	0
15	A. L. M. M.	20a 7m	M	Boa	Boa	45-46	731	0

Abreviaturas: a: ano, m: meses, F: feminino e M: masculino, ID: identificação

Tabela 4.2 -Características dos pacientes do grupo controle da PCR

Grupo Controle								
ID	Paciente	Idade	Gênero	Saúde sistêmica	Saúde bucal	Região	Tempo (d)	Torque de remoção (N)
16	B. C. S. G.	18a 7m	F	Boa	Boa	25-26	311	2,9
17	R. A. V. V.	21a 5m	F	Boa	Boa	45-46	169	> 3,1
18	J. F. S.	20a	F	Boa	Boa	25-26	652	8,6
19	J. F. S.	20a	F	Boa	Boa	15-16	652	> 3,0
20	V. S.	18a 9m	F	Boa	Boa	15-16	718	12
21	V. S.	18a 9m	F	Boa	Boa	25-26	718	9
22	N. G.	13a	F	Boa	Boa	26-27	625	8
23	E. L. B. S.	40a 11m	F	Boa	Boa	15-16	1022	9,3
24	E. L. B. S.	40a 11m	F	Boa	Boa	45-46	1022	8,5
25	E. L. B. S.	40a 11m	F	Boa	Boa	25-26	1022	8,7
26	E. L. B. S.	40a 11m	F	Boa	Boa	35-36	1022	11
27	R. B. S. L.	19a 11m	M	Boa	Boa	25-26	582	0
28	R. B. S. L.	19a 11m	M	Boa	Boa	35-36	582	10
29	A. C.	17a 9m	M	Boa	Boa	Distal 45	1023	2
30	F. L.	18a 11m	F	Boa	Boa	15-16	820	5
31	F. L.	18a 11m	F	Boa	Boa	25-26	820	11,5

Abreviaturas: a: ano, m: meses, F: feminino e M: masculino, ID: identificação

A amostra da metodologia MEV consistiu de 6 miniparafusos ortodônticos de liga de titânio grau 5 (titânio, vanádio e alumínio), submetidos à esterilização com raios gama durante a fabricação, da marca Tomas® (Dentaurum, Inspringen, Alemanha), que foram divididos em dois grupos: (I) grupo experimental – 3 miniparafusos perdidos por mobilidade, (II) grupo controle - 3 miniparafusos removidos após a ancoragem óssea (Tabela 4.3 e 4.4).

Tabela 4.3 -Características dos pacientes do grupo experimental

Grupo experimental							
Paciente	Idade	Gênero	Saúde sistêmica	Saúde Bucal	Região	Tempo (d)	Torque de remoção (N)
L. S. B.	32a	F	Boa	Boa	15-16	156	0
S. Q. B.	19a 8m	F	Boa	Boa	45-46	36	0
L. S. T.	19a 1m	F	Boa	Boa	45-46	37	0

Abreviaturas: a: ano, m: meses, F: feminino, M: masculino e d: dias

Tabela 4.4 - Características dos pacientes do grupo experimental

Grupo controle							
Paciente	Idade	Gênero	Saúde sistêmica	Saúde Bucal	Região	Tempo (d)	Torque de remoção (N)
T. A. C.	18a 7m	F	Boa	Boa	45-46	585	8,7
A. N. F.	23a 3m	F	Boa	Boa	15-16	645	10
A. N. F.	23a 3m	F	Boa	Boa	25-26	645	0

Abreviaturas: a: ano, m: meses, F: feminino, M: masculino e d: dias

Os miniparafusos ortodônticos utilizados nesta parte do estudo foram obtidos de pacientes, do gênero feminino, com idade entre 18 e 32 anos. Tais pacientes faziam parte do mesmo grupo de 27 pacientes consecutivos tratados com extração de pré-molares da Clínica de Pesquisa do Departamento de Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

#### 4.1.2 Colocação dos miniparafusos

A colocação dos miniparafusos foi feita no osso alveolar entre as raízes de pré-molar e molar, na maxila e mandíbula, por meio de uma guia cirúrgica, previamente descrito (MOREA et al., 2005). Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo operador. As recomendações de pós-operatório foram bochechos com gluconato de clorexidina 0,12% (PerioGard®, Colgate-Palmolive Ind. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) 3 vezes ao dia por 1 semana e cuidado com trauma sobre o miniparafuso durante a escovação. A ativação foi realizada um mês após a colocação dos miniparafusos e a quantidade de força aplicada sobre o miniparafuso foi de 100g a 300g.

#### 4.1.3 Protocolo para remoção dos miniparafusos

Os miniparafusos perdidos devido à mobilidade foram removidos fazendo assepsia com gluconato de clorexidina 0,12%, utilizando pinça e luvas estéreis.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), todos os espécimes foram fixados em solução de glutaraldeído a 2%, em formol a 2,5%, diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 – 7,4. Os frascos foram identificados para posterior análise.

Para a PCR, as amostras foram colocados em tubos cônicos (tipo Eppendorf) de 2ml com 500µl de solução tampão de lise (NaCl 1M, Tris-HCl 1M, pH 8, EDTA 0,5M, pH 8, SDS 10%, q.s.p. H<sub>2</sub>O) e identificados para posterior análise. Todo o procedimento de remoção foi realizado sob condições estéreis, evitando-se desta forma qualquer contaminação do objeto estudado. As amostras foram armazenadas à -20°C até o momento da extração do DNA.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Todos os espécimes foram fixados em solução de glutaraldeído a 2%, em formol a 2,5%, diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 – 7,4 (Glutaraldeído, paraformaldeído, cacodilato e HMDS, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA). Após lavagem com cacodilato (6 vezes de 10 minutos), seguiu-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool por 10 minutos. A dessecação foi feita com HMDS. A secagem foi completada numa placa de Petri.

Os miniparafusos foram montados em *stubs* posicionando a ranhura para cima na tentativa de padronizar as áreas observadas. Antes da metalização, foram colocados em estufa a 37°C para secagem e, em seguida, metalizados com ouro no equipamento Bal-Tec, SCD 050 (Baltec, Liechtenstein), por 2 minutos.

