MARIANA UMEKITA SHIROZAKI

**ANÁLISE PERIODONTAL EM PACIENTES SUBMETIDOS À
TRATAMENTO ORTODÔNTICO CORRETIVO: AVALIAÇÃO
CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DA PRESENTE OBRA, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Shirozaki, Mariana Umekita

Análise periodontal em pacientes submetidos à tratamento ortodôntico corretivo: avaliação clínica, microbiológica e imunológica. Ribeirão preto, 2018.

102p. : il.; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.

1. Gengivite. 2. Ortodontia corretiva. 3. Periodontia. 4. biofilme

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA UMEKITA SHIROZAKI

ANÁLISE PERIODONTAL EM PACIENTES SUBMETIDOS À TRATAMENTO ORTODÔNTICO CORRETIVO: AVALIAÇÃO CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

MARIANA UMEKITA SHIROZAKI

Nascimento	06 de outubro de 1986 – Brasília/DF
Filiação	Riuiti Shirozaki Nilza Umekita Shirozaki
2006 - 2009	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP
2007 - 2008	Iniciação Científica – bolsista Fapesp Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP “Osteogênese in vitro sobre titânio com superfície macroporosa” Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti
2010-2012	Curso de Especialização em Ortodontia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Monografia: “Quantificação de estreptococos do grupo mutans, em diferentes tipos de amarrilhos conjugados e elásticos em cadeia - estudo in vivo”
2015-2017	Mestrado em Ciências Área de concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto na Universidade de São Paulo – FORP/USP Dissertação: “Análise periodontal em pacientes submetidos à tratamento ortodôntico corretivo: avaliação clínica, microbiológica e imunológica”

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher"

(Cora Coralina)

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, **Paulo e Nilza**, pelo apoio incondicional e dedicação constante. Por fazerem dos meus sonhos os seus e lutarem ao meu lado, sempre acreditando e me ajudando quando preciso. Obrigada por todo o apoio, por proporcionar a melhor educação além de amor e carinho constantes. Pelos ensinamentos e exemplo de que as conquistas são alcançadas por meio de muito trabalho, determinação e esforço, sempre respeitando ao próximo e aos valores éticos e morais.

Aos meus irmãos, **Paulo e Henrique**, pelo companheirismo e amor fraterno de sempre. Pelos momentos inesquecíveis e conselhos que contribuíram para meu crescimento e amadurecimento. Às minhas cunhadas, **Halanna e Cláudia**, por serem tão companheiras, pelo carinho e relação fraterna de sempre.

Ao **José Luís**, pelo amor, companheirismo, carinho e paciência durante essa conquista, por me apoiar, me acalmar e por todas as palavras de incentivo quando eu precisava.

Por essas e muitas outras razões que sinto orgulho e tenho gratidão enorme em tê-los ao meu lado, e nada mais justo do que dedicar essa conquista a vocês.

A

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador, **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**, pelos ensinamentos nesses dois anos. Foi uma honra ter como orientador um professor dedicado e um pesquisador reconhecido e excepcional. Obrigada por fazer desta caminhada um período de muito crescimento e amadurecimento, me fazendo acreditar sempre na minha capacidade e na realização desse trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual diretora **Prof^á. Dr^a. Lélia Assed Bezerra da Silva** e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Prof^á. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato**.

Ao **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**, por todo o apoio durante esse período. Pelo exemplo de professor atencioso e dedicado. Agradeço pelas inúmeras dicas, conselhos e ensinamentos que me fizeram amadurecer e melhorar a cada aula apresentada, a cada paciente atendido. Obrigada por todo o suporte e conhecimento passado nessa etapa tão importante para minha formação.

Ao corpo docente do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof^á. Dr^a. Aldevina Campos de Freitas**, **Prof^á. Dr^a. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Prof^á. Dr^a. Kranya Victória Díaz-Serrano**, **Prof^á. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Prof^á. Dr^a. Maria Cristina Borsatto**, **Prof^á. Dr^a. Andara de Rossi Daldegan**, **Prof^á. Dr^a. Maria Bernadete Sasso Stuaní**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof^á. Dr^a. Mírian Aiko Nakane Matsumoto** e **Prof^á. Dr^a. Maria da Conceição Pereira Saraiva** pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica e científica.

Em especial aos professores **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano** e **Prof^a. Dr^a. Mírian Aiko Nakane Matsumoto**, que estão comigo desde quando escolhi a Ortodontia como especialidade para minha vida. Não tenho palavras para agradecer o quanto fizeram por e para mim durante toda a minha formação como ortodontista e como pessoa. Serei eternamente grata pelo apoio, pelos milhares de conhecimentos preciosos, que me fizeram cada vez mais me apaixonar por essa especialidade. Obrigada por me passarem o exemplo de profissionais dedicados, professores atenciosos e pessoas de caráter.

Agradeço aos professores do Curso de Especialização de Ortodontia da FORP-USP, **Prof^a. Dra. Carla Enoki** e **Prof. Dr. Adilson Tomasin** pela convivência amistosa em todos esses anos, pelo conhecimento e admiração à ortodontia. Ao **Prof. Marcelo Antônio Mestriner**, obrigada pela confiança, apoio e estímulo constante. Serei eternamente grata pela oportunidade de crescimento profissional, pelos conhecimentos transmitidos e por me fazer acreditar na minha capacidade sempre; à **Prof^a. Dra. Marcela Cristina Damião Andrucioli**, minha gratidão por todos os ensinamentos e momentos de aprendizado, por todos os conselhos dados sempre que precisei e, principalmente, pela amizade e carinho.

Ao **Prof. Dr. Michel Reis Messorá**, do Departamento de Traumatologia e Cirurgia Buco-maxilo-facial e Periodontia, pelos ensinamentos e auxílio prestados para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos professores da banca e suplentes, por terem aceito o convite e pela atenção dispensada na leitura a dissertação.

Aos pós-graduandos em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, principalmente àqueles da minha turma de mestrado pela convivência, pela amizade, por todos os momentos que pudemos passar juntos.

Às técnicas **Nilza Letícia Magalhães** e **Milla Sprone Tavares**, por todo auxílio e ensinamento durante a realização de todos os experimentos laboratoriais, além da convivência amistosa.

À **Profª. Dra. Magda Feres** e à técnica **Izilvânia Barros** da Universidade de Guarulhos pela recepção e realização das análises microbiológicas.

À **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, secretária da pós-graduação do departamento de Clínica Infantil, por todo apoio que meu deu durante o período do mestrado. Pelos vários momentos que precisei e que, com muita atenção, me auxiliou, além de todos os momentos de descontração e amizade. Obrigada por tudo!

À **Rosemary Alves de Sá**, secretária do curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por todos os momentos em que precisei por tudo o que fez por mim, pelos momentos diários de convivência sempre com muita descontração e alegria. Por se tornar uma amiga e companheira nessa jornada.

À **Filomena Leli Pacciti** e **Matheus Morelli Zanela**, funcionários do Departamento de Clínica Infantil, pelo suporte e auxílio dado a mim sempre que precisei.

Aos **alunos** do curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo que, sempre que preciso, me auxiliaram para que pudesse realizar este trabalho.

Aos **pacientes** atendidos pelo curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo que se dispuseram a participar da pesquisa de forma sempre solícita e disponível, permitindo que o desenvolvimento científico.

Aos **funcionários** de Departamento de Clínica Infantil, da seção de Pós-graduação, das clínicas de atendimento, enfim, todos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo que ajudaram para que este trabalho pudesse ser realizado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida durante período de Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho e, também, àqueles que passaram por minha vida durante este período que foi de muito aprendizado e crescimento. Muito obrigada.

RESUMO

SHIROZAKI, MU. **Análise periodontal em pacientes submetidos à tratamento ortodôntico corretivo: avaliação clínica, microbiológica e imunológica.** Ribeirão Preto, 2018. 102p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O biofilme é um dos fatores primários para o desenvolvimento da gengivite, periodontite e outras alterações na saúde gengival do paciente. O tratamento ortodôntico é um fator predisponente para adesão de microrganismos deixando o paciente susceptível ao maior acúmulo de biofilme e, conseqüentemente, às doenças periodontais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações clínicas, microbiológicas e imunológicas no paciente em tratamento ortodôntico corretivo e testar as hipóteses nulas: 1 - não há diferença nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos antes e durante o tratamento ortodôntico, 2 – não há correlação entre os índices clínicos e imunológicos. Em 28 pacientes com necessidade de tratamento ortodôntico corretivo foram avaliados parâmetros clínicos como índice de Placa (IP), índice de Sangramento (IS), largura de gengiva queratinizada (LGQ); parâmetros microbiológicos por meio da contagem de 40 espécies subgengivais em amostras de biofilme (*Checkerboard DNA-DNA Hybridization*) e avaliação imunológica por meio da expressão dos níveis de Interleucina-1 β (IL-1 β), metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) no Flúido Crevicular Gengival (FCG) (Luminex). Foram realizadas coletas em 3 momentos: T0 = antes da colocação do aparelho; T1 = 6 meses após e T2= 12 meses após o início do tratamento. Para as análises clínicas e microbiológicas foram aplicados teste de Friedman e Wilcoxon com correção de Bonferroni e para a análise imunológica, Análise de variância para medidas repetidas. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para a LGQ. IP apresentou aumento, sendo estatisticamente significativa em T1 ($70,58 \pm 28,56$) e T2 ($83,23 \pm 12,30$) quando comparados ao T0 ($24,44 \pm 11,56$). O IS apresentou aumento estatisticamente significativo em T1 ($7,97 \pm 5,04$) e diminuição em T2 ($6,20 \pm 4,09$), demonstrando valores sem diferença estatisticamente significativa a T0 ($4,54 \pm 4,98$). Na análise microbiológica, dentre os seis complexos analisados, apenas o complexo vermelho apresentou frequência significativamente maior ($p=0,001$) em T2. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores dos níveis das citocinas avaliadas, entre todos os tempos ($p>0,05$), porém em T2 houve correlação positiva moderada entre IS e IL-1 β ($r=0,49$ $p=0,01$) e TNF- α ($r=0,39$ e $p=0,05$). As hipóteses nulas foram rejeitadas. O tratamento ortodôntico corretivo causou alterações periodontais clínicas com relação ao acúmulo de biofilme e sangramento gengival, alterações de bactérias periodontopatogênicas, além de gengivite após 6 meses de tratamento.

