ANA ZILDA NAZAR BERGAMO

Bráquetes Convencionais e Autoligados: Detecção de Micro-organismos na Saliva e *In Situ*, Avaliação de Parâmetros Periodontais e Quantificação de Citocinas no Fluido Crevicular.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Programa: Odontopediatria.
Área de Concentração: Odontopediatria.

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. MIRIAN AIKO N. MATSUMOTO

COORIENTADOR: PROF. DR. PAULO NELSON-FILHO

"Versão corrigida"

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bergamo, Ana Zilda Nazar

Bráquetes Convencionais e Autoligados: Detecção de micro-organismos na saliva e *in situ*, avaliação de parâmetros periodontais e quantificação de citocinas no fluido crevicular. Ribeirão Preto, 2014.

112p.: il.; 30cm

"Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa"

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Matsumoto, Mirian Aiko Nakane

Coorientador: Nelson-Filho, Paulo

1. Bráquetes ortodônticos
2. Microbiologia
3. Biologia molecular
4. Citocinas

Bergamo AZN. **Bráquetes convencionais e autoligados: detecção de micro-organismos na saliva e *in situ*, avaliação de parâmetros periodontais e quantificação de citocinas no fluido crevicular.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Julgamento_____Assinatura_____

DADOS CURRICULARES

ANA ZILDA NAZAR BERGAMO

- Nascimento** 21 de junho de 1968 – Batatais/SP.
- Filiação** Nelson Bergamo
Terezinha Darli Nazar Bergamo
- 1986-1989** Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
- 2005-2007** Curso de Pós-graduação em Radiologia Odontológica - Área de concentração - Ortodontia, nível Mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. Dissertação: "Alterações dento-maxilares, em jovens com maloclusão de classe II, 1ª divisão dentária, após uso do AEB" (Bolsa CAPES).
- 2009-2009** Curso de Aperfeiçoamento em Pacientes Especiais – Departamento de Clínica Infantil - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.
- 2010-2014** Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível Doutorado. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Tese: "Bráquetes Convencionais e Autoligados: Detecção de micro-organismos na saliva e *in situ*, avaliação de parâmetros periodontais e quantificação de citocinas no fluido crevicular" (Bolsa CAPES).

DEDICO ESTE TRABALHO,

À minha avó Zilda, exemplo de caráter e dedicação à família.

Aos meus pais Darli e Nelson, exemplos de amor, companheirismo e cumplicidade.
Tenho tanto orgulho de vocês.....

À minha filha Júlia, meu grande amor.....

Ao Prof. Dr. Wilson Abrão (tio Marujo), que tanto me apoiou para iniciar e
completar esta jornada, obrigada tio.....

Aos meus irmãos Nelson e Bia, por estarem sempre ao meu lado, em todos os
momentos da minha vida.

Às minhas tias Rosa e Delma, sempre próximas, cuidando de mim com muito
carinho.

Aos meus sobrinhos Vinícius e Isabela, pelo amor incondicional dedicado.

Ao meu cunhado Renato, pela ajuda profissional constante e amizade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Dr^a. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, minha orientadora. Obrigada em primeiro lugar por me receber. Por me tratar com respeito e carinho. Por me ensinar muito!!!! Sobre Ortodontia, Odontologia, Pesquisa e sobre a vida. E principalmente por tudo que fez pela Júlia..... Eu não tenho como agradecer....

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, pela paciência, por compreender minhas limitações e me ensinar a superá-las. Pela educação e respeito que demonstra quando conversa conosco. Muito obrigada por ser coorientador deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Alexandra Mussolino de Queiroz, pela amizade com que me recebeu e pelo muito que me ensinou neste retorno à Faculdade.

À Dr^a. Carolina Paes Torres Mantovani, sem o seu apoio e sua generosidade, não teria sido possível iniciar esta jornada.

À Prof^a. Dr^a. Marcela Cristina Damião Andrucioli, por participar efetivamente da parte clínica deste trabalho. Pela amizade, lealdade e disponibilidade de ajudar sempre.