Os miniparafusos foram observados em Microscopia Eletrônica de Varredura (Microscópio Eletrônico JSM-6100, Japan) com aumento de 10x a 2000x. A observação foi realizada apenas no corpo dos miniparafusos, não tendo sido avaliados cabeça e colo. As fotomicrografias foram feitas em filme Neopan 100 Acros, 120mm, preto e branco (FujiFilm Corporation, Japan) com a máquina (Mamiya, Japão) 6 X 7. O negativo foi escaneado no equipamento A3 Scanion (Mustek Systems, Inc., China) em resolução 900 dpi e resultando numa imagem de 774 X 588 pixels, em formato JPEG. As imagens negativas foram invertidas e realçadas no contraste, para facilitar a interpretação, no programa Adobe® Photoshop® 5.0 (Adobe Systems Incorporations, USA).



## 4.2.2 PCR

### 4.2.2.1 Extração do DNA das amostras

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

O DNA das amostras foi extraído pelo kit ChargeSwitch® Forensic DNA Purification (CS11200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) o qual purifica o DNA de amostras com pouco material genético pela ligação do mesmo em *beads* magnéticos.

Para a digestão enzimática foi acrescentado a cada amostra 1000µl da solução de lise (Lysis Buffer – L13, NaCl) e 10µl de Proteinase K (20mg/ml em Tris-HCl 50mM, pH 8,5, CaCl<sub>2</sub> 5mM, 50% glicerol). Os tubos foram vedados com Parafilm e vortexados por 15s e mantidos a 55°C em banho-maria durante uma hora. Após a digestão, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Para a ligação do DNA aos *beads* magnéticos, adicionou-se 200µl da solução de purificação (Purification Buffer - N5, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, KCl) ao sobrenadante e pipetou-se duas vezes suavemente. Este recurso diminui o pH (pH < 6,5) da solução deixando o DNA com carga negativa para que ele se ligue aos *beads* magnéticos (carga

positiva). Foi adicionado 20µl da solução de *beads* magnéticos (ChargeSwitch® Magnetic Beads) e pipetado cinco vezes suavemente, evitando a formação de bolhas. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente para permitir a união do DNA aos *beads* magnéticos. Os tubos foram colocados por 1min ou até que os *beads* formassem um precipitado firme junto ao ímã do MagnaRack™ (CS15000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sem remover os tubos do MagnaRack™, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante e descartado. Tomou-se o cuidado para não desorganizar o precipitado formado. Os tubos, então, foram removidos do MagnaRack e adicionou-se 500µl de tampão de lavagem (ChargeSwitch® Wash Buffer - W12), pipetado duas vezes suavemente para dissolver os *beads* magnéticos. Os tubos foram novamente colocados no MagnaRack™ por 1min ou até que o *beads* tivessem formado um precipitado bem firme. Sem remover os tubos do MagnaRack™, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante que foi descartado. Este procedimento foi repetido 2 vezes.

Para a eluição do DNA dos *beads* magnéticos, os tubos foram removidos do MagnaRack™ e adicionou-se 150µl do tampão de eluição (ChargeSwitch® Elution Buffer - E5: Tris-HCl 10mM, pH 8,5), pipetado 10 vezes gentilmente até dissolver os *beads* magnéticos e incubou-se a temperatura ambiente de 1 min a 5 min. A carga na superfície dos *beads* foi neutralizada aumentando o pH para 8,5, o que proporcionou o desligamento do DNA. Finalmente, os tubos foram recolocados no MagnaRack™ por 1 min ou até que os *beads* tivessem formado um precipitado bem firme. Sem retirar os tubos do MagnaRack™, foi removido cuidadosamente o sobrenadante contendo o DNA para um novo tubo de 0,5ml. O DNA foi armazenado a – 20°C.

#### 4.2.2.2 Extração do DNA das culturas de bactérias

As amostra de bactéria *Aa*, *Pg* e *Pi* foram cedidas gentilmente pelo Prof. Mario Julio Avila-Campos do Laboratório de anaeróbios do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Cada amostra foi misturada a 500µl de água estéril Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e lavadas 2 vezes a 12000 x *g* por 10min. O precipitado foi dissolvido em 500µl de água estéril Milli-Q e fervido por 10min. Após centrifugação (14000 x *g*, 10min) o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e usado como amostra da DNA das bactérias como controle positivo (AVILA-CAMPOS, 2003).

#### 4.2.2.3 Quantificação do DNA

A quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro (modelo ND 1000, Nanodrop™, Wilmington, DE, USA), nas dependências do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química da USP, de responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mari Cleide Sogayar. A concentração foi expressa em ng/µl e a integridade das amostras de DNA foi obtida pela razão 260/280.

No grupo experimental, a quantificação de DNA variou de 2,2ng/µl a 6,2ng/µl e a integridade de 1,18 a 1,61, e no grupo controle, variou de 7,5ng/µl a 26ng/µl, e a integridade de 1,56 a 1,76.

## 4.2.2.4 PCR

O DNA obtido foi amplificado pela técnica da PCR utilizando-se *primers* específicos para cada bactéria estudada. As seqüências foram obtidas da literatura (ASHIMOTO et al., 1996) (Tabela 4.5). Os *primers* foram dissolvidos em tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8,0) e armazenados a -20°C.

Tabela 4.5 - Características dos primers utilizados

Gene Alvo	Primers (5' - 3")	Tm (°C)	Amplicon (pb)
<i>Aa</i>	F: AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC R: ATGCCAACTTGACGTAAAT	56,9	556
<i>Pg</i>	F: AGGCAGCTTGCCATACTGCG R: ACTGTTAGCAACTACCGATGT	60	404
<i>Pi</i>	F: CCGCATACGTTGCGTGCACTAAG R: CGTGCCAGCAGCCGCGGTATTAGG	59	163

Para PCR das amostras, utilizou-se o kit Platinum® Taq DNA Polymerase (10966-030, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada em 25µl, onde se adicionou 2,5µl de tampão para PCR 10X (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM), 0,5µl de dNTP 10mM (2,5 mM dATP, 2,5 mM dTTP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP) (10297-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2µl (10µM) de cada *primer* (*Pi*, e-oligos, Hawthorne, NY e *Aa*, *Pg*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,25µl de Taq DNA polimerase 5U/µl, 2,0µl de DNA da amostra e água q.s.p.