Palavras-chave: gengivite, ortodontia corretiva, periodontia, biofilme

RESUMO

SHIROZAKI, MU. **Periodontal analysis in patients submitted to orthodontic treatment: clinical, microbiological and immunological evaluation.** Ribeirão Preto, 2018. 102p. Master Dissertation – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

ABSTRACT

The biofilm is one of the primary factors for the gingivitis and periodontitis development and changes in periodontal health. Orthodontic treatment is a predisposing factor for microorganisms adhesion leaving the patient susceptible to greater biofilm accumulation and, consequently, to periodontal diseases. Therefore, the study aimed to analyze clinical, microbiological and immunological parameters in patients in orthodontic treatment. The null hypothesis tested were: 1 - there is no difference in clinical, microbiological and immunological parameters before and during orthodontic treatment; 2 – there is no correlation between clinical and immunological parameters. In twenty-eight patients with corrective orthodontic treatment were evaluated clinical parameters, such as Plaque index (PI), Bleeding on Probing (BOP) and width of keratinized gingiva; microbiological parameters with counting of 40 subgingival species with Checkerboard DNA-DNA hybridization and immunological evaluation of cytokines levels IL-1 β , MMP-8 and Tumor Necrosis Factor (TNF- α) in Gingival Crevicular Fluid (GCF). Samples were collected in three times: T0 = before orthodontic treatment; T1 = 6 months after and T2 = 12 months after starting orthodontic treatment. Data from clinical and microbiological evaluation were statistically analyzed with Friedman and Wilcoxon tests with Bonferroni correction and for the immunological analysis, Analysis of variance for repeated measures were applied. No significant difference was found for the width of keratinized gingiva. PI presented an increase, being statistically significant at T1 (70.58 ± 28.56) and T2 (83.23 ± 12.30) when compared with T0 (24.44 ± 11.56). The BOP showed a statistically significant increase at T1 (7.97 ± 5.04), however, at T2 (6.20 ± 4.09) the values decrease with no statistically significant difference with T0 (4.54 ± 4.98). In the microbiological analysis, the red complex showed significantly greater frequency ($p=0.01$) at T2. There was no statistically significant difference in the cytokine levels between the times, but there was a positive moderate correlation between BOP and IL-1 β ($r=0.49$ $p=0.01$) and TNF- α ($r=0.39$ e $p=0.05$). The null hypothesis were rejected. Corrective orthodontic treatment caused clinical periodontal changes regarding biofilm accumulation and gingival bleeding, alterations of periodontopathogens, besides gingivitis after 6 months of treatment.

Key words: gingivitis, orthodontics; periodontology, biofilm

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aparelho <i>Minislot 30</i> (Immunetics, Cambridge, MA, EUA)	58
Figura 2.	Aparelho <i>Miniblotter 45</i> (Immunetics, Cambridge, MA, EUA).....	59
Figura 3.	Membrana colocada em cassete de RX, sobre um filme radiográfico para revelação e obtenção dos sinais de quimioluminescência.....	60
Figura 4.	Representação esquemática da hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA.....	61
Figura 5.	frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos analisados nas amostras de biofilme subgengival dos pacientes nos três tempos (T0, T1 e T2).....	68
Figura 6.	Contagens médias das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos três tempos analisados.....	70
Figura 7.	Concentração das citocinas, IL-1 β , TNF- α e MMP-8, no FCG, nos três tempos analisados (T0, T1 e T2). Sem diferença estatisticamente significativa entre os tempos.....	71

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação de cepas bacterianas utilizadas para confecção das sondas de DNA avaliadas pela Técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	57
Tabela 2.	Índice para cada escore utilizado para determinação dos microrganismos as amostras de biofilme subgengival.....	61
Tabela 3.	Médias dos parâmetros clínicos periodontais ($\pm$ desvio padrão) em T0, T1 e T2 do tratamento ortodôntico corretivo.....	67
Tabela 4.	Concentração das citocinas IL-1 β , TNF- α e MMP-8 (pg/mL) no FCG (média $\pm$ desvio padrão), expressos em Log, em T0, T1 e T2.....	71
Tabela 5.	Correlação entre IP e níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α e MMP-8), calculado por meio de Coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman.....	72
Tabela 6.	Correlação entre IS e níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α e MMP-8), calculado por meio de Coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman.....	72

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	39
2. PROPOSIÇÃO	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Aspectos éticos.....	53
3.2 Casuística	53
3.3 Seleção dos pacientes	53
3.4 Delineamento experimental	54
3.4.1 Parâmetros clínicos.....	54
3.4.2 Parâmetros microbiológicos.....	55
3.4.3 Parâmetro imunológico	62
3.5 Análise estatística	63
4. RESULTADOS	65
4.1 Parâmetros clínicos	67
4.2 Parâmetros microbiológicos	67
4.3 Parâmetros imunológicos	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	99

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal apresenta grande quantidade de microrganismos, tais como bactérias, vírus e protozoários que permanecem em equilíbrio biológico. Quando, por algum motivo, este equilíbrio é quebrado algumas doenças periodontais podem se manifestar (1-3).

Doenças periodontais são doenças inflamatórias que afetam os tecidos de suporte dos dentes. As doenças gengivais podem ser induzidas ou não pelo acúmulo de biofilme. As induzidas pelo biofilme podem ser classificadas em: (1) gengivites associadas apenas ao acúmulo de biofilme, com ou sem associação de fatores locais; (2) modificadas por fatores sistêmicos, como alterações endócrinas e doenças sanguíneas; (3) modificadas por medicamentos ou (4) por quadros de desnutrição. Elas se caracterizam pela presença de sinais clínicos como rubor e edema do tecido gengival, sangramento à sondagem, alterações de contorno e consistência, presença de biofilme ou cálculo, ausências de perda de inserção conjuntiva e de alteração radiográfica com perda de tecidos de suporte e ósseo. Por outro lado, as periodontites são quadros infecciosos nos tecidos de sustentação do dente causando perda progressiva do tecido de suporte e, em casos graves sem tratamento, podem levar a perda do elemento dentário (4-7).

Segundo Kelly & Sanchez (1972), nos EUA, 40% das crianças entre 6 e 11 anos de idade apresentavam certo grau de gengivite, com inflamação pequena e acometimento de alguns dentes. Nas crianças entre 14 e 17 anos de idade a porcentagem de gengivite foi de, aproximadamente, 60% (9). Em estudo realizado em 2012, Eke et al. analisaram a prevalência de periodontite em uma população com 35 anos ou mais, e, do total de 29,4% das pessoas com periodontite, 4,8% apresentaram elevado grau de severidade, 17,5% grau moderado e 7,0% foram classificadas com periodontite de grau leve. No Brasil, Chambrone et al. (2010) analisando 206 crianças com idade entre 7 e 14 anos, observaram que todas apresentavam inflamação gengival, sendo 46,1% com gengivite leve e 53,9% com moderado grau de inflamação. Embora a prevalência de gengivite e periodontite em regiões do Brasil e do mundo apresente variação, a inflamação presente está

diretamente relacionada ao acúmulo de biofilme e, conseqüentemente, ao sangramento gengival.

O biofilme é considerado fator primário para as alterações na saúde gengival do paciente e para o desenvolvimento das doenças periodontais. Socransky et al. (1998) descreveram diferentes associações de espécies bacterianas presentes no biofilme subgengival, as classificaram em complexos e suas relações com saúde e doença periodontal. As espécies bacterianas foram classificadas dentro dos principais complexos, denominados de vermelho, laranja, verde, amarelo, roxo e azul, além do grupo de espécies não-classificadas em complexos e consideradas como "outras espécies". Os autores afirmaram que bactérias dos complexos amarelo, verde, roxo e azul apresentavam relação entre si e foram associadas ao início da formação do biofilme podendo ser encontradas em sítios gengivais saudáveis, precedendo a formação dos complexos laranja e vermelho. Estes complexos estão relacionados entre si, sendo o laranja com menor potencial agressivo do que o vermelho e foram associados às doenças periodontais.

Vários estudos têm sido realizados a fim de entender a formação do biofilme e definir as espécies bacterianas mais relacionadas às doenças periodontais (12-15). Checci et al. (2016) avaliaram seis espécies bacterianas e puderam observar que espécies dos complexos vermelho, laranja e *A. actinomycetemcomitans* têm maior probabilidade de estarem presentes quando há sangramento à sondagem e maior profundidade desta sondagem. Esses autores observaram ainda a associação da presença de *T. denticola* e *T. forsythia*, bactérias do complexo vermelho quando ocorreu sangramento à sondagem.

As doenças periodontais, além das alterações clínicas e microbiológicas, promovem também mudanças no perfil imunológico do hospedeiro gerando resposta inflamatória nos tecidos e com isso aumento de citocinas pró e anti-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e Interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10) (17-19). Zhang et al. (2016) compararam vários biomarcadores no fluido crevicular de pacientes periodontalmente saudáveis, com periodontite crônica e periodontite agressiva. Observaram que os níveis de IL-6 e TNF- α eram maiores naqueles pacientes que apresentavam as doenças periodontais avaliadas. Esses mediadores químicos liberados são capazes de promover desequilíbrio no tecidos

periodontais e destruição de colágeno via metaloproteinases da matriz, caracterizando progressão para uma doença periodontal mais grave com perda de inserção (21-23). Marcaccini et al. (2010) observaram altos níveis de MMP-8 e MMP-9 no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica comparados aos pacientes saudáveis.

As doenças gengivais causadas pelo acúmulo de biofilme podem ser associadas a diferentes fatores locais como a presença de lesões de cáries, restaurações dentárias mal adaptadas e aparelhos ortodônticos interceptativos e corretivos, uma vez que possibilitam maior acúmulo de biofilme supra e subgengival (25-28). Dentre os fatores locais, os aparelhos ortodônticos, constituídos de bráquetes, arcos, bandas, ligaduras elastoméricas e metálicas, além de outros acessórios, constituem meio de adesão para microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos (29-33), possibilitando que o paciente fique exposto à um maior acúmulo de biofilme e conseqüentemente, às doenças periodontais (34-38).

Alguns estudos demonstraram que a utilização de aparelhos ortodônticos altera negativamente a saúde periodontal e a composição microbiana dos pacientes. Em geral, há mudança nos parâmetros clínicos, tais como maior acúmulo de biofilme e de sangramento à sondagem, hiperplasia gengival, aumento na profundidade de sondagem e, frequentemente, inflamação e sangramento gengival como sinais do início de um quadro periodontal desfavorável (37, 39-42). É importante destacar que alguns desses estudos afirmaram que as alterações negativas que ocorrem na saúde periodontal do paciente durante o tratamento ortodôntico podem retornar ao seu estado de normalidade após a retirada do aparelho sem perda permanente dos tecidos de suporte (43, 44).

Naranjo et al., em 2006, avaliaram parâmetros clínicos de pacientes em tratamento ortodôntico e observaram que houve, além do aumento nos índices de placa e gengival, colonização importante de bactérias periodontopatogênicas e superinfeciosas que resultaram em inflamação e sangramento gengival, após a colagem dos bráquetes ortodônticos. Outro sinal clínico comum durante o tratamento ortodôntico é a hiperplasia gengival. Segundo Van Gastel et al. (2007), a profundidade de sondagem geralmente se apresenta maior a cada avaliação realizada durante o tratamento ortodôntico, devido a alteração que ocorre na

gengiva. Gong et al., em 2011, analisaram pacientes com saúde periodontal e pacientes com hiperplasia gengival e concluíram que aqueles que apresentavam a hiperplasia tinham índices de placa e de profundidade à sondagem significativamente maiores, além de inflamação gengival associada.

Baka et al. (2013) analisaram bráquetes auto-ligados e convencionais e seus efeitos na condição clínica dos pacientes, além da retenção de biofilme e composição microbiana. Embora não tenha sido observada diferença entre os tipos de bráquetes, houve aumento significativo nos parâmetros clínicos como índice de placa, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem quando comparados aos valores antes da colocação do aparelho ortodôntico. Essas mesmas alterações clínicas são observadas em vários outros estudos, mesmo quando foram analisadas em tempos diferentes e em tratamentos ortodônticos realizados com outros tipos de aparelho (48-51).