À Dr^a. Maya Fernanda Manfrin Arnez, por atender prontamente aos meus pedidos, pela amizade, respeito e principalmente, por tudo que fez pela Júlia.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, na pessoa do Digníssimo Diretor, Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e a Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, na pessoa da Coordenadora Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva e da Vice-Coordenadora Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra da Silva Segato.

À Prof^a. Dr^a. Aldevina Campos de Freitas, exemplo de amor à profissão e dedicação.

Aos professores da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP: Prof. Dr. Adilson Tomasin por permitir triar na sua clínica de especialização os pacientes que compõem a amostra desta tese. Prof^a. Dr^a. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. José Tarcisio Lima Ferreira, Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Sasso Stuani e Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP: Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva, Prof^a. Dr^a. Sada Assed, Prof^a. Dr^a. Aldevina Campos de Freitas, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Borsato, Prof^a. Dr^a. Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra da Silva, Prof^a. Dr^a. Kranya Victoria Díaz Serrano, Prof^a. Dr^a. Andiará de Rossi Daldegan e Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, pela atenção, ensinamentos e disponibilidade.

Prof^a. Dr^a. Maria conceição Pereira Saraiva, da Disciplina de Epidemiologia e Bioestatística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, por compartilhar seus conhecimentos de estatística e pela disponibilidade em cooperar sempre.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, Filomena Leli Placciti, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Matheus Morelli Zanela, Marco Antonio dos Santos, Nilza Letícia Magalhães, Fátima Aparecida Jacinto Daniel e Carmo Eurípedes Terra Barretto, pelo agradável convívio diário, que foi possível graças à educação, respeito e carinho com os quais vocês nos tratam.

À Benedita Viana Rodrigues e Fátima Aparecida Rizoli, da Clínica de Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP: que sempre nos acolhem com carinho e respeito.

Aos funcionários da Clínica I, II e III da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP e da Fundação Odontológica (FUNORP), pelo respeito, prontidão em atender e pela disponibilidade em ajudar.

Ao Laboratório de Histologia e ao Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Clínica Infantil, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, pelo auxílio técnico na realização do processamento das amostras. Obrigada pela dedicação e atenção.

Ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, em especial ao Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi, por permitir o desenvolvimento de parte desta pesquisa no laboratório desse departamento. Ao Prof. Dr. Cássio do Nascimento, por transmitir o seu conhecimento com competência e presteza permitindo, assim, que parte das análises fossem realizadas. Obrigada principalmente pela amizade e respeito.

Ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, em especial ao Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior, por ceder equipamentos fundamentais ao desenvolvimento dessa pesquisa. Ao doutorando Humberto Demoner Ramos pelo auxílio na manipulação dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casat e Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP e UNIP, pela colaboração na análise de citocinas.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP: Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilloto, por estarem sempre à disposição e nos auxiliar com grande competência.

À secretária do Curso de especialização em Ortodontia, Rosemary Alves de Sá, pelo auxílio constante em todas as necessidades.

Aos colegas do doutorado e do mestrado, pelo incentivo e constante apoio.

Aos amigos Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva e Dr^a. Marília Pacífico Lucisano, pelos ensinamentos, cooperação e amizade.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida durante todo o curso.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo), pelo auxílio financeiro concedido para a execução do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	CAPÍTULO 1.....	29
	Alterações no volume do fluido crevicular e nos parâmetros periodontais, após a colagem de bráquetes metálicos autoligados e convencionais.	
3	CAPÍTULO 2.....	41
	Micro-organismos relacionados direta ou indiretamente à cárie dental, na saliva e <i>in situ</i> , em diferentes tipos de bráquetes (convencionais e autoligados).	
4	CAPÍTULO 3.....	55
	Deteccção de complexos microbianos pela técnica <i>checkerboard DNA DNA hybridization</i> , pré e pós-colagem de bráquetes convencionais e autoligados.	
5	CAPÍTULO 4.....	75
	Níveis de citocinas no fluido crevicular e perfil microbiano <i>in situ</i> , após a colagem de bráquetes convencionais e autoligados.	
6	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	93

BERGAMO, AZN. **Bráquetes Convencionais e Autoligados: Detecção de micro-organismos na saliva e *in situ*, avaliação de parâmetros periodontais e quantificação de citocinas no fluido crevicular.** Ribeirão Preto 2014. 114p. [Tese doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2014.