Para PCR do controle positivo de cada bactéria estudada utilizou-se o kit Platinum® Taq DNA Polymerase (10966-030, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A

reação de PCR foi realizada em 25µl, onde se adicionou 2,5µl tampão PCR 10X (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM), 1µl dNTP 10mM (2,5 mM dATP, 2,5 mM dTTP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP) (10297-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1,5µl MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1µl (10µM) de cada *primer* (e-oligos, Hawthorne, NY e Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,25µl Taq DNA polimerase 5U/µl, 5,0µl DNA da amostra e água q.s.p. Para todas as reações foram utilizados controles positivo e negativo. O controle positivo (C+) caracterizou-se por ser o DNA da bactéria. Já no controle negativo (C-), o DNA foi omitido e acrescentou-se água em seu lugar.

As condições de termociclagem foram: (I) desnaturação: 95°C por 3 min; (II) 94°C por 1min e 30s; (III) hibridização dos primers: vide Tabela A; (IV) extensão inicial: 72 °C por 2 min; (V) extensão final: 72°C por 10 min. A amplificação (os passos II, III e IV) foram repetidos 40 vezes. As reações foram otimizadas no termociclador (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA).

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada pela corrida das amostras em solução de corrida com azul de bromofenol (10X Blue Juice™ gel loading Buffer, 10826-015, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) (65% w/v sacarose, Tris-HCl 10mM, pH 7,5, EDTA 10mM e 0,3% w/v azul de bromofenol), em gel de agarose a 2% (15510-027, UltraPure™ Agarose, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) em tampão TAE 1X (Tris-acetato 2M, pH 8,3; EDTA 50mM) (24710-030, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) com 10mg/ml brometo de etídio (15585-011, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) através de eletroforese horizontal (90V e 100mA) (Bio-Rad, Sub-Cell®,GT, USA). O resultado foi visto em transiluminador com luz ultravioleta (modelo nº 3-3500, Foto/Prep®, Fotodyne® Incorporated, Hartland, WI,

USA) e fotografado em uma câmera digital (SP-500U2, Olympus Imaging America Inc., Center Valley, PA). As bandas ficam fluorescentes quando vistas no transiluminador com luz ultravioleta, pois o brometo de etídio presente no gel de agarose se ligou às moléculas de DNA. Para confirmar a especificidade do amplicon utilizou-se um marcador de pares de base (pb) (10068-013, Low DNA mass ladder, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA).

#### 4.2.2.5 Métodos estatísticos

Os dados coletados foram analisados de acordo com a presença ou não das variáveis citadas na hipótese experimental deste estudo. Para avaliar cada variável no insucesso do miniparafuso e o significado da associação de cada dado categórico na falha nos grupos estudados, foi aplicado o teste exato de Fisher (valores de P bilateral, com nível de significância:  $\alpha = 0,05$ ). Para avaliar o grau de probabilidade de cada fator influenciar na falha, foi aplicado razão entre a ocorrência de cada variável avaliada usando o razão de chances ou odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% para o insucesso de um miniparafuso. O teste estatístico e o odds ratio foram realizados no pacote estatístico STATA (Stata 9, StataCorp, Texas).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MEV

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura mostraram a presença de uma malha fibrilar aderida ao corpo dos miniparafusos e tecido hematopoiético, indicativo de processo inflamatório inicial (formação de coágulo), no grupo controle (Figura 5.1).

Foi verificada a presença de colônias de bacilos aderidos à superfície dos miniparafusos do grupo experimental. Não foram observadas colônias de bacilos nos miniparafusos do grupo controle (Figura 5.2).