Estas alterações clínicas desfavoráveis observadas após o início do tratamento ortodôntico, na maioria das vezes, estão relacionadas às alterações quantitativas e qualitativas da microbiota bucal. Diferentes estudos demonstraram grande acúmulo de microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos, como espiroquetas, bactérias fusiformes, anaeróbias e aeróbias facultativas, lactobacilos, como *F. nucleatum*, *T. denticola*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* (26, 52-55). Pan et al. (2017) analisaram o perfil microbiológico do biofilme subgengival de pacientes ortodônticos e observaram que a quantidade de *P. intermedia* foi significativamente maior no grupo com aparelho ortodôntico comparado ao grupo controle. Relacionado a isso obteve também maior índice de profundidade à sondagem. À semelhança deste trabalho, Ristic et al. (2007) analisaram os efeitos na composição microbiológica do biofilme subgengival de pacientes ortodônticos e concluíram que o número máximo de bactérias ocorreu aos 3 meses após o início do tratamento ortodôntico, dentre elas *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

Na ortodontia, diferentes técnicas para análise microbiológica já foram utilizadas para detecção de bactérias em aparelhos removíveis e fixos, entre elas estão a cultura microbiana (32, 45, 57) e microscopia eletrônica de varredura (35). Além disso, técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase

(PCR) (58, 59) e *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* (60-63) também podem ser utilizadas para detectar a presença de várias espécies de bactérias em amostras de biofilme. Nelson-filho et al. (2012) analisaram a presença de bactérias *A. actinomycetemcomitans* em bráquetes metálicos por meio do método de *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e concluíram que todos eles apresentaram níveis elevados dessa bactéria periodontopatogênica. Porém no grupo em que foi realizado bochechos com clorexidina a 0,12%, duas vezes por semana o nível delas foi significativamente menor. Semelhante a esse estudo, Andrucoli et al. (2012) utilizaram a mesma técnica para analisar 40 sondas de diferentes bactérias em bráquetes metálicos de pacientes 30 dias após a colagem. Observaram colonização não só das bactérias periodontopatogênicas, mas também de bactérias cariogênicas. Com a mesma técnica, Bergamo et al. (2016), avaliaram os níveis de espécies bacterianas na saliva de pacientes e nos bráquetes utilizados no tratamento ortodôntico, após 30 e 60 dias. Observaram aumento significativo de 15 das 22 espécies bacterianas analisadas na saliva. Em relação aos bráquetes, puderam observar que os diferentes tipos de bráquetes (auto-ligados e convencionais) influenciaram os níveis de bactérias envolvidas com a doença periodontal, sendo que bráquetes auto-ligados apresentaram maior incidência daquelas que constituem os complexos laranja e vermelho.

Além das alterações microbiológicas e clínicas que o paciente apresenta após a colocação do aparelho ortodôntico, também ocorre alteração na composição do Flúido Crevicular Gengival (FCG), no que diz respeito à liberação de biomarcadores inflamatórios. Há produção de citocinas em condições patológicas, que podem ocorrer em reação aos microrganismos presentes, acarretando resposta inflamatória do hospedeiro (65-67) e algumas quimiocinas podem estar relacionadas ao processo de reabsorção e aposição óssea durante o movimento ortodôntico (68-70).

Para análise das alterações imunológicas, algumas técnicas podem ser empregadas. Por meio de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) (71, 72), Giannopoulou et al. (2008) analisaram o FCG de pacientes entre 8 e 20 anos de idade com e sem tratamento ortodôntico e obtiveram concentrações de IL-1 β , IL-4 e IL-8. O grupo sob tratamento ortodôntico apresentou concentrações

significativamente maiores de IL-1 β e IL-8 que estavam relacionadas ao sangramento à sondagem e hiperplasia gengival.

Diferentemente do ELISA, que exige volumes maiores de amostras, o *Luminex®* é uma técnica que permite análise simultânea de várias citocinas em mesma amostra, tornando-se importante, eficiente e de alta sensibilidade para diagnóstico e monitoramento de doenças periodontais (74-76). Shimada et al. (2013), por meio dessa técnica, investigaram 40 diferentes citocinas e quimiocinas em amostras do FCG, simultaneamente e puderam detectar 26 biomarcadores, sendo nove deles com diferença significativa entre sítios saudáveis e sítios com doença ativa.

Van Gastel et al. (2011) monitoraram as alterações microbiológicas e periodontais e relacionaram com as concentrações de citocinas no FCG de pacientes em tratamento ortodôntico. Observaram aumento da patogenicidade do biofilme e nos parâmetros periodontais, sem diferença estatisticamente significativa nas concentrações das citocinas. Porém, concluíram que as concentrações de Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-8 (IL-8) antes do tratamento ortodôntico mostraram ser um fator predictivo para potencial inflamatório durante o tratamento ortodôntico, com aumento das concentrações e da profundidade de sondagem após 52 semanas.

Pelo exposto, evidencia-se a importância de avaliação de pacientes submetidos a tratamento ortodôntico corretivo e sua influência nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos do tecido periodontal. Vários estudos abordam essas alterações relacionando, geralmente, sinais clínicos com as mudanças microbiológicas do biofilme presente. Diferentemente do que já foi exposto na literatura, o presente estudo realizou, além das alterações clínicas e microbiológicas, as imunológicas concomitantemente, nos mesmos pacientes durante um período do tratamento ortodôntico corretivo, para que essas alterações pudessem ser relacionadas entre si, permitindo melhor diagnóstico do quadro periodontal e o impacto que o tratamento ortodôntico pode ter na saúde periodontal.

2. P_{ROPOSIÇÃO}

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações periodontais que ocorreram no período de 12 meses de tratamento ortodôntico corretivo, por meio de análises clínicas, microbiológicas do biofilme subgengival e imunológicas em amostras do Fluido Crevicular Gengival.

As hipóteses nulas testadas foram:

1. não há diferença nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos avaliados antes e após 12 meses de tratamento ortodôntico corretivo;
2. não há correlação entre os índices e os fatores imunológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP - USP) tendo sido aprovado com o protocolo CAAE n. 56279916.0.0000.5419.

Todos os pacientes receberam informações detalhadas a respeito do experimento do qual participariam por meio dos Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e do Termo de Assentimento (TA), que foram devidamente assinados.

3.2 Casuística

Considerando a porcentagem do IS como variável primária, a amostra foi calculada para fornecer um poder de 80% para reconhecer diferença significativa de 20% entre os tempos com intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0.05$) e desvio padrão de 0,36. O cálculo foi determinado baseando-se na seguinte fórmula: $n = [(\sigma)^2/(\delta)^2].(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2$. Assim sendo, a realização do cálculo amostral determinou a seleção de 25 pacientes. Tendo em vista a possibilidade de desistência de alguns pacientes ou falha na obtenção de algumas amostras, determinou-se a seleção de 28 pacientes para o presente estudo.

3.3 Seleção dos pacientes

Foram selecionados 28 pacientes, com idade média de 14,5 anos (11 a 44 anos), de ambos os gêneros, submetidos a tratamento ortodôntico corretivo, atendidos no Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Os critérios de inclusão foram pacientes que necessitavam de tratamento ortodôntico corretivo, com dentição permanente completa, exceto os 3^{os} molares, que não foram submetidos a nenhum tratamento ortodôntico corretivo e periodontal prévio, não terem ingerido antibióticos ou nenhuma outra medicação sistêmica nos últimos 3 meses, bem como não terem feito uso de antimicrobiano e não serem portadores de desordens sistêmicas que pudessem interferir na condição periodontal.

Foram adotados como critérios de não inclusão, pacientes que já apresentavam problema periodontal instalado, indivíduos portadores de deformidades esqueléticas e/ou faciais, com necessidades especiais e que não assinaram o consentimento informado.

3.4 Delineamento experimental

Após anamnese e exame clínico, foram selecionados primeiros molares e incisivos centrais superiores e inferiores do lado esquerdo do paciente para a coleta das amostras de biofilme e fluido crevicular gengival em 3 momentos: T0= antes da montagem do aparelho ortodôntico corretivo; T1= 6 meses após montagem do aparelho ortodôntico corretivo; T2= 12 meses após montagem do aparelho ortodôntico corretivo. Em seguida, em todos os pacientes foi instalado aparelho corretivo, com bandas nos primeiros molares, bráquetes Edgewise Standard, slot 0.22"x0.28" de aço inoxidável (Cromo 17-20%; Níquel 8-10,5%; molibdênio máximo 60%) de 2º pré-molar a 2º pré-molar em ambos os arcos, sem angulação ou torque e tubos nos segundos molares de ambos os arcos, e arcos de aço (0.016", 0.018", 0.020" or 0.019" x 0.025") (Morelli, Sorocaba, SP, Brazil).

Todos os pacientes após a montagem do aparelho ortodôntico foram orientados para realização correta de higiene bucal. O protocolo de higienização utilizado foi de 4 escovações diárias (após café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir), uso de fio dental 2 vezes ao dia e de escova interdental ao redor dos acessórios após o jantar. Reforços de higiene bucal foram realizados a cada consulta.

3.4.1 Parâmetros clínicos

Os parâmetros analisados foram Índice de Placa (IP), Índice de Sangramento Gengival (IS) e largura de gengiva queratinizada (LGQ), nos períodos experimentais T0, T1 e T2.

Após avaliação, em todos os dentes, excluindo terceiros molares, o IP foi determinado pela divisão do número de faces com acúmulo de biofilme visível pelo total de superfícies analisadas, obtendo assim a porcentagem das superfícies com acúmulo de placa bacteriana visível (78). O IS foi calculado da mesma forma e considerado positivo quando ocorria em até 20 segundos após a inserção da sonda

para avaliação do IP (79). A LGQ foi mensurada, com sonda periodontal milimetrada, a partir da margem gengival até a junção mucogengival nos dentes selecionados de cada quadrante.

3.4.2 Parâmetros microbiológicos

Foram avaliados 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada elemento dentário (primeiros molares e incisivos centrais superiores e inferiores do lado esquerdo) selecionados em cada quadrante.

Para coleta do biofilme subgengival, os dentes pré-determinados foram isolados com roletes de algodão esterilizados e secos com leves jatos de ar. As amostras foram cuidadosamente removidas com utilização de curetas esterilizadas e colocadas em frascos também esterilizados do tipo *ependorf* contendo 150µL de solução tampão (10mM Tris-GCL, 1mM EDTA, pH7,6 – solução TE) e foi adicionado 100µL de NaOH 0,5M. Os tubos *ependorf*, previamente identificados com o código do paciente e data foram armazenados sob refrigeração a -80°C até o momento da avaliação. O processamento das amostras e análise dos resultados, por meio da técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos – SP.

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

Cepas bacterianas e condições de crescimento

As cepas utilizadas neste estudo foram adquiridas liofilizadas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) ou do *Forsyth Institute* (Cambridge, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo de crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) à 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meio de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. A cepa *T. forsythia*,

por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrilado de ovelha e 10µg/mL de ácido N-acetil murânico (ANM) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), enquanto *P. gingivalis* cresceu em meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3% µg/mL de menadiona (Sigma) e 5µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivadas em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niaciamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 µg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

As cepas bacterianas foram cultivadas em anaerobiose na superfície de ágar-sangue em placas de Petri, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura. Todas as cepas foram cultivadas por 3 a 7 dias. Após este período as colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5mL contendo 1mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3500g por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com dodecilsulfato de sódio (SDS – C₁₂H₂₅NaO₄S, Synth®, Labsynth, Diadema, SP, Brasil) à 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15mg/mL de lisozima (Sigma) e 5mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução-tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do kit *random primer digoxigenin labeling* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Tabela 1).