RESUMO

O aparelho ortodôntico promove alterações microbiológicas na cavidade bucal, em função da variedade de materiais sólidos e elásticos que possuem, os quais funcionam como áreas de retenção, levando a um acúmulo de biofilme e predispondo o hospedeiro à cárie dental e à doença periodontal. Os objetivos do presente estudo, *in vivo*, foram: 1) Avaliar, as alterações no índice de placa (PI), índice gengival (GI), índice de sangramento gengival (GBI) e no volume do fluido crevicular, em pacientes com 3 diferentes desenhos de bráquetes metálicos (autoligados e convencionais), a fim de verificar se o desenho dos bráquetes interfere no acúmulo de placa e na saúde gengival; 2) Estudar as alterações nos níveis de diferentes micro-organismos envolvidos direta ou indiretamente na cárie dental, na saliva e *in situ*, pré e pós-colagem de bráquetes convencionais e autoligados; 3) Avaliar os níveis salivares e *in situ*, de espécies de micro-organismos dos complexos roxo, verde, laranja e vermelho e de outras espécies, pré e pós-colagem de bráquetes convencionais e autoligados, por meio de sondas de DNA e 4) Quantificar citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular, antes e após a colagem dos diferentes bráquetes. A amostra foi constituída de 20 pacientes, com idade entre 11 e 15 anos (Média: 13,3 anos), que receberam bráquetes metálicos convencionais Gemini™ e dois diferentes tipos de bráquetes autoligados: In-Ovation®R e SmartClip™ em incisivos e caninos superiores. Os índices, o volume do fluido e as amostra de saliva (S0) foram obtidos antes da instalação dos aparelhos (T0) e após 30(T1) e 60(T2) dias. Um bráquete de cada tipo foi removido 30 e 60 dias após a colagem. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se os testes não-paramétricos de Friedman, Mann-Whitney e Wilcoxon e coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman. A análise da concentração de citocinas no fluido crevicular foi realizada segundo modelo de análise de variância misto, seguida pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Não houve correlação entre o grau de apinhamento, overjet e overbite com os escores do índice de placa (PI), índice gengival, índice de sangramento gengival e com o volume do fluido crevicular no tempo inicial T0 ($p>0,05$). Verificou-se a diferença significativa nos escores de PI e volume do fluido crevicular somente nos dentes que receberam bráquetes autoligados SmartClip™, entre os tempos T0-T2($p<0,05$). Identificou-se a presença de 21 das 22 espécies bacterianas e 4 das 5 espécies fúngicas, na saliva, antes da colagem dos aparelhos ortodônticos. *In situ*, no bráquete autoligado SmartClip™ observou-se maiores níveis de espécies do complexo vermelho 60 dias após a colagem. Para os bráquetes convencionais Gemini™ verificou-se diminuição nos níveis de espécies do complexo roxo. Para o bráquete autoligado In-Ovation®R identificou-se diferença significativa para *C. rectus* 30 dias após a colagem e para *S. mutans* 60 dias após a colagem. Quando comparou-se os níveis salivares e os *in situ*, verificou-se maiores níveis de espécies nos bráquetes, *in situ*, sendo que os autoligados apresentaram os maiores valores. Aumento significativo foi verificado para os bráquetes autoligados In-Ovation®R, para *S. mutans* e *L. casei*. Após 60 dias da colagem do aparelho ortodôntico observou-se um aumento nos níveis de TNF- α ($p<0.005$), em todos os tipos de bráquetes. Considerando-se as condições específicas desse estudo, pode-se concluir que o desenho do bráquete modulou o índice de placa, o volume do fluido crevicular, e os níveis bacterianos do complexo vermelho, sendo o bráquete autoligado SmartClip™ o que apresentou o pior desempenho, nesse aspecto. O bráquete autoligado In-Ovation®R apresentou maiores níveis bacterianos relacionados à cárie dental e espécies do complexo laranja. A concentração de citocinas no fluido crevicular não foi

modulada pelo desenho do bráquete, ocorrendo um aumento na concentração de TNF- α nos três tipos de bráquetes (convencional e autoligados) 60 dias após a colagem.