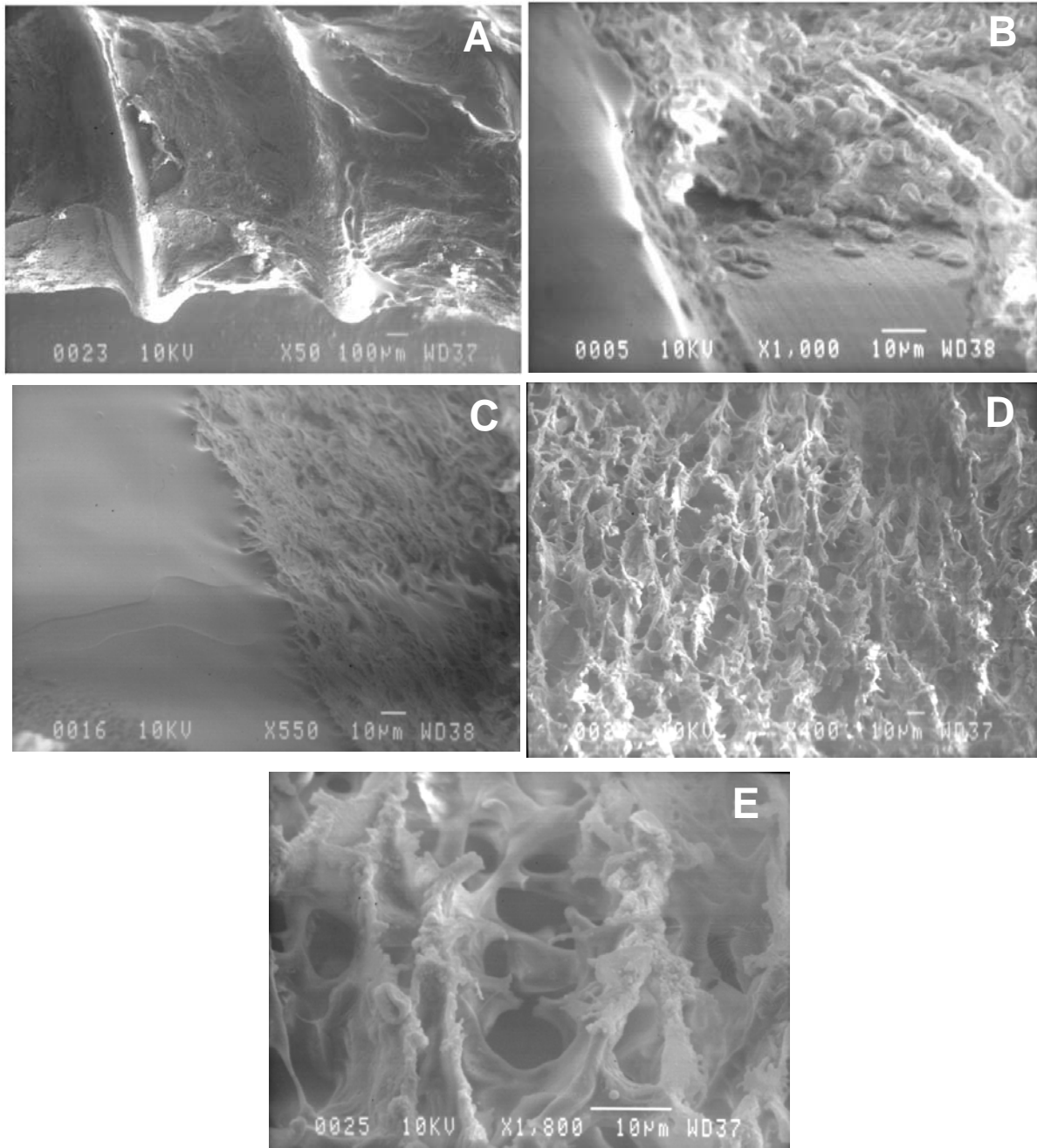


Figura 5.1 - Fotomicrografia dos miniparafusos removidos após a ancoragem óssea do grupo controle. (A) Aumento menor do corpo do miniparafuso. (B) Presença de tecido hematopoiético, predominantemente, hemácias e fibrinas na superfície do miniparafuso. (C) Malha fibrilar (D) Interface entre o corpo e a rosca do material onde é possível verificar apenas a adesão de fibras no corpo. (E) Malha de fibras com células destacadas. Aumento: 50x (A), 400x (D), 550x (C), 1000x (B) e 1800x (E)



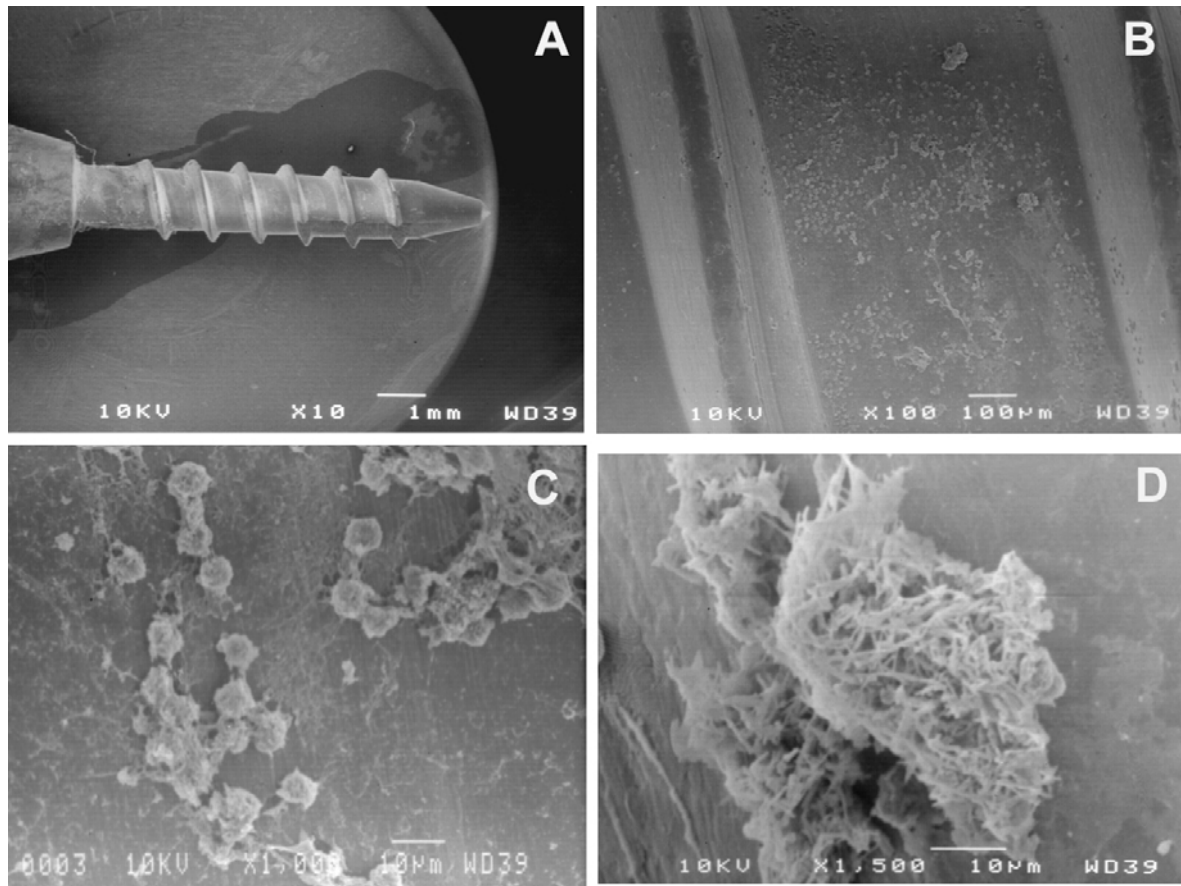


Figura 5.2 - Fotomicrografia dos miniparafusos do grupo experimental. (A) Aumento menor do corpo do miniparafuso. (B) Corpo do miniparafuso. (C) Células inflamatórias sobre a superfície dos miniparafusos. (D) Colônias de bacilos. Aumento: 10x (A), 100x (B), 1000x (C) e 1500x (D)

## 5.2 PCR

Os resultados da amplificação do DNA das amostras dos grupos controle e experimental demonstraram que a *Pi* foi observada em todas as amostras de ambos os grupos (Figura 5.3).