Tabela 1. Relação das cepas bacterianas utilizadas para a confecção das sondas de DNA avaliadas pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Espécies	Cepas
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 *
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 *
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 *
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 *
<i>A. actinomycetenumcomitans (a+b)</i>	43817* + 29523 *
<i>F.n. (sp. vicentii)</i>	49256 *
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 *
<i>Treponema Socranskii</i>	S1¶
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 *
* <i>Parvimonas micra</i>	33270 *
<i>Veillonella parvula</i>	10790 *
<i>Actinomyces oris</i>	43146 *
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 *
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 *
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 *
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 *
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 *
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 *
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 *
<i>Treponema denticola</i>	B1¶
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 *
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	17929 *
<i>F.n. (sp. Polymorphum)</i>	10953 *
<i>Campylobacter showae</i>	51146 *
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 *
<i>Neisseria mucosa</i>	19696 *
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	25586 *
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 *
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 *
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 *
<i>Selenomonas noxia</i>	43541 *
<i>Propionibacterium acnes (I + II)</i>	11827* + 11828 *
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 *
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 *
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 *
<i>Gemella morbillorum</i>	27824 *
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 *
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 *
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 *
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 *

Hibridização DNA-DNA

As suspensões de biofilme subgengival foram aquecidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônio a 5M. Cada suspensão de biofilme contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) (Figura 1) e transferida para a membrana de nylon (15x15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Ltd, Buckinghamshire, UK). As duas últimas canaletas do *Minislot* foram preenchidas por controles contendo mistura do DNA das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1g e 10g de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno à 120°C por 20 minutos.

Figura 1. Aparelho *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA)

Em seguida, a membrana foi pré-hibridizada à 42°C, por 1 hora, em solução contendo 50% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 vezes de solução salina citratada (SSC) (1 vez de SSC=150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio – pH 7,0 (J.T. Baker Chemical Co., Cidade do México, México), 25mM de fosfato de sódio – pH 6,5 (Na_2HPO_4 , Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma).

Posteriormente, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) (Figura 2), com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles, perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20g/mL, em 130 µL de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 vezes de SSC, 20mM de Na₂HPO₄ (pH 6,5), 02 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham Biosciences UK Ltd, Buckinghamshire, UK) e 1% de caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período de 20 horas, a 42°C.

Figura 2. Aparelho *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA)

Após período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics), lavada por 40 minutos à 65°C em solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄) 3M NaCl, 0,2M NaO, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína – pH 8,0 e, logo após, por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10 000. A membrana foi, então, lavada duas vezes, por 20 minutos, em solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3%de Tween 20 – pH 8,0 e uma vez, por 5 minutos, em solução de 0,1M de tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

Para detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 minutos à 37°C em solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-StarTM Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK). Em seguida, a membrana foi colocada em cassete, Chassi Radiográfico 30x40 cm (Lonex, São Paulo, SP, Brasil), sob filme radiográfico 18x24 cm (Agfa Gevaert, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos (Figura 3). O filme foi revelado manualmente pelo método convencional tempo-temperatura, de acordo com as orientações do fabricante, empregando soluções Kodak (Kodak Brasileira, Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas à temperatura de 20°C.

Figura 3. Membrana colocada em cassete de RX, sobre um filme radiográfico para revelação e obtenção dos sinais de quimioluminescência

Desta forma, foi obtido um filme radiográfico com os sinais de quimioluminescência detectados pelas sondas de DNA, onde as linhas horizontais representam as amostras e as verticais as sondas de DNA, propiciando um formato de “tabuleiro de xadrez” (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada, por único examinador treinado e calibrado, duas vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Quando as leituras não foram coincidentes, foi realizada uma terceira leitura para aquela amostra não coincidente. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas duas linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias e definidos scores de acordo com a intensidade. Sendo 0 quando não houve detecção de sinal; 1 quando sinal foi menos intenso que o controle de 10^5 ; 2 quando foi aproximadamente 10^5 células; 3 quando sinal estava entre 10^5 e 10^6 células; 4 quando o sinal estava próximo a 10^6 células e 5 quando o sinal estava mais intenso que 10^6 células (Tabela 2).

Tabela 2. Índice para cada score utilizado para determinação dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMOS	CONTAGEM
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000
4	Aproximadamente 10^5 células	1.000.000
5	Mais de 10^6 células	10.000.000

Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.

3.4.3 Parâmetro imunológico

Após a remoção do biofilme, os dentes foram cuidadosamente secos com jatos de ar e isolados com roletes de algodão esterelizados para que fosse realizada a coleta de amostras do FCG com tiras de papel absorvente (Periopaper, Oralflow, Inc., Amityville, NY, EUA). As tiras foram inseridas junto à margem do sulco gengival e permaneceram por 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram colocadas em *ependorfs* e armazenados à temperatura de -80°C, até o momento da análise.

Inicialmente foi determinado o valor de proteína total de cada amostra por meio de imunoensaios enzimáticos convencionais (ELISA), utilizando-se kits comercialmente disponíveis (DCTM Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A leitura colorimétrica foi realizada por meio de espectrofotômetro a 650nm (TP-Reader, ThermoPlate®, Brasil) e os valores expressos em ng/μL.

Para quantificação de citocinas (TNF-α, IL-1β e MMP-8), utilizou-se kits disponíveis comercialmente (MilliplexTM map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em analisador MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa filtro foi umedecida com o *washing buffer* e em seguida, a solução foi aspirada dos poços. *Beads* magnéticos revestidos com os anticorpos monoclonais para os analitos (TNF-α, IL-1β e MMP-8) foram adicionados aos poços. As amostras e padrões (variando de 0,13 a 2000pg/mL para cada analito) foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* à 4°C. Os poços foram, então, lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinizados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, foi adicionada aos poços a Estreptavidina R-ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para remoção de reagentes não-ligados, foi adicionado *sheat fluid* (Luminex, MiraiBio, Alameda, CA, EUA) aos poços. As placas foram analisadas pelo MAGPIX®, obtendo-se a intensidade média de fluorescência. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas

individualmente e os níveis de citocinas estimados a partir de curva polinomial de quinto grau utilizando o software xPONENT® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA).

3.5 Análise estatística

Na análise estatística dos dados clínicos e microbiológicos foram utilizados métodos não paramétricos uma vez que, pelo teste de Shapiro-Wilk, as variáveis não apresentavam distribuição normal. Para comparação entre os tempos (T0, T1 e T2) foi utilizado o teste de Friedman, e quando detectada diferença, foi aplicado teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni para detectar onde a diferença estava presente.

Os dados microbiológicos foram obtidos pela transformação dos scores em valores absolutos correspondentes: score 0 = ausência de células; score 1 = 10.000 células; score 2 = 100.000; score 3 = 500.000; score 4 = 1.000.000; e score 5 = 10.000.000. Para cada paciente, foi calculado a média de cada espécie bacteriana nos três diferentes tempos (T0, T1 e T2). Da mesma forma, os dados foram obtidos analisando as frequências relativas médias dos complexos bacterianos, segundo Socransky et al (2).

Na análise estatística dos parâmetros imunológicos, para comparar os níveis das citocinas entre os tempos analisados (T0, T1 e T2) fez-se a conversão dos dados em logaritmo, com objetivo de diminuir a dispersão e normalizar as variáveis. Após a conversão, foi aplicado método de Análise de Variância para medidas repetidas. O nível de significância adotado para todas as análises foi 5%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros clínicos

Em relação ao IP, observou-se valores médios estatisticamente maiores em T1 (70,58%) e T2 (83,23%), quando comparados ao T0 ($p < 0,001$), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

O IS aumentou significativamente de T0 para T1 ($p = 0,05$). Em T2 observou-se diminuição, sem diferença estatística em relação aos outros tempos ($p > 0,05$).

Não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes entre os valores médios da LGQ (4,29; 4,33 e 4,29) entre os tempos analisados ($p > 0,05$).

As médias dos dados clínicos obtidos nos três tempos avaliados estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Médias dos parâmetros clínicos periodontais ($\pm$ desvio padrão) em T0, T1 e T2 do tratamento ortodôntico corretivo

	Médias (%) $\pm$ desvio padrão			Valor de p
	T0	T1	T2	
IP	24,44 $\pm$ 11,56 ^a	70,58 $\pm$ 28,56 ^b	83,23 $\pm$ 12,30 ^b	$P < 0,001$
IS	4,54 $\pm$ 4,98 ^a	7,97 $\pm$ 5,04 ^b	6,20 $\pm$ 4,09 ^{ab}	$P = 0,016$
LGQ	4,29 $\pm$ 0,66 ^a	4,33 $\pm$ 0,84 ^a	4,29 $\pm$ 0,78 ^a	NS

Letras distintas indicam diferença significantes entre linhas, ou seja, entre os tempos (Teste de Wilcoxon).

4.2 Parâmetros microbiológicos

Analisando os complexos descritos por Socransky et al. (2), observou-se aumento nas frequências dos complexos azul, amarelo e roxo ($p = 0,74$, $p = 0,36$ e $p = 0,33$), que são constituídos por bactérias consideradas colonizadoras iniciais da superfície dental, sem relação direta com a doença periodontal ativa e diminuição na frequência dos complexos laranja, verde e das “espécies não-orais”. Porém essas variações não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,51$, $p = 0,89$ e $p = 0,35$).

O complexo vermelho, constituído pelas bactérias *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, que são consideradas fatores etiológicos da periodontite crônica e associadas à presença de sangramento e profundidade de sondagem, apresentou

diferença estatisticamente significativa entre o início do estudo (T0) e a análise realizada em T2 ($p=0,01$), na qual os valores obtidos foram maiores. A Figura 5 representa as frequências médias relativas dos complexos microbianos nos três tempos analisados.

Figura 5. Frequências relativas médias (%) dos complexos microbianos analisados nas amostras de biofilme subgengival dos pacientes nos três tempos (T0, T1 e T2).

A Figura 6 apresenta as médias das contagens de todas as 40 espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgengival coletadas dos pacientes nos três tempos (T0, T1 e T2), por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

De todas as espécies bacterianas analisadas apenas 9 apresentaram valores com diferenças estatisticamente significantes. Entre T0 e T1, foi constatado diminuição estatisticamente significativa de *C. rectus* ($p=0,006$), *P. nigrescens*

($p=0,05$) e *F. periodonticum* ($p=0,001$). Entre T0 e T2, as bactérias que apresentaram aumento estatisticamente significativo foram *P. gingivalis* ($p=0,01$), *S. intermedius* ($p=0,02$), *S. gordonii* ($p=0,006$) e *S. mitis* ($p=0,01$). *F. nuc ss nucleatum*, *F. nuc ss polymorphum*, *P. nigrescens* e *F. periodonticum* apresentaram redução estatisticamente significativa dos valores ($p<0,001$, $p=0,001$, $p=0,02$ e $p=0,001$, respectivamente). Apenas duas bactérias apresentaram diferença estatística entre os tempos T1 e T2, *C. rectus* ($p=0,003$) e *S. gordonii* ($p=0,05$), com valores maiores em T2.

Figura 6. Contagens médias das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos três tempos analisados.

4.3 Parâmetros imunológicos

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na análise das concentrações das citocinas avaliadas no FCG (mg/mL), nos períodos T0, T1 e T2.