A análise global dos resultados obtidos nos diferentes parâmetros analisados no presente estudo permitiu evidenciar, em geral, melhores resultados clínicos com o bráquete metálico convencional Gemini^{TM}.

Palavras-chave: bráquetes ortodônticos, microbiologia, biologia molecular, citocinas

BERGAMO, AZN. **Self-ligating and Conventional brackets: Microbial detection in the saliva and *in situ*, periodontal index evaluation and assessment of cytokines levels in the gingival crevicular fluid.** Ribeirão Preto 2014. 123p. [Thesis]. Ribeirão Preto: Dentistry School of Ribeirão Preto, University of São Paulo; 2014.

ABSTRACT

The orthodontic appliance promoting several changes in oral cavity according to the variety of solid and elastic materials used in the treatment, leading to the biofilm development. The aim of this study, *in vivo*, was: 1) Evaluate the periodontal index: Plaque Index (PI), Gingival Index (GI), Gingival Bleeding Index (GBI) and gingival crevicular fluid volume. 2) The levels of cariogenic and periodontopathogenic bacteria in saliva and in two different metallic brackets: self-ligating and conventional, quantify the levels before and 30 and 60 days after bonding orthodontic appliance. 3) The levels of red, orange green and purple complex and others species, *in situ* and in the saliva. 4) The pro-inflammatory cytokines levels in the gingival crevicular fluid. The sample consisted of 20 patients, aged between 11 and 15 years (mean 13.3 years) who received conventional metal bracket Gemini™ and two different types of self-ligating brackets: In-Ovation®R and SmartClip™ in maxillary incisors and canines. The rates, the volume of the fluid and saliva sample (S0) were obtained before the device (T0), 30 (T1) and 60 (T2) after bonding. A type of each bracket was removed 30 to 60 days after bonding. Data were analyzed statistically using the nonparametric Friedman test, Mann-Whitney and Wilcoxon coefficient and nonparametric Spearman correlation with a significance level of 5 %. The cytokine levels was analyzed by the mixed models, follow to the Tukey test. There was no correlation among the scores of crowding, overjet and overbite with the scores of plaque index (PI), gingival index (GI), gingival bleeding index (GBI) and volume of crevicular fluid at the initial time T0 ($p > 0.05$). There was a significantly difference in PI and crevicular fluid volume, when compared each bracket separately, only the teeth that received self-ligating bracket SmartClip™, between times T0-T2 ($p < 0.05$). We identified, in the saliva, the presence of 21, bacterial species, of the 22 analyzed; 4 of the 5 fungal species, before bonding the orthodontic appliance. *In situ*, to the SmartClip™ the highest levels were observed to the red complex 60 days after bonding. To the Gemini™ a decreased to the purple complex was observed when compared 30 and 60 days after bonding. The In-Ovation®R showed a significantly difference to *C. rectus*, 30 days after bonding. *S. mutans*, 60 days after bonding. 30 days after bonding the microbial levels is highest in the saliva than *in situ*, the self-ligating brackets present the highest levels than conventional brackets. 60 days after bonding the TNF- α levels was increased ($p < 0.05$). The microbial levels was highest in the self-ligating brackets than the conventional brackets. The bracket design seems influenced the plaque index, the volume of the crevicular fluid, the microbial adhesion. The levels *in situ* are highest than in saliva. The TNF- α levels were increased 60 days after bonding. The bracket design change the PI, gingival crevicular volume and the red complex species, the SmartClip™ showed the worst results in this point. The In-Ovation®R presented the highest levels of the species to the orange complex and cariogenic species. The design didn't modulated the cytokine levels, th TNF α , increased for all brackets. The global analyses of the results allows us to conclude that the Gemini™ conventional bracket showed the best results when compared to the others self-ligating.