Ao passo que a amplificação do DNA da *Pg* ocorreu em 37,4% para as amostras do grupo controle. Portanto, ocorreu amplificação de DNA em 6 amostras

de 16 no grupo controle. No grupo experimental, foi observada a amplificação em 33,33%, que corresponde a 4 amplificações de 15 amostras. (Figura 5.4).

A amplificação do DNA da *Aa* ocorreu em 31,25% para as amostras do grupo controle. Isto significa que houve amplificação em 5 amostras de 16 do grupo controle. Em contraste, o grupo experimental apresentou uma amplificação de apenas 13,33%. Em outras palavras, isto significa que 2 amostras foram amplificadas de 15 do grupo experimental (Figura 5.5).

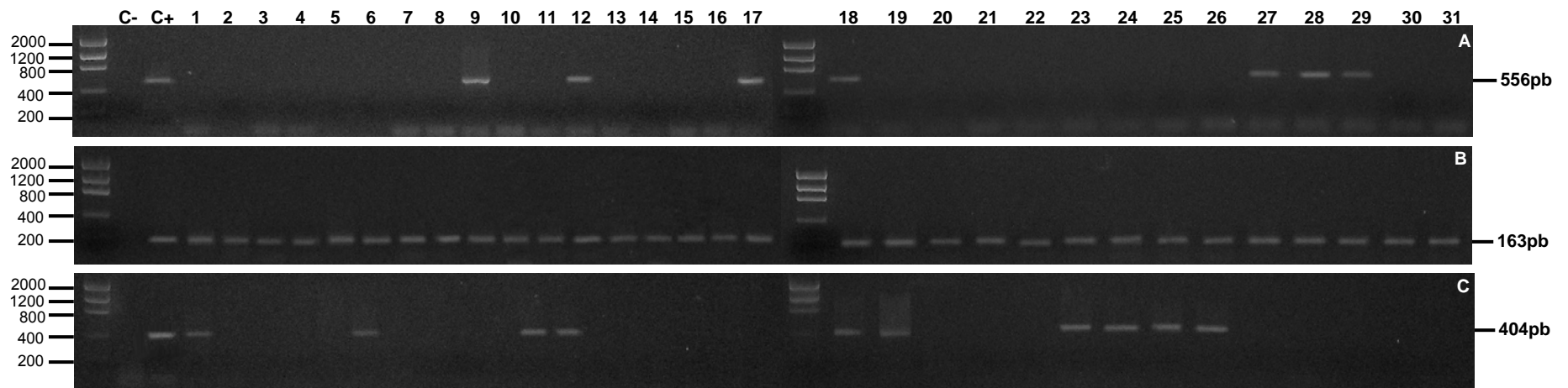


Figura 5.3 -Gel de agarose a 2% mostrando a amplificação do DNA das bactérias, de acordo com o controle positivo (C+) da *Aa* (556pb), *Pi* (163pb) e *Pg* (404pb). (A) amplificação da *Aa* das amostras do grupo experimental 9 e 12, e do grupo controle 17, 18, 27, 28, 29. (B) amplificação da *Pi* de todas amostras do grupo experimental e controle. (C) amplificação da *Pg* das amostras do grupo experimental 1, 6, 11, 12, e do grupo controle 18, 19, 23, 24, 25, 26

A análise estatística por meio do Teste exato de Fisher não revelou associação estatisticamente significativa entre a presença ou ausência tanto de *Aa* ( $P = 0,39$ ) quanto de *Pg* ( $P = 0,70$ ) e os grupos analisados. O resultado do OR revelou que não existe associação significativa entre a presença de *Aa* (OR = 0,34; IC 95%: 0,05-2,10) e *Pg* (OR = 0,61; IC 95%: 0,13-2,79) no insucesso dos miniparafusos (Tabela 5.1 e 5.2).

Tabela 5.1 - Associação do *Aa* entre os grupos analisados

Grupo	<i>Aa</i> (frequência esperada)			P valor	OR (95% IC)
	Presença	Ausência	Total		
<b>Experimental</b>	2 (3,4)	13 (11,6)	15 (15,0)	0,39	0,34 (0,05-2,10)
<b>Controle</b>	5 (3,6)	11 (12,4)	16 (16,0)		
<b>Total</b>	7 (7,0)	24 (24,0)	31 (31,0)		

$\alpha = 0,05$ , teste exato de Fisher

Tabela 5.2 - Associação do *Pg* entre os grupos analisados

Grupo	<i>Pg</i> (frequência esperada)			P valor	OR (95% IC)
	Presença	Ausência	Total		
<b>Experimental</b>	4 (4,8)	11 (10,2)	15 (15,0)	0,70	0,61 (0,13-2,79)
<b>Controle</b>	6 (5,2)	10 (10,8)	16 (16,0)		
<b>Total</b>	10 (10,0)	21 (21,0)	31 (31,0)		

$\alpha = 0,05$ , teste exato de Fisher

## 6 DISCUSSÃO

A literatura tem citado entre as principais causas do insucesso dos implantes dentários a contaminação por bactérias nos tecidos periimplantares e isto levaria ao desenvolvimento da periimplantite (BECKER et al., 1990; HOLT et al., 1986; LEITÃO et al., 2005; MOMBELLI et al., 1987; RAMS; LINK Jr., 1983; ROSENBERG; TOROSIAN; SLOTS, 1991). No entanto, não há relatos sobre as causas de insucesso na colocação dos miniparafusos para ancoragem óssea. Assim, este trabalho avaliou pela primeira vez a presença de periodontopatógenos (*Aa*, *Pi* e *Pg*) em amostras de sucesso e insucesso na colocação dos miniparafusos para ancoragem óssea.