Tabela 4. Concentração das citocinas IL1- β , TNF- α e MMP-8 (pg/mL) no FCG (média $\pm$ desvio padrão), expressos em log, em T0, T1 e T2

	Médias (%) $\pm$ desvio padrão			Valor de p
	T0	T1	T2	
IL-1β	1,1109 $\pm$ 0,6558	1,1558 $\pm$ 0,6423	1,3411 $\pm$ 0,6259	p = 0,38 NS
TNF-α	0,3426 $\pm$ 0,3392	0,4677 $\pm$ 0,3179	0,4707 $\pm$ 0,3044	p = 0,19 NS
MMP-8	3,8683 $\pm$ 1,0388	3,8500 $\pm$ 1,0735	3,8481 $\pm$ 1,5249	p = 0,99 NS

De forma geral, após a colagem dos bráquetes e início do tratamento ortodôntico, IL-1 β e TNF- α apresentaram maiores médias ao longo das avaliações e MMP-8 diminuição das médias. Porém a variação dos níveis das três citocinas foram extremamente pequenas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tempos (Figura 7).

Figura 7. Concentração das citocinas, IL-1 β , TNF- α e MMP-8, no FCG, nos três tempos analisados (T0, T1 e T2). Sem diferença estatisticamente significativa entre os tempos.

Apesar de não ter sido encontradas diferenças estatisticamente significantes nos níveis das citocinas analisadas, foi calculado o coeficiente de correlação com IP e IS. As Tabelas 5 e 6 mostram os valores dos coeficientes de correlação de Spearman entre parâmetros clínicos e as citocinas avaliadas.

Tabela 5. Correlação entre IP e níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α e MMP-8), calculado por meio do Coeficiente de correção não-paramétrico de Spearman

		IL-1 β			TNF- α			MMP-8		
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
IP	r	0,005	-0,062	0,322	-0,114	-0,136	0,001	0,28	0,317	0,140
	p	0,98	0,76	0,10	0,57	0,50	0,99	0,89	0,11	0,49

r = coeficiente de correlação de Spearman; * correlação positiva moderada; ** correlação positiva moderada a forte

Tabela 6. Correlação entre IS e níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α e MMP-8), calculado por meio do Coeficiente de correção não-paramétrico de Spearman

		IL-1 β			TNF- α			MMP-8		
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
IS	r	0,403*	0,024	0,491**	0,314	0,102	0,385*	0,213	0,178	-0,228
	p	0,041	0,908	0,011	0,118	0,621	0,052	0,296	0,384	0,262

r = coeficiente de correlação de Spearman; * correlação positiva moderada; ** correlação positiva moderada a forte

Foi possível observar correlação apenas para o IS, sendo positiva moderada em T0 com IL-1 β (r=0,40). Em T2, ocorreu correlação positiva moderada com IL-1 β (r=0,49) e com TNF- α (r=0,385). Em ambos os casos, quando houve aumento em uma variável, a outra acompanhou.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Atualmente, o tratamento ortodôntico corretivo tem sido procurado por pacientes adolescentes tardios e adultos para solução de problemas estéticos e funcionais (81). O presente estudo, foi realizado com a finalidade de esclarecer as alterações periodontais que o tratamento ortodôntico causa, por meio de análises clínicas, microbiológicas e imunológicas.

Com o avanço tecnológico da Ortodontia, vários tipos de bráquetes surgiram como forma de facilitar o tratamento e melhorar estética. Com isso, alguns estudos foram realizados para observar a influência do *design* ou do material em relação a formação de biofilme e níveis de bactérias periodontopatogênicas (47, 64, 82-84). Anhoury et al. (29) compararam bráquetes, metálicos e cerâmicos, e obtiveram diferenças nas bactérias acumuladas em cada tipo de bráquete, porém sem um padrão de colonização que favoreça o uso de um deles.

Atualmente, os alinhadores têm sido cada vez mais utilizados e ao contrário, do que se pensa em relação a facilidade de higiene oral em relação aos bráquetes, Chhibber et al. (2018) (85) analisaram efeitos dos alinhadores, bráquetes convencionais e auto-ligados nos índices de placa, gengival e sangramento à sondagem e não observaram diferenças significativas no nível de higiene bucal após 18 meses de tratamento ortodôntico. Por isso, ainda não há evidências que afirmem qual modelo específico de bráquete é mais adequado em relação ao acúmulo de biofilme e influência na saúde periodontal. Sendo assim, neste estudo optou-se por avaliar bráquetes metálicos convencionais devido seu uso ainda ser o mais frequente e rotineiro pelos os ortodontistas para o tratamento de seus pacientes.

O acúmulo de biofilme e a dificuldade de higiene bucal adequada são associados às condições periodontais ruins e os aparelhos ortodônticos são considerados fatores agravantes da saúde periodontal do paciente (37, 86, 87), que, como consequência apresentam piora nos índices clínicos periodontais. Foi possível observar neste estudo que os pacientes apresentaram aumento estatisticamente significativo do IP em T1 e T2, quando comparados ao T0. Semelhante à Abbate et al. (2015), que analisaram pacientes com bráquetes metálicos convencionais e obtiveram aumento significativo do IP aos 6 e aos 12 meses, sendo que a variação

maior ocorreu nos primeiros 6 meses, ou seja, houve maior acúmulo de biofilme no início do tratamento. Por outro lado, diferentemente do IS, os autores observaram o mesmo aumento com diferença estatisticamente significativa aos 6 e aos 12 meses. No presente estudo o parâmetro apresentou aumento apenas em T1 quando comparado ao T0 e em T2 apresentou diminuição, não havendo diferença estatisticamente significativa quando comparado T0 ao T1.

Alguns estudos também obtiveram alterações no início do tratamento ortodôntico, como o de Baka et al. (47) que observaram aumento no IP e sangramento à sondagem nos três primeiros meses após a colagem de bráquetes. E o estudo de Türkkahraman et al. (89) com objetivo de analisar mudanças microbiológicas e condição periodontal de pacientes após colagem de bráquetes com diferentes tipos de amarração (ligaduras elásticas e metálicas), obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, visto que o IP apresentou aumento significativamente com 1 e 5 semanas comparados aos valores antes da colagem dos bráquetes.

Além das alterações dos índices periodontais, outro sinal clínico importante é a recessão gengival durante o tratamento ortodôntico. Alguns estudos afirmam que higiene bucal deficiente, características da gengiva, posição anormal de dentes, inserção anormal de freios e largura inadequada de gengiva queratinizada são fatores predisponentes da recessão gengival (90-92). No presente estudo, foi possível observar que os pacientes não apresentaram alterações estatisticamente significantes na LGQ, não apresentando sinais clínicos de recessão gengival. Assim como no estudo de Closs et al. (93) que avaliaram a ocorrência e severidade de alterações da margem gengival em pacientes que haviam sido submetidos à tratamento ortodôntico, e Morris et al. (94) que avaliaram prevalência de recessão gengival em mesma condição, ambos concluíram que há aparecimento de recessão gengival, porém a extensão e severidade são extremamente baixa fazendo com que o tratamento ortodôntico não seja o fator de risco principal para o desenvolvimento dessa alteração. Porém de acordo com Jati et al. (95) embora não há evidências de que apenas o tratamento ortodôntico causa recessão gengival, durante o tratamento alguns movimentos dentários podem levar ao início da recessão, principalmente nas faces vestibulares de incisivos e caninos, quando a cortical óssea é fina ou apresenta

deiscência. Há correlação positiva entre retração de incisivos inferiores e recessão gengival, além de alterações em suas inclinações (96).

As mudanças microbiológicas em relação a quantidade de bactérias e biofilme já eram esperadas, visto que os aparelhos ortodônticos causam maior acúmulo de biofilme (25-28, 37, 39-41, 43). Pesquisas realizadas categorizaram as bactérias em complexos e associaram positivamente as doenças periodontais àquelas que constituem os complexos laranja e vermelho, como *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, além da *A. actinomycentemcomitans* (2, 97, 98). Bergamo et al. (64) observaram que pacientes com bráquetes auto-ligados apresentaram alta incidência de bactérias dos complexos laranja e vermelho 60 dias após a colagem dos bráquetes, o que está de acordo com o observado em nossos resultados, onde foi aumento na frequência média do complexo vermelho, sendo a diferença estatisticamente significativa quando comparada aos valores de T0 e T2.

Dentre estas bactérias do complexo vermelho encontradas na presente pesquisa, a única que apresentou aumento estatisticamente significativo em T2 foi *P. gingivalis* ($p=0,01$), assim como no estudo de Liu et al. (59) cuja a prevalência desta bactéria foi analisada, observou-se maior quantidade no grupo que estava sob tratamento ortodôntico comparado ao grupo controle, considerando-a como fator de risco para a gengivite que ocorreu durante o tratamento. Além disso, Gong et al. (41) relacionaram a presença dessa bactéria à indução ou presença de hiperplasia gengival, um sinal clínico que aumenta proporcionalmente ao tempo de tratamento ortodôntico (99).

As bactérias do complexo laranja, também relacionadas às doenças periodontais tem como uma de suas espécies a *F. nucleatum*, relacionada, por alguns pesquisadores, às doenças periodontais (2, 13, 100). Liu et al. (101), analisaram sua prevalência em quatro grupos de pacientes, sendo um com gengivite em tratamento ortodôntico, com gengivite sem tratamento ortodôntico, com periodontite e pacientes saudáveis. Observaram maior acúmulo da bactéria nos pacientes com doenças periodontais sem tratamento ortodôntico, concluindo que ela estava mais relacionada ao desenvolvimento da doença periodontal em si, do que comparada a presença do tratamento ortodôntico. Semelhante ao nosso estudo, onde foi possível observar diferenças significativas para as bactérias do complexo

laranja, principalmente entre o início do estudo e T2, as quais *P. nigrescens*, *F. nuc ss polymorphum*, *F. periodonticum* e *F. nuc ss nucleatum* apresentaram diminuição estatisticamente significativa na contagem de T0 para T1 e T2, ou seja, a colocação do aparelho ortodôntico não causou aumento dessas bactérias.

Socransky et al. (2) analisaram os complexos bacterianos no biofilme subgengival e relacionaram *T. forsythia* e *C. rectus*, espécies dos complexos vermelho e laranja, respectivamente, com profundidade de sondagem e sangramento. De acordo com Kim et al. (102), analisando alterações microbiológicas antes e durante os primeiros meses de tratamento ortodôntico, *C. rectus* apresentou aumento uma semana após a colocação do aparelho ortodôntico, indicando maior sensibilidade às mudanças ocorridas com a presença do aparelho. *T. forsythia* teve aumento a partir de três meses do início da terapia ortodôntica com maior frequência aos 6 meses. O contrário ocorreu no presente estudo, onde *C. rectus* teve diminuição na contagem em T1 e aumento em T2, retornando a valores semelhantes à T0, assim como, *T. forsythia* que não apresentou diferença estatisticamente significativa, ao longo dos tempos analisados. Essa diferença pode estar associada à susceptibilidade individual dos pacientes e aos cuidados com higiene bucal e sua manutenção durante o tratamento ortodôntico.