Keywords: orthodontic appliance design, microbial, immunoenzyme techniques, cytokine.

Introdução

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por mais de 1000 espécies de micro-organismos (Wilson, 2004; Zanin et al., 2006), incluindo vírus, protozoários, fungos e bactérias, que coabitam em homeostase. Quando o equilíbrio biológico é rompido, as doenças podem se manifestar (Socransky et al., 1998; Socransky e Haffajee, 2005; Lang et al., 2009; Kebschull e Pn, 2011; Wade, 2013).

Sabe-se que os aparelhos ortodônticos são compostos por vários acessórios que apresentam superfícies irregulares, as quais funcionam como áreas de retenção, promovendo aumento no acúmulo de biofilme microbiano e elevando a concentração de micro-organismos (Ahn et al., 2007; Magno et al., 2008; Andrucio et al., 2012; Jurela et al., 2013). Além disso, limitam a ocorrência da limpeza mecânica ocasionada pela saliva e pela movimentação da musculatura (Sukontapattipark et al., 2001; Faltermeier et al., 2007; Jurela et al., 2013).

Na presença de carboidratos fermentáveis ocorre queda do pH, com aumento do acúmulo e a maturação do biofilme microbiano, gerando um ambiente favorável para a formação de lesões de cárie (Anhoury et al., 2002; Naranjo et al., 2006; Iwano et al., 2010) e aumento na resposta inflamatória dos tecidos de sustentação. Muitas vezes, mesmo os pacientes com higiene bucal mecânica satisfatória apresentam desenvolvimento de gengivite, principalmente nos primeiros meses após a colocação do aparelho (Anhoury et al., 2002; Thomson, 2002; Naranjo et al., 2006; Sudjalim et al., 2007; Lang et al., 2009; do Nascimento et al., 2013).

As alterações microbiológicas que ocorrem após a instalação de aparelhos ortodônticos se tornaram um tópico bastante estudado a partir dos anos 1980, e os estudos têm revelado que inicialmente ocorre a colonização por espécies como *S. mutans* e *Lactobacillus* que são cariogênicos (Brêtas et al., 2005; Brusca et al., 2007). A desmineralização subsequente do esmalte também está entre os principais tópicos de interesse, pois este problema clínico é relevante e compromete, inclusive, a estética (Ramoglu et al., 2009; Farronato et al., 2013; Khalaf, 2014; Ren et al., 2014). A lesão de cárie é causada pela produção de ácidos, resultante da fermentação de carboidratos da dieta pelas bactérias na cavidade bucal, principalmente pelas espécies *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus* ssp. (Iwano et al., 2010; Nelson-Filho et al., 2011a; Takahashi e Nyvad, 2011; Saravia et al., 2011, 2013). Um aumento destas espécies ocorre entre 6 e 12 semanas após a instalação de aparelhos ortodônticos (Sanpei et al., 2010).

Dentre as espécies de micro-organismos que compõem o grupo mutans, *S. mutans* é a espécie mais frequentemente isolada. Entretanto, estudos recentes relataram a importância da coexistência das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* no desenvolvimento da cárie dental e na elevação do risco à cárie nos pacientes multicolonizados. Os *S. sobrinus* são mais dependentes de sacarose que os *S. mutans*, sendo mais acidogênicos (Seki et al., 2006; Saravia et al., 2011; Ghasempour et al., 2013). Sabe-se que os níveis salivares de micro-organismos como *S. mutans*, *Lactobacillus* ssp. e *S. sobrinus* podem prever o risco de desenvolver manchas brancas e lesões de cárie, durante o tratamento ortodôntico (Al Mulla et al., 2009; Sanpei et al., 2010; Jurela et al., 2013). Espécies de *Candida* ssp também interagem com *S. mutans* e *Lactobacillus*, favorecendo a criação de um micro-ambiente com pH ácido (Metwalli et al., 2013; Falsetta et al., 2014)