A osseointegração em implantes dentários já foi demonstrada na literatura por Davies (1998, 2003). O autor explica que o fenômeno de deposição óssea durante a cicatrização em superfície lisa e polida de titânio, semelhante a do miniparafuso, é possível e parte do osso circundante em direção ao titânio. Isto pode ser explicado pelo fato do coágulo depositado na superfície do titânio sofrer grande retração, e desprender-se da superfície lisa do implante. Esta condição não favorece o começo da formação da matriz na superfície de titânio e sua sucessiva calcificação. Em contrapartida, alguns autores (LIOU; PAI; LIN, 2004; MAINO; MURA; BEDNAR, 2005) não acreditam que possa haver osseointegração dos miniparafusos. Eles sugerem que os mesmos apresentem estabilidade primária, isto é, retenção por embricamento mecânico, uma vez que servirão de ancoragem óssea temporária, sendo removidos após sua função no tratamento ortodôntico. Ora, se ocorre osseointegração, como se explica a fácil remoção? A fácil remoção pode ser

explicada pela menor resistência ao torque de remoção como demonstraram os estudos de implantes dentários com superfície lisa e rugosas de Buser et al. (1999), Claes, Hutzschenreuter e Pohler (1976) e Wilke, Claes e Steinemann (1990).

Este estudo não visa elucidar o tipo de tecido formado na interface da superfície de titânio dos miniparafusos e osso alveolar, pois existe a necessidade de estudos histológicos específicos para avaliar a osseointegração. Porém, confirma os achados dos estudos de implantes dentários (Di IORIO, et al., 2005; TRAINI et al., 2005) mostrando a formação de coágulo sobre a superfície de titânio no grupo controle, ao passo que no grupo experimental não foi observado a formação de coágulo quando analisado por MEV. A avaliação da superfície dos miniparafusos mostrou diferença no tipo de células aderidas nos grupos estudados. No grupo controle, foi observada a presença de células do processo inflamatório inicial (hemácias), além da formação de fibras (Figura 5.1B e D), características do coágulo para a remodelação da interface titânio-osso alveolar, por todo o corpo dos miniparafusos. Estas características sugerem a presença de osseointegração. Outro dado que reforça esta hipótese é o fato de ter havido torque de remoção para a retirada dos miniparafusos. Esta resistência para desparafusar os miniparafusos é indicativa da união do titânio com o osso. Já para as amostras do grupo experimental, foi observada a presença de infiltrado inflamatório (glóbulos brancos) (Figura 5.2 C), ausência de coágulo sanguíneo e mobilidade, o que conseqüentemente não produziu torque de remoção. Foi ainda verificada nesse grupo a presença de bacilos aderidos que poderiam estar relacionados ao insucesso dos miniparafusos (Figura 5.2 D).

Os estudos de Holt et al. (1986), Mombelli et al. (1987) e Rams e Link Jr. (1983) mostraram a presença predominante de bactérias em forma de bacilo associadas a periimplantite.

Para afirmar se estes bacilos estão relacionados com o insucesso dos miniparafusos, foi necessário fazer a identificação destes microorganismos. A escolha dos microorganismos neste estudo baseou-se nos trabalhos de implantes dentários de Ötke et al. (1999), bem como os estudos de Kuula et al. (2004), que mostraram a adesão de bacilos gram-negativos anaeróbios em superfície lisa de titânio. No primeiro estudo foi observada a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. No segundo trabalho, a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. A identificação por meio de método de DNA destes mesmos microorganismos em sítios de implantes dentários que tiveram insucesso foi realizada por Becker et al. (1990).

Outro dado que nos levou a escolha destas bactérias foi a semelhança da microbiota da periodontite e periimplantite (De LORENZO, 2004). Os estudos envolvendo maior variedade de bactérias relacionadas a periodontite e periimplantite mostraram porcentagem mais alta de bacilos, *Pg* e *Pi*, quando comparada com outras bactérias também avaliadas e relacionadas a periodontite e associadas à perda de implantes dentários (MOMBELLI et al., 1987; ROSENBERG; TOROSIAN; SLOTS, 1991).

Os achados da técnica PCR neste estudo, mostraram que a *Pi* esteve presente em todas as amostras, tanto do grupo controle quanto do experimental

(Figura 5.3 B). Este dado se confronta com o que vem sendo mostrado na literatura quando comparados aos implantes dentários que apresentaram sucesso com implantes que apresentaram insucesso e estudos caso-controle de periodontite (ASHIMOTO et al., 1996; MOMBELLI et al., 1987). Curiosamente, a *Pg* e *Aa* foram mais expressas no grupo controle do que nos casos de insucesso (Figura 5.3 A e C), sugerindo que as bactérias *Pg* e *Aa*, em particular, não estejam relacionadas com a periimplantite, confirmando assim os resultados obtidos no estudo de Leitão et al. (2005). Isto sugere que estas bactérias não sejam as responsáveis pelo insucesso da ancoragem óssea dos miniparafusos. É necessário o estudo de outras bactérias para concluir que a microbiota bucal esteja associada ao processo analisado.

O insucesso na ancoragem óssea dos miniparafusos ortodônticos pode ser atribuído a fatores relacionados com o protocolo de colocação utilizado, tais como o operador, a contaminação local, o aquecimento ósseo, entre outros fatores. Para descartar estes fatores, neste trabalho, os miniparafusos foram colocados por um único operador e com um protocolo padrão Morea et al. (2005). Apesar disso, não se pode descartar a influência das reações biológicas individuais dos pacientes frente ao tratamento sobre o insucesso do procedimento.