Alguns autores afirmam que a colocação do aparelho ortodôntico promove o crescimento subgengival de *A. actinomycetemcomitans* (103), que está relacionada à periodontite agressiva, porém, em nosso estudo essa bactéria foi detectada em valores baixos, apresentando aumento entre os períodos, mas sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Estes resultados vão de encontro ao apresentado por Demling et al. (104) que afirmaram que a terapia com aparelho fixo lingual induz a piora nos parâmetros clínicos periodontais, porém sem aumento na prevalência de *A. actinomycetemcomitans*. Por outro lado Pejda et al. (105) que analisaram parâmetros clínicos e microrganismos periodontopatógenos em pacientes com bráquetes convencionais e auto-ligados, obtiveram alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em bráquetes convencionais, porém, isto não foi relacionado ao aumento dos parâmetros clínicos. Além disto, estes últimos autores afirmaram que o *shift* microbiológico que ocorreu nas 18 semanas não apresentou risco para doenças periodontais e teve relação fraca com sinais clínicos presentes.

Thornberg et al. (55), analisaram oito periodontopatógenos antes, durante e após o término do tratamento ortodôntico em adolescentes. Observaram que das 8 espécies bacterianas estudadas, 6 apresentaram contagens mais altas após 6 meses de tratamento e aos 12 meses voltaram aos níveis pré-tratamento. A maioria das espécies bacterianas, no presente estudo, apresentaram aumento em T2 (12 meses), porém sem diferença estatisticamente significativa. Com exceção de *C. rectus* e *F. nucleatum* que apresentaram diminuição estatisticamente significativa em T1 e T2, respectivamente. Essas diferenças ocorridas entre os estudos podem estar relacionadas aos diferentes métodos de análise microbiana e ao tamanho de amostra. No presente estudo, das 40 bactérias analisadas, apenas 9 apresentaram diferenças estatisticamente significantes, sendo que nem sempre ocorreu o aumento ao longo do período analisado.

Com o aumento na quantidade e nas alterações qualitativas do biofilme, o paciente fica predisposto à ocorrência de doenças periodontais mais graves com perda de tecidos de suporte. As endotoxinas liberadas pelos microrganismos e o início da doença periodontal induzem a resposta inflamatória e faz com que ocorram mudanças no FCG, com o aumento de citocinas, como IL-1 β e TNF- α . Estas citocinas são mediadores importantes no processo inflamatório, aumentando a resposta imunológica do hospedeiro induzindo produção de quimiocinas e prostaglandinas, além da modulação dos componentes da matriz extracelular e tecido ósseo (106, 107). O desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias causam agravamento da doença e perda de tecidos periodontais (20, 108).

Devido aos vários estudos, a associação entre periodontite e o alto nível de IL-1 β , TNF- α e MMP-8 no FCG está bem estabelecida (67, 109-117), porém poucos estudos analisam comparativamente pacientes saudáveis e com doença periodontal sob tratamento ortodôntico. Gong et al. investigaram fatores microbiológicos e imunológicos, por meio do nível de IL-1 β , relacionados a hiperplasia gengival induzida por aparelho ortodôntico e observaram que o grupo com alteração da gengiva apresentava níveis significativamente mais elevados de IL-1 β do que o grupo controle, considerando-a fator de risco para o desenvolvimento da hiperplasia. No presente estudo, os pacientes não apresentaram diferença

estatisticamente significativa, entres os tempos, no que diz respeito a quantidade das citocinas analisadas. Apesar de apresentarem aumento significativo no IP em T1 e T2, esse acúmulo não influenciou nos níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α e MMP-8, demonstrando que não houve alteração e progressão de doenças periodontais severas.

Giannopoulou et al., apesar de não terem encontrado alteração significativa no IP, observaram aumento estatisticamente significativo na expressão de IL-1 β e IL-8 no grupo com aparelho ortodôntico, comparado ao grupo sem aparelho e associaram os níveis de IL-1 β à presença de sangramento gengival. No presente estudo, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa entre os tempos nos níveis de citocinas, houve correlação moderada entre IS e IL-1 β em T0 ($r=0,40$ $p=0,04$) e T2 ($r=0,49$ $p=0,01$) e entre IS e TNF- α em T2, com $r=0,39$ e $p=0,05$. A correlação aconteceu de forma que quando uma variável aumentou, a outra apresentou o mesmo aumento.

Foi possível observar que os pacientes do presente estudo apresentaram, de forma geral, mais alterações clínicas, visto que na análise microbiológica, apenas algumas bactérias apresentaram aumento significativo, e na imunológica, não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes. Assim, como afirmaram Islam et al. (118) acúmulo de placa ocorre em maiores proporções quando a higiene bucal não é realizada de forma eficiente. No presente estudo, provavelmente medidas com objetivo de melhorar higienização dos pacientes, como escovação supervisionada e instruções regulares durante todo o tratamento, poderiam melhorar os índices clínicos elevados que foram observados nos períodos analisados.

Alguns estudos que fizeram análise a longo prazo dos pacientes observaram que a maior parte dos parâmetros periodontais retornaram a normalidade quando o aparelho ortodôntico foi removido (37, 45, 98, 119, 120). Van gastel et al., monitorou os pacientes ortodônticos desde a colocação dos bráquetes até 3 meses após a retirada e observaram que após 3 meses todas as alterações, microbiológicas e clínicas, que o aparelho causou, estavam normalizadas. Estas afirmações vão de acordo com Ristic et al., que concluíram que os valores máximos

dos índices acontecem aos 3 meses de tratamento, mas aos 6 meses diminuem e os pacientes não apresentam efeitos graves aos tecidos periodontais.

Ghijssels et al. (121) por meio de estudo prospectivo monitorou parâmetros microbiológicos, clínicos e imunológicos de pacientes antes da colagem de bráquetes, ao final do tratamento ortodôntico e 2 anos após. Semelhante ao presente estudo, observaram aumento dos parâmetros clínicos durante o tratamento, porém concluíram que a colocação do aparelho ortodôntico não causa impacto a longo prazo, visto que os parâmetros aos 2 anos após a retirada do aparelho não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao início do tratamento.

No presente estudo, foi possível observar que as alterações significativas apresentadas pelos pacientes se concentraram em sinais clínicos que podem ser contornadas com instruções de higiene bucal ao longo do tratamento e reforça que a terapia ortodôntica é segura no que diz respeito à saúde periodontal do paciente. Além disto, estudos prévios têm relatado que os sinais clínicos, como índices de placa e gengivais e o número de bactérias periodontopatogênicas em dentição com apinhamento dentário são significativamente maiores do que em dentes alinhados (122, 123) e, por isso, Sim et al. associaram o tratamento ortodôntico à diminuição da prevalência de periodontite, devido a correção de posição dos dentes.

Estudos afirmam que tratamento multidisciplinar realizado em conjunto, Periodontia e Ortodontia devem ser o de escolha pois causam melhora na condição periodontal e conseqüentemente na saúde geral, (125-127). Cao et al. (128) Zasciurinskiené et al. (129) observaram melhora em defeitos ósseos presentes, com diminuição da profundidade de bolsas periodontais e ganho de suporte ósseo. No entanto, há resultados conflitantes em relação à perda de tecidos de suporte. Zachrisson e Alnes (131) demonstraram perda óssea significativa em pacientes em tratamento ortodôntico. Agrawal et al. (50) concluíram que o tratamento ortodôntico causa danos ao periodonto e a perda óssea pode ocorrer devido a extrações adjacentes a caninos, alguns movimentos dentários, inclinação de incisivos inferiores e trauma oclusal durante o tratamento. Além de outros fatores como força ortodôntica pesada e movimentações que podem reduzir a cortical óssea e o osso alveolar interdental (132, 133).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as condições periodontais durante tratamento ortodôntico, analisando as alterações dos parâmetros entre os tempos analisados considerando o paciente como seu próprio controle. Uma limitação do estudo foi a ausência de avaliações após o término do tratamento ortodôntico e a falta de validação nas alterações em relação à perda óssea. Faz-se necessário avaliar, em estudos futuros e monitorar os pacientes em períodos maiores, após a retirada dos bráquetes, para verificar se todas as alterações periodontais ocorrem de forma transitória, retornando à normalidade. Além de analisar procedimentos terapêuticos que possam ser realizados a fim de definir terapias periodontais específicas que possam ser realizadas durante o tratamento ortodôntico evitando danos maiores à saúde periodontal dos pacientes.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que o tratamento ortodôntico não causa prejuízos na saúde periodontal de forma irreversível e não há progressão para doenças periodontais graves. Os pacientes apresentaram gengivite com sinais de inflamação no primeiro período. As hipóteses nulas foram parcialmente rejeitadas pois houve diferença nos parâmetros clínicos e microbiológicos e não houve nos parâmetros imunológicos. Apesar de não encontradas diferenças significativas nos níveis de citocinas, pode-se observar correlação positiva entre IS e as citocinas IL-1 β e TNF- α .

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Kebschull M, Papapanou PN. Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38 Suppl 11:17-27.
2. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
3. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral microbiology and immunology*. 2004;19(6):352-62.
4. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Annals of periodontology: the American Academy of Periodontology*. 1999;4(1):7-19.
5. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of periodontology*. 1994;65(3):260-7.
6. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest dentistry*. 2000;79(6):31-5.
7. Parameter on comprehensive periodontal examination. American Academy of Periodontology. *Journal of periodontology*. 2000;71(5 Suppl):847-8.
8. Kelly JE, Sanchez MJ. Periodontal disease and oral hygiene among children. United States. Vital and health statistics Series 11, Data from the national health survey. 1972(117):1-28.
9. Bhat M. Periodontal health of 14-17-year-old US schoolchildren. *Journal of public health dentistry*. 1991;51(1):5-11.
10. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology*. 2012;83(12):1449-54.
11. Chambrone L, Macedo SB, Ramalho FC, Trevizani Filho E, Chambrone LA. Prevalence and severity of gingivitis among scholars (7-14 years): local conditions associated to bleeding on probing. *Ciencia & saude coletiva*. 2010;15(2):337-43.
12. Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The Biofilm Community-Rebels with a Cause. *Current oral health reports*. 2015;2(1):48-56.
13. Boutin S, Hagenfeld D, Zimmermann H, El Sayed N, Hopker T, Greiser HK, et al. Clustering of Subgingival Microbiota Reveals Microbial Disease Ecotypes Associated with Clinical Stages of Periodontitis in a Cross-Sectional Study. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:340.
14. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. *Pathologie-biologie*. 2007;55(3-4):154-62.