O acúmulo de biofilme sobre a superfície dental e seu desenvolvimento ao longo do tempo, também ocasiona inflamação dos tecidos periodontais, podendo conduzir à instalação da gengivite e da periodontite (Socransky et al., 1998; Huang e Artun, 2001; Socransky et al., 2002; Socransky e Haffajee, 2005; Naranjo et al., 2006; Sudjalim et al., 2007; Lang et al., 2009), principalmente na presença de micro-organismos anaeróbios Gram-negativos periodontopatogênicos (Socransky e Haffajee, 2005; Slots e Slots, 2011).

Na área da Ortodontia, trabalhos de pesquisa tem sido realizados para detecção de micro-organismos *in situ*, em aparelhos removíveis e fixos, incluindo bráquetes metálicos, tradicionalmente por técnicas de cultura microbiana (Brêtas et al., 2005; Lessa et al., 2007; Peixoto et al., 2011), por técnicas de microscopia (Magno et al., 2008; Nascimento et al., 2013) e, mais recentemente, por técnicas de biologia molecular (Anhoury et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2011a,b; Andrucioli et al., 2012; Nelson-Filho et al., 2012; Barker et al., 2013), entre outras. As técnicas de biologia molecular permitem a detecção de micro-organismos nutricionalmente exigentes e de difícil cultivo, tornando possível a identificação de espécies bacterianas de maneira mais confiável, por meio de sondas de DNA.

Dentre as técnicas de biologia molecular, encontra-se a técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*, preconizada por Socransky et al., em 1994, e empregada em Odontologia nas áreas de Periodontia (Lee et al., 2005; Dahlén e Leonhardt, 2006; Gellen et al., 2007; Teles et al., 2010; Gojkov-Vukelic et al., 2013), Endodontia (Vianna et al., 2008; Siqueira e Rôças, 2009; 2013), Implantodontia (Duarte et al., 2009; do Nascimento et al., 2009; do Nascimento et al., 2013), Odontopediatria (Gizani et al., 2009; Papaioannou et al., 2009; Peixoto et al. 2011; de Oliveira et al. 2014) e Cariologia (Gizani et al., 2009; Papaioannou et al., 2009; Manna et al., 2013).

Empregando a técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*, Haffajee et al. (2008) dividiram os micro-organismos encontrados no biofilme supragengival em complexos roxo, amarelo, verde, laranja, vermelho e grupo dos *Actinomyces* (complexo azul). Além disso, haviam micro-organismos que não foram classificados em nenhum dos complexos anteriores, sendo considerados como "outras espécies". Socransky et al. (1998) relataram que as espécies pertencentes ao complexo vermelho estão altamente associados com a doença periodontal, com bolsas periodontais profundas e com a presença de sangramento à sondagem. O complexo laranja parece preceder o vermelho e tem característica menos agressiva. As espécies dos complexos amarelo, verde, roxo e o grupo dos *Actinomyces* demonstraram grande associação entre si e menor associação com o vermelho e laranja, sendo compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro, detectadas nos sítios gengivais mais saudáveis, no início da formação do biofilme; não estão relacionados com doenças específicas e geralmente colonizam o biofilme dental previamente às espécies dos complexos laranja e vermelho.

Especificamente na Ortodontia, a técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization* foi empregada inicialmente no estudo de Anhoury et al., (2002), para avaliar a contaminação microbiana de bráquetes metálicos e cerâmicos. Estudos posteriores foram publicados por nosso Grupo de Pesquisa, empregando essa técnica para a determinação da contaminação de bráquetes metálicos, *in situ*, por micro-organismos dos complexos roxo, amarelo, verde, azul, laranja e vermelho (Andrucioli et al., 2012), por micro-organismos cariogênicos (Nelson-Filho et al., 2011a), por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Nelson-Filho et al., 2012) e por micro-organismos periodontopatogênicos Gram-negativos (Nelson-Filho et al., 2011b). No entanto, até o momento não há estudos publicados utilizando essa técnica para a avaliação dos níveis de contaminação microbiana de outros desenhos de bráquetes, como os autoligados.