Para a coleta da amostra, os pacientes realizaram bochecho de clorexidina 0,12% por 1min a fim de evitar que a microbiota bucal pudesse influenciar no resultado deste estudo. Contudo, deve-se levar em consideração a hipótese de que as bactérias presentes na cabeça dos miniparafusos possam ter morrido e ficado aderidas. Provavelmente, porque a clorexidina, apesar de ser bactericida, não tem o poder de remover as bactérias presentes sobre a superfície dos miniparafusos. Cabe



lembrar aqui que a técnica PCR identifica, inclusive, DNA de bactérias mortas. Assim, pode ter havido a amplificação das bactérias que foram mortas com o bochecho de clorexidina. O fato da técnica PCR também amplificar bactérias mortas mostra uma falha desta técnica quando existe a necessidade de detectar apenas bactérias vivas atuantes no processo inflamatório.

A associação da técnica PCR com o método de cultura poderia auxiliar na identificação das bactérias vivas e verificar se estas participaram realmente do processo inflamatório. No entanto, os estudos que utilizam método de cultura para bactérias anaeróbias, necessitam de meio específico e cuidados com a atmosfera de incubação de oxigênio. A justificativa para utilizarmos da técnica PCR vem pelo fato desta técnica se mostrar mais rápida, eficaz, sensível e reprodutível.

Também deve ser considerado que os resultados deste estudo poderiam ser mascarados pelo n da amostra. No entanto, o n deste estudo estava vinculado à porcentagem de insucesso de miniparafusos da amostra estudada na Clínica de Pesquisa MBT. O aumento do n da amostra talvez pudesse trazer maiores esclarecimentos da participação destas bactérias no processo da periimplantite.

## 7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados da MEV e da PCR deste trabalho permitiu desenvolver as seguintes conclusões:

7.1 Foram encontradas colônias de bacilos aderidas à superfície dos miniparafusos do grupo experimental em MEV, não sendo detectada a presença das mesmas no grupo controle.

7.2 Foram identificados os periodontopatógenos em ambos os grupos.

7.2.1 A amplificação do DNA das amostras demonstrou que a *Aa* ocorreu em 31,25% no grupo controle, em contraste com o grupo experimental que amplificou apenas 13,33%.

7.2.2 A *Pg* ocorreu em 37,4% para as amostras do grupo controle e 33,33% no grupo experimental.

7.2.3 A *Pi* foi observada em todas as amostras de ambos os grupos.

7.3 Este estudo sugere que estas bactérias, em específico *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, não sejam a causa da periimplantite isoladamente. A análise estatística mostrou que não houve associação significativa da presença da *Aa* e da *Pg* com o insucesso dos miniparafusos. É necessária a utilização de um maior número de amostras para melhor entendimento sobre a presença desses microorganismos nos casos de insucesso dos miniparafusos.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11(4):266-73.

Avila-Campos MJ. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. *Braz J Microbiol* 2003;34(1):81-4.

Avila-Campos MJ, Velásquez-Meléndez G. Prevalence of putative periodonpathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002;44(1):1-5.

Bae SM, Park YS, Kyung HM, Kwon OW, Sung JH. Clinical application of micro-implant anchorage. *J Clin Orthod* 2002;36(5):298-302.

Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5(1):31-8.

Brånemark PI, Adell, R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3(2):81-100.

Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Influence shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1999;45(2):75-83.

Claes L, Hutzschenreuter P, Pohler O. The dependence of the removal torque of a leg screw, a screw surface and implantation time. *Arch Orthop Unfallchir.* 1976;85(2):155-9.

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11(4):391-401.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003;67(8):932-49.

De Lorenzo JL. *Microbiologia para estudantes de odontologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004.

Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piatelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74(1):636-42.

Freudenthaler JW, Haas R, Bantleon HP. Bicortical titanium screws for critical orthodontic anchorage in the mandible: a preliminary report on clinical applications. *Clin Oral Impl Res* 2001;12(4):358-63.

Gainsforth BL, Higley LB. A study of orthodontic anchorage possibilities in basal bone. *Am J Orthod Oral Surg* 1945;31:406-17.

Herman R, Cope JB. Miniscrew implants: IMTEC mini ortho implant. *Semin Orthod* 2005;11:32-9.

Holt R, Newman MG, Kratochvil F, Jeswani S, Bugler M, Khorsandi S, et al. The clinical and microbial characterization of peri-implant environment [abstract 703]. *J Dent Res* 1986;65(spec issue):247.

Justens E, De Bruyn H. Clinical outcome of mini-screws used as orthodontic anchorage. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10(3):174-80.

Kanomi R. Mini-implant for orthodontic anchorage. *J Clin Orthod* 1997;31(11):763-67.

Kuula H, Könönen E, Lounatmaa K, Konttinen YT, Könönen M. Attachment of oral gram-negative anaerobic rods to a smooth titanium surface: an electron microscopy study. In *J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(6):803-6.

Lee SM, Yoo SO, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, et al. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol* 2005;43(3):260-5.

Leitão JAO, De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ, Sendyk WR. Analysis of the presence of pathogens which predict the risk of disease at peri-implant sites through polymerase chain reaction (PCR). *Braz Oral Res* 2005;19(1):52-7.

Liou EJ, Pai BCJ, Lin JCY. Do miniscrews remain stationary under orthodontic forces? *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126(1):42-7.

Maino BG, Mura P, Bednar J. Miniscrews implants: The Spider screw anchorage system. *Semin Orthod* 2005;11:40-6.

Malheiros VJ, Avila-Campos MJ. Detection of pathogens from periodontal lesions. *Rev Saúde Pública* 2004;38(5):723-8.

Marassi C, Leal A, Herdy JL. Mini-implante como método de ancoragem em Ortodontia. 2004. Disponível em: <http://www.miniimplante.com/internas/revista.htm> [2 jun. 2007].

Melsen B, Verna C. Miniscrew implants: The Aahurs anchorage system. *Semin Orthod* 2005;11:24-31.

Melsen B, Verna C. A rational approach to orthodontic anchorage. *Program Orthod* 1999;1:10-22.

Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T, Takano-Yamamoto T. Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124(4):373-8.