15. Topcuoglu N, Kulekci G. 16S rRNA based microarray analysis of ten periodontal bacteria in patients with different forms of periodontitis. *Anaerobe*. 2015;35(Pt A):35-40.
16. Checchi L, Gatto MR, Checchi V, Carinci F. Bacteria prevalence in a large Italian population sample: a clinical and microbiological study. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2016;30(2 Suppl 1):199-208.
17. Zhang J, Zhang AM, Zhang ZM, Jia JL, Sui XX, Yu LR, et al. Efficacy of combined orthodontic-periodontic treatment for patients with periodontitis and its effect on inflammatory cytokines: A comparative study. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2017;152(4):494-500.
18. Romano F, Bongiovanni L, Bianco L, Di Scipio F, Yang Z, Sprio AE, et al. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of generalized aggressive periodontitis patients after non-surgical periodontal treatment. *Clinical Oral Investigations*. 2018; 22(2):1083-1092.
19. Escalona LA, Mastromatteo-Alberga P, Correnti M. Cytokine and metalloproteinases in gingival fluid from patients with chronic periodontitis. *Investigacion clinica*. 2016;57(2):131-42.
20. Zhang Q, Chen B, Zhu D, Yan F. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: A cross-sectional study. *Archives of oral biology*. 2016;72:92-8.
21. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2015;23(3):329-55.
22. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta odontologica Scandinavica*. 2001;59(3):167-73.
23. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:108-29.
24. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr., Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(2):180-90.
25. Lang NP, Kiel RA, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *Journal of clinical periodontology*. 1983;10(6):563-78.
26. Diamanti-Kipioti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. *Journal of clinical periodontology*. 1987;14(6):326-33.
27. Brunsvold MA, Lane JJ. The prevalence of overhanging dental restorations and their relationship to periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1990;17(2):67-72.
28. Paolantonio M, D'Ercole S, Perinetti G, Tripodi D, Catamo G, Serra E, et al. Clinical and microbiological effects of different restorative materials on the periodontal tissues

- adjacent to subgingival class V restorations. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(3):200-7.
29. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *The Angle orthodontist*. 2002;72(4):338-43.
 30. Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2007;132(6):815-21.
 31. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *The Angle orthodontist*. 2007;77(6):1090-5.
 32. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *The Angle orthodontist*. 2007;77(2):331-6.
 33. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Pauwels M, Coucke W, Carels C. Microbial adhesion on different bracket types in vitro. *The Angle orthodontist*. 2009;79(5):915-21.
 34. Zharmagambetova A, Tuleutayeva S, Akhmetova S, Zharmagambetov A. Microbiological aspects of the orthodontic treatment. *Georgian medical news*. 2017(264):39-43.
 35. Magno AF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Faria G, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2008;133(4 Suppl):S104-9.
 36. Topaloglu-Ak A, Ertugrul F, Eden E, Ates M, Bulut H. Effect of orthodontic appliances on oral microbiota--6 month follow-up. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2011;35(4):433-6.
 37. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal variables after placement of fixed orthodontic appliances. *Journal of periodontology*. 2008;79(11):2078-86.
 38. Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *European journal of orthodontics*. 2001;23(5):475-84.
 39. Tersin J. Studies of gingival conditions in relation to orthodontic treatment. II. Changes in amounts of gingival exudate in relation to orthodontic treatment. *Svensk tandlakare tidskrift Swedish dental journal*. 1975;68(6):201-10.
 40. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthodontics & craniofacial research*. 2007;10(4):187-95.
 41. Gong Y, Lu J, Ding X. Clinical, microbiologic, and immunologic factors of orthodontic treatment-induced gingival enlargement. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2011;140(1):58-64.

42. van Gastel J, Teughels W, Quirynen M, Struyf S, Van Damme J, Coucke W, et al. Longitudinal changes in gingival crevicular fluid after placement of fixed orthodontic appliances. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2011;139(6):735-44.
43. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal parameters after removal of fixed orthodontic appliances. *European journal of orthodontics*. 2011;33(1):15-21.
44. Zachrisson S, Zachrisson BU. Gingival condition associated with orthodontic treatment. *The Angle orthodontist*. 1972;42(1):26-34.
45. Naranjo AA, Trivino ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2006;130(3):275.e17-22.
46. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Influence of bracket design on microbial and periodontal parameters in vivo. *Journal of clinical periodontology*. 2007;34(5):423-31.
47. Baka ZM, Basciftci FA, Arslan U. Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: a quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2013;144(2):260-7.
48. Verrusio C, Iorio-Siciliano V, Blasi A, Leuci S, Adamo D, Nicolo M. The effect of orthodontic treatment on periodontal tissue inflammation: A systematic review. *Quintessence international* (Berlin, Germany : 1985). 2017:1-9.
49. Davis SM, Plonka AB, Fulks BA, Taylor KL, Bashutski J. Consequences of orthodontic treatment on periodontal health: Clinical and microbial effects. *Seminars in Orthodontics*. 2014;20(3):139-49.
50. Agrawal N, Kundu D, Agrawal K, Singhal A. Comparison of longitudinal changes in clinical periodontal parameters of canines and first molars treated with fixed orthodontic appliances. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2016;149(3):325-30.
51. Arnold S, Koletsi D, Patcas R, Eliades T. The effect of bracket ligation on the periodontal status of adolescents undergoing orthodontic treatment. A systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry*. 2016;54(Supplement C):13-24.
52. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Carels C. The relationships between malocclusion, fixed orthodontic appliances and periodontal disease. A review of the literature. *Australian orthodontic journal*. 2007;23(2):121-9.
53. Bloom RH, Brown LR, Jr. A Study of the Effects of Orthodontic Appliances on the Oral Microbial Flora. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1964;17:658-67.
54. Attack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. *Journal of periodontology*. 1996;67(2):78-85.

55. Thornberg MJ, Riolo CS, Bayirli B, Riolo ML, Van Tubergen EA, Kulbersh R. Periodontal pathogen levels in adolescents before, during, and after fixed orthodontic appliance therapy. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2009;135(1):95-8.
56. Pan S, Liu Y, Zhang L, Li S, Zhang Y, Liu J, et al. Profiling of subgingival plaque biofilm microbiota in adolescents after completion of orthodontic therapy. *PloS one*. 2017;12(2):e0171550.
57. Bretas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MA. Effect of 0.4% stannous fluoride gel on Streptococci mutans in relation to elastomeric rings and steel ligatures in orthodontic patients. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2005;127(4):428-33.
58. Yanez-Vico RM, Iglesias-Linares A, Ballesta-Mudarra S, Ortiz-Ariza E, Solano-Reina E, Perea EJ. Short-term effect of removal of fixed orthodontic appliances on gingival health and subgingival microbiota: a prospective cohort study. *Acta odontologica Scandinavica*. 2015;73(7):496-502.
59. Liu Y, Zhang Y, Wang L, Guo Y, Xiao S. Prevalence of Porphyromonas gingivalis four rag locus genotypes in patients of orthodontic gingivitis and periodontitis. *PloS one*. 2013;8(4):e61028.
60. Andrucioli MC, Nelson-Filho P, Matsumoto MA, Saraiva MC, Feres M, de Figueiredo LC, et al. Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2012;141(1):24-9.
61. Nelson-Filho P, Carpio-Horta KO, Andrucioli MC, Feres M, Bezerra da Silva RA, Garcia Paula-Silva FW, et al. Molecular detection of Aggregatibacter actinomycetemcomitans on metallic brackets by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2012;142(4):481-6.
62. Nelson-Filho P, Olmedo LY, Andrucioli MC, Saraiva Mda C, Matsumoto MA, de Queiroz AM, et al. Use of the checkerboard DNA-DNA hybridisation technique for in vivo detection of cariogenic microorganisms on metallic brackets, with or without use of an antimicrobial agent. *Journal of dentistry*. 2011;39(7):513-7.
63. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *BioTechniques*. 1994;17(4):788-92.
64. Bergamo AZ, Nelson-Filho P, Andrucioli MC, do Nascimento C, Pedrazzi V, Matsumoto MA. Microbial complexes levels in conventional and self-ligating brackets. *Clinical oral investigations*. 2016.
65. Armitage GC, Robertson PB. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. *Journal of the American Dental Association*. 2009;140 Suppl 1:36s-43s.
66. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *Journal of Periodontal Research*. 2006;41(5):361-73.

67. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2009;80(3):436-46.
68. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *European journal of oral sciences*. 2007;115(5):355-62.
69. Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *European journal of oral sciences*. 2006;114(5):423-9.
70. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *European journal of oral sciences*. 2008;116(2):89-97.
71. Ribagin LS, Rashkova MR. Matrix metalloproteinase-8 and interleukin-1beta in gingival fluid of children in the first three months of orthodontic treatment with fixed appliances. *Folia medica*. 2012;54(3):50-6.
72. Kim SJ, Park KH, Park YG, Lee SW, Kang YG. Compressive stress induced the up-regulation of M-CSF, RANKL, TNF-alpha expression and the down-regulation of OPG expression in PDL cells via the integrin-FAK pathway. *Archives of oral biology*. 2013;58(6):707-16.
73. Giannopoulou C, Mombelli A, Tsinidou K, Vasdekis V, Kamma J. Detection of gingival crevicular fluid cytokines in children and adolescents with and without fixed orthodontic appliances. *Acta odontologica Scandinavica*. 2008;66(3):169-73.
74. Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *Journal of Periodontal Research*. 2010;45(1):148-52.
75. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *Journal of Periodontal Research*. 2009;44(3):411-7.
76. de Lima Oliveira AP, de Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, et al. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(3):295-302.
77. Shimada Y, Tabeta K, Sugita N, Yoshie H. Profiling biomarkers in gingival crevicular fluid using multiplex bead immunoassay. *Archives of oral biology*. 2013;58(6):724-30.
78. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *Journal of periodontology*. 1972;43(1):38.
79. Ainamo J, Bay I. Periodontal indexes for and in practice. *Tandlaegebladet*. 1976;80(5):149-52.
80. Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. *Oral microbiology and immunology*. 1989;4(1):41-6.

81. McKiernan EX, McKiernan F, Jones ML. Psychological profiles and motives of adults seeking orthodontic treatment. *The International journal of adult orthodontics and orthognathic surgery*. 1992;7(3):187-98.
82. Longoni JN, Lopes BM, Freires IA, Dutra KL, Franco A, Paranhos LR. Self-ligating versus conventional metallic brackets on *Streptococcus mutans* retention: A systematic review. *European journal of dentistry*. 2017;11(4):537-47.
83. Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS, Mada EY, Freitas AZ, Suzuki H. Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2011;140(4):e193-8.
84. do Nascimento LE, de Souza MM, Azevedo AR, Maia LC. Are self-ligating brackets related to less formation of *Streptococcus mutans* colonies? A systematic review. *Dental press journal of orthodontics*. 2014;19(1):60-8.
85. Chhibber A, Agarwal S, Yadav S, Kuo CL, Upadhyay M. Which orthodontic appliance is best for oral hygiene? A randomized clinical trial. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2018;153(2):175-83.
86. Zanatta FB, Moreira CHC, Rösing CK. Association between dental floss use and gingival conditions in orthodontic patients. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2011;140(6):812-21.
87. Ellis PE, Benson PE. Potential hazards of orthodontic treatment--what your patient should know. *Dental update*. 2002;29(10):492-6.
88. Abbate GM, Caria MP, Montanari P, Mannu C, Orru G, Caprioglio A, et al. Periodontal health in teenagers treated with removable aligners and fixed orthodontic appliances. *Journal of orofacial orthopedics*. 2015;76(3):240-50.
89. Turkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *The Angle orthodontist*. 2005;75(2):231-6.
90. Melsen B, Allais D. Factors of importance for the development of dehiscences during labial movement of mandibular incisors: a retrospective study of adult orthodontic patients. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2005;127(5):552-61; quiz 625.
91. Wennstrom JL. The significance of the width and thickness of the gingiva in orthodontic treatment. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*. 1990;45(3):136-41.
92. Moriarty JD. Mucogingival considerations for the orthodontic patient. *Current opinion in periodontology*. 1996;3:97-102.
93. Closs LQ, Branco P, Rizzato SD, Raveli DB, Rosing CK. Gingival margin alterations and the pre-orthodontic treatment amount of keratinized gingiva. *Brazilian oral research*. 2007;21(1):58-63.