Misch CE. *Prótese sobre implantes*. Trad. de Paulo Henrique Orlato Rossetti et al. São Paulo: Editora Santos; 2006.

Mombelli A, Van Oosten MAC, Schürch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2(4):145-51.

Morea C, Domínguez GD, Wuo AV, Tortamano A. Surgical guide for optimal positioning of mini-implants. *J Clin Orthod* 2005;39(5):317-21.

Morea C, Domínguez GC, Tortamano A, Vigorito JW. Frequency and cause of failure of miniscrews for orthodontic absolute anchorage. *Eur J Orthod* 2007;29(5):e27-e28.

Disponível em: <http://ejo.oxfordjournals.org/content/vol29/issue5/index.dtl> [14 nov. 2007].

Mullis KB, Fallona FA, Sharf S, Saiki RK, Hom GT, Erlich HA. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51(Pt1):263-73.

Nisengard RJ, Newman MG. *Microbiologia oral e imunologia*. 2ª ed. Trad. de José Freitas Siqueira Júnior. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Okada M, Hayashi F, Soda Y, Xiabo Z, Miura K, Kozai K. Intra-familial distribution of nine putative periodontopathogens in dental plaque samples analyzed by PCR. *J Oral Sci* 2004;46(3):149-56.

Ohnishi H, Yagi T, Yasuda Y, Takada K. A mini-implant for orthodontic anchorage in a deep overbite case. *Angle Orthod* 2005;75:444:52.

Orenstein IH, Tarnow DP, Morris HF, Ochi S. Factors affecting implant mobility at placement and integration of mobile implants at uncovering. *J Periodontol* 1998;69(12):1404-12.

Ötke E, Sultan N, Doğan B, Asikainen S. Bacterial adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to titanium implants: SEM evaluation. A preliminary report. *J Periodontol* 1999;70(11):1376-82.

Park HS, Kyung HM, Sung JH. A simple method of molar uprighting with micro-implant anchorage. *J Clin Orthod* 2002;36(10):592-96.

Park HS. Intrusión molar con anclaje de microimplantes (MIA, Micro-Implant Anchorage). *Ortod Clin* 2003;6(1):31-6.

Park HS, Kwon TG, Kwon OK. Treatment of open bite with miniscrew implant anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126(5):627-36.

Park HS, Kwon OW, Sung JH. Micro-implant anchorage for forced eruption of impacted canines. *J Clin Orthod* 2004a;38(5):297-302.

Park HS, Kwon TG, Sung JH. Nonextraction treatment with miniscrew implants. *Angle Orthod* 2004b;74(4):539-49.

Park HS, Lee SK, Kwon OK. Group distal movement of teeth using miniscrew implant anchorage. *Angle Orthod* 2005;75(4):602-9.

Proff P, Steinmetz I, Bayerlein T, Dietze S, Fanghanel J, Gedrange T. Bacterial colonisation of interior implant threads with and without sealing. *Folia Morphol* 2006;65(1):75-7.

Rams TE, Link Jr. CC. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *J Oral Implantol* 1983;11(1):93-101.

Ribeiro EF, Kerbauy WD, Lima FR. Fumar prejudica a osteointegração dos implantes? *Revista da EAP/APCD São José dos Campos – regional*. Revista OnLine. Disponível em: URL: [http://www.apcd.com.br/rev\\_art.asp?path=REVISTA&artigo=41](http://www.apcd.com.br/rev_art.asp?path=REVISTA&artigo=41) [6 jun. 2007].

Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failure of osseointegrated implants. *Clin Oral Impl Res* 1991;2:135-144.

Slots J. *Actinobacillus actionomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. *Periodontology* 2000 1999;20:7-13.

Traini T, Degidi M, Strocchi R, Caputi S, Piatelli A. Collagen fiber orientation near dental implants in human bone: do their organization reflect differences in loading? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74(1):538-46.

Wilke HJ, Claes L, Steinemann S. The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. In: Heimke G, Soltész U, Lee AJC. *Advance in Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1990. v. 9, p. 309-14.

Yao CJ, Lee J, Chen H, Chang CJ, Chang H, Chen Y. Maxillary molar intrusion with fixed appliances and mini-implant anchorage studied in three dimension. *Angle Orthod* 2005;75(5):754-60.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO  
Protocolo 112/07**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PERIODONTOPATÓGENOS NA SUPERFÍCIE DOS MINI-PARAFUSOS ORTODÔNTICOS POR MEIO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**", de responsabilidade da Pesquisadora: **MÔNICA NACAO**, sob orientação do Professor Doutor **ANDRÉ TORTAMANO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 31 de outubro de 2007

  
Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz  
Coordenador do CEP-FOUSP



## ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



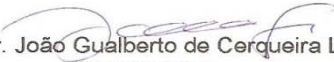
Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia  
Comitê de Ética em Pesquisa

## DECLARAÇÃO

Protocolo 112/07

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a aplicar mais uma metodologia utilizando parte da casuística para realizar o estudo das superfícies dos mini-parafusos por meio de microscopia eletrônica de varredura com a intenção de verificar a presença de colônia dos periodontopatógenos, do projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação da presença de periodontopatógenos na superfície dos mini-parafusos ortodônticos por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)", de responsabilidade da Pesquisadora C.D. Mônica Nacao, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Prof. Dr. André Tortamano.

São Paulo, 09 de novembro de 2007.

  
Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz  
Coordenador

## ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia  
Comitê de Ética em Pesquisa

**DECLARAÇÃO**  
Protocolo 112/07

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a alteração do título do projeto "AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PERIODONTOPATÓGENOS NA SUPERFÍCIE DOS MINI-PARAFUSOS ORTODÔNTICOS POR MEIO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)" para " AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PERIODONTOPATÓGENOS NA SUPERFÍCIE DE MINI-PARAFUSOS ORTODÔNTICOS POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) MÔNICA NACAO, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) André Tortamano.

São Paulo, 04 de dezembro de 2008.

  
Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz  
Coordenador CEP/FOUSP