94. Morris JW, Campbell PM, Tadlock LP, Boley J, Buschang PH. Prevalence of gingival recession after orthodontic tooth movements. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2017;151(5):851-9.
95. Jati AS, Furquim LZ, Consolaro A. Gingival recession: its causes and types, and the importance of orthodontic treatment. *Dental press journal of orthodontics*. 2016;21(3):18-29.
96. Boke F, Gazioglu C, Akkaya S, Akkaya M. Relationship between orthodontic treatment and gingival health: A retrospective study. *European journal of dentistry*. 2014;8(3):373-80.
97. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2009;36(9):739-49.
98. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Goncalves RB, Machion L, Wilson Sallum A, et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2004;126(3):363-6.
99. Pinto AS, Alves LS, Zenkner J, Zanatta FB, Maltz M. Gingival enlargement in orthodontic patients: Effect of treatment duration. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2017;152(4):477-82.
100. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *Journal of clinical periodontology*. 1991;18(10):766-75.
101. Liu P, Liu Y, Wang J, Guo Y, Zhang Y, Xiao S. Detection of fusobacterium nucleatum and fadA adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation. *PloS one*. 2014;9(1):e85280.
102. Kim SH, Choi DS, Jang I, Cha BK, Jost-Brinkmann PG, Song JS. Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment. *The Angle orthodontist*. 2012;82(2):254-60.
103. Paolantonio M, Festa F, di Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. Site-specific subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in orthodontic patients. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 1999;115(4):423-8.
104. Demling A, Demling C, Schwestka-Polly R, Stiesch M, Heuer W. Influence of lingual orthodontic therapy on microbial parameters and periodontal status in adults. *European journal of orthodontics*. 2009;31(6):638-42.
105. Pejda S, Varga ML, Milosevic SA, Mestrovic S, Slaj M, Repic D, et al. Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. *The Angle orthodontist*. 2013;83(1):133-9.
106. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1997;24(1):72-7.

107. Moore KW, Malefyt RdW, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):683-765.
108. Cetinkaya B, Guzeldemir E, Ogus E, Bulut S. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2013;84(1):84-93.
109. Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(s11):85-105.
110. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(2):217-25.
111. Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV, Miller CS. Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. *Journal of periodontology*. 2008;79(10):1913-9.
112. Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D, 3rd, Kryscio RJ, Lin Y, et al. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(1):271-9.
113. Rathnayake N, Åkerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers of oral health – a cross-sectional study. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(2):140-7.
114. Gursoy UK, Könönen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, et al. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(6):487-93.
115. Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2016;70(1):164-83.
116. Mauramo M, Ramseier AM, Mauramo E, Buser A, Tervahartiala T, Sorsa T, et al. Associations of oral fluid MMP-8 with periodontitis in Swiss adult subjects. *Oral diseases*. 2018;24(3):449-455.
117. Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fischer RG, Gustafsson A. Increased Interleukin-1 β Concentration in Gingival Crevicular Fluid as a Characteristic of Periodontitis. *Journal of periodontology*. 1999;70(12):1457-63.
118. Islam ZU, Shaikh A, Fida M. Plaque index in multi-bracket fixed appliances. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*. 2014;24(11):791-5.
119. Petti S, Barbato E, Simonetti D'Arca A. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. *The new microbiologica*. 1997;20(1):55-62.
120. Gomes SC, Varela CC, da Veiga SL, Rosing CK, Oppermann RV. Periodontal conditions in subjects following orthodontic therapy. A preliminary study. *European journal of orthodontics*. 2007;29(5):477-81.

121. Ghijselings E, Coucke W, Verdonck A, Teughels W, Quirynen M, Pauwels M, et al. Long-term changes in microbiology and clinical periodontal variables after completion of fixed orthodontic appliances. *Orthodontics & craniofacial research*. 2014;17(1):49-59.
122. Alexander AG, Tipnis AK. The effect of irregularity of teeth and the degree of overbite and overjet on the gingival health. A study of 400 subjects. *British dental journal*. 1970;128(11):539-44.
123. El-Mangoury NH, Gaafar SM, Mostafa YA. Mandibular anterior crowding and periodontal disease. *The Angle orthodontist*. 1987;57(1):33-8.
124. im HY, Kim HS, Jung DU, Lee H, Lee JW, Han K, et al. Association between orthodontic treatment and periodontal diseases: Results from a national survey. *The Angle orthodontist*. 2017;87(5):651-7.
125. Tavares CAE, Allgayer S, Calvete EdS, Polido WD. Orthodontic treatment for a patient with advanced periodontal disease: 11-year follow-up. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2013;144(3):455-65.
126. Cardaropoli D, Gaveglia L, Abou-Arraj RV. Orthodontic movement and periodontal bone defects: Rationale, timing, and clinical implications. *Seminars in Orthodontics*. 2014;20(3):177-87.
127. Xie Y, Zhao Q, Tan Z, Yang S. Orthodontic treatment in a periodontal patient with pathologic migration of anterior teeth. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2014;145(5):685-93.
128. Cao T, Xu L, Shi J, Zhou Y. Combined orthodontic-periodontal treatment in periodontal patients with anteriorly displaced incisors. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2015;148(5):805-13.
129. Zasciurinskiene E, Baseviciene N, Lindsten R, Slotte C, Jansson H, Bjerklin K. Orthodontic treatment simultaneous to or after periodontal cause-related treatment in periodontitis susceptible patients. Part I: Clinical outcome. A randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45(2):213-24.
130. Zachrisson BU, Alnaes L. Periodontal condition in orthodontically treated and untreated individuals. I. Loss of attachment, gingival pocket depth and clinical crown height. *The Angle orthodontist*. 1973;43(4):402-11.
131. Zachrisson BU, Alnaes L. Periodontal condition in orthodontically treated and untreated individuals. II. Alveolar bone loss: radiographic findings. *The Angle orthodontist*. 1974;44(1):48-55.
132. Antoun JS, Mei L, Gibbs K, Farella M. Effect of orthodontic treatment on the periodontal tissues. *Periodontology 2000*. 2017;74(1):140-57.
133. Janson G, Bombonatti R, Brandao AG, Henriques JF, de Freitas MR. Comparative radiographic evaluation of the alveolar bone crest after orthodontic treatment. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2003;124(2):157-64.

A NEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você, _____ está sendo convidado (a) por mim, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr. e Mariana Umekita Shirozaki, mestrandos da Universidade de São Paulo (FORP-USP), responsável pelo projeto, **"ALTERAÇÕES PERIODONTAIS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO ORTODÔNTICO CORRETIVO: ANÁLISE CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA."**, a concordar em participar da pesquisa. Este papel tem duas vias idênticas (folhas iguais), que será assinada por você, pelo seu responsável legal e por mim. Uma via (folha) ficará com você e a outra será guardada por mim.

Esta pesquisa quer saber se a sua gengiva sofre alterações durante o tratamento com o aparelho corretivo (aparelho fixo). Se causa ou aumenta a inflamação em sua gengiva. Se houver inflamação será avaliado se ela é causada por bactérias específicas. O planejamento do seu tratamento ortodôntico será mantido e de forma alguma, os exames e análises que serão realizados não vão interferir no andamento do tratamento. Se for verificada inflamação gengival ou qualquer outro problema periodontal (problema na gengiva e osso) você receberá tratamento para solucionar este problema. Se por ventura, você necessitar comparecer fora do seu horário de atendimento ortodôntico regular, será fornecido auxílio transporte e alimentação.

Você e o seu responsável legal virão a Clínica de Ortodontia da FORP-USP e os dados serão coletados de sua boca no início do tratamento, aos 6 meses e após 12 meses de tratamento. Se você quiser participar deste projeto de pesquisa, seu responsável também terá que concordar. Mas se você não quiser, mesmo que seu responsável concorde, você poderá falar que não quer. Você pode conversar com seu responsável antes de decidir se quer ou não participar. Pode ser que neste termo tenha algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique melhor, porque você ficou interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare, a qualquer momento, e explique novamente. Ninguém ficará bravo com você se você disser não; a escolha é sua.

Esta pesquisa não vai machucar, não vai causar dor e nenhum tipo de dano aos seus dentes ou a sua gengiva. Poderá haver apenas o desconforto durante a adaptação do aparelho na boca ou em algum exame clínico. A sua participação é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. O seu nome, bem como o do seu responsável serão mantidas em segredo, mas participando da pesquisa você autoriza que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a privacidade de vocês.

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Mariana Umekita Shirozaki) - Avenida do Café S/N - Departamento de Clínica Infantil, Ortodontia - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Tel: (16) 3315.3995. Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do CEP FORP-USP (16- 3315-0493 - Horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira), devendo conter seu nome que será mantido em sigilo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____.

Nome do responsável legal: _____,

Assinatura e CPF: _____

Nome da criança ou adolescente: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr
CPF 932.313.698-00

Mariana Umekita Shirozaki
CPF 355.424.408-27

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior (orientador) e pós-graduanda Mariana Umekita Shirozaki, convidamos você..... CPF, responsável pelo(a) menor a participar da pesquisa: "ALTERAÇÕES PERIODONTAIS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO ORTODÔNTICO CORRETIVO: ANÁUSE CÚNICA, MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA". Conduzida pela Área de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

O propósito do estudo será avaliar e comparar alterações clínicas, microbiológicas e imunológicas periodontais durante o tratamento ortodôntico corretivo.

O tratamento ortodôntico corretivo traz muitos benefícios para o paciente, porém, durante o tratamento o paciente fica exposto à alterações da gengiva pela contaminação e formação de biofilme bacteriano (placa de bactérias). Isso pode trazer malefícios como inflamação gengival (gengiva inchada e sangrando) e, se não tratada, doenças periodontais (inflamações na gengiva e perda de osso) mais graves podem acontecer. Desta forma, justifica-se o desenvolvimento desta pesquisa para esclarecer as alterações que ocorrem e assim auxiliar os profissionais quanto a conduta a ser realizada frente a esses problemas. Se for detectada qualquer tipo de alteração (inflamação ou coisa pior) você receberá o tratamento para corrigir este problema.

Estou ciente de que esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior (mostrar as informações que foram encontradas), mantendo-se o sigilo dos meus dados pessoais. Declaro que fui devidamente esclarecido(a), de forma oral e escrita que:

1. O estudo tem por objetivo avaliar e comparar alterações clínicas, microbiológicas e imunológicas da gengiva durante o tratamento ortodôntico corretivo
2. A pesquisa não irá ocasionar nenhum prejuízo físico ou moral, e não causará desconforto ou risco, já que as análises serão realizadas durante o atendimento do tratamento ortodôntico corretivo ao qual você já está sendo submetido;
3. Foi-me assegurado sigilo de privacidade.
4. Tenho plena liberdade de recusar a participação de meu dependente nesta pesquisa, assim como tenho liberdade de retirá-lo a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo do atendimento;
5. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência, caso ocorra algum problema relacionado à execução da parte clínica do projeto (Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior - Av. do café s/N - Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, FORP-USP, Telefone: 3315-3979 e Mariana Umekita Shirozaki - Av. do Café s/N - Departamento de Clínica Infantil, FORP-USP, Telefones: 3315 4099, 3315-3995). Caso necessário, o contato da secretaria do Comitê de Ética da FORP-USP fica a disposição (3315 0493, email cep@forp.usp.br).
6. Não é previsto o pagamento de despesas ou indenizações, já que os procedimentos já descritos não são agressivos à saúde física ou moral.
7. Caso seja necessário você necessitar comparecer fora do seu horário de atendimento ortodôntico regular, será fornecido auxílio transporte e alimentação.

Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsáveis a Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr e Mariana Umekita Shirozaki.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr
CPF 932.313.698-00

Mariana Umekita Shirozaki
CPF 355.424.408-27

Responsável ou paciente