Paralelamente, sabe-se que o acúmulo de biofilme nos tecidos dentários próximos à gengiva livre promove inflamação gengival, resultante diretamente da liberação de toxinas, lipopolissacarídeos (LPS) e enzimas e, indiretamente, pela resposta autoimune do organismo (Azuma, 2006; Sudjalim et al., 2007; Lo et al., 2008; Demling et al., 2009; Armitage e Robertson, 2012). Em condições patológicas, como nas periodontites e nas patologias periapicais, há liberação de citocinas e quimiocinas (Belibasakis e Bostanci, 2012).

Nos estágios iniciais da gengivite, observa-se a transudação através do endotélio vascular, extravasamento de leucócitos e outras células de migração, alargamento dos espaços intercelulares do epitélio superficial e liberação gradual de imunomediadores inflamatórios

para o fluido crevicular, tais como as interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e imunoglobulinas (Marcaccini et al., 2010). Posteriormente, linfócitos T e B migram para o sítio da lesão (Ziegler et al., 2010).

A resposta imunológica pode ser do tipo adquirida, mediada por linfócitos T e B, e/ou inata, mediada por citocinas e quimiocinas inflamatórias ou por células fagocitárias (Lee et al. 2004; Iwasaki et al., 2006; Lang et al., 2009; Marcaccini et al., 2010). As respostas inatas são geradas nos sítios periféricos à penetração microbiana e, nestes locais, uma resposta imune-adaptativa é gerada, como nos nódulos linfáticos ou no baço. Os linfócitos T secretam citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α , etc.) e quimiocinas (IL-8, proteínas teciduais, EGF, etc.) que induzem à citólise da célula alvo, enquanto que os linfócitos B secretam imunoglobulinas, que são responsáveis por eliminar micro-organismos extracelulares, por exemplo (Azuma, 2006).

Paralelamente, sabe-se que a movimentação ortodôntica gera um deslocamento gradual dos fluidos no interior do ligamento periodontal, com deformação das células e da matriz extracelular. Durante o movimento ortodôntico, o tecido periodontal responde rapidamente ao estresse mecânico, por meio de alterações metabólicas, liberando mediadores inflamatórios como as prostaglandinas E2, interleucinas e neuropeptídeos. Estas alterações podem ser identificadas no fluido crevicular (Dudic et al., 2006).

O fluido crevicular é um derivado de soro, composto por leucócitos, micro-organismos, células epiteliais do periodonto, células do tecido conjuntivo e células ósseas, além de substâncias derivadas do metabolismo bacteriano e do hospedeiro, que emerge dos capilares teciduais, entre a superfície dental e o epitélio. Sua drenagem é feita através do sistema linfático (Griffiths, 2003). O fluido crevicular é um importante marcador da ecologia do sulco ou da bolsa periodontal, que elimina partículas de carbono e citocinas secretadas, além da capacidade de isolamento, fazendo com que substâncias externas não penetrem facilmente no sulco (Goodson, 2003; Griffiths, 2003; Lamster e Ahlo, 2007).

A análise do fluido crevicular é um método adequado para estudos em humanos, pois pode ser aplicado de forma não invasiva e permite repetir a coleta no mesmo sítio (Griffiths, 2003; Uitto, 2003; Yamaguchi, 2009; Zainal Ariffin et al., 2011). A quantidade e os tipos de citocinas encontradas no fluido crevicular podem determinar a severidade da doença e o grau de inflamação (Socransky et al., 1994; Kaufman e Lamster, 2000; Goodson, 2003; Lee et al., 2004; Haffajee et al., 2008). Um equipamento eletrônico denominado "Periotron® 8000" tem sido utilizado para determinar o volume coletado, sendo considerado como padrão ouro na determinação do volume do fluido crevicular (Griffiths, 2003).

Tradicionalmente, a concentração de citocinas nos tecidos e nos fluidos teciduais são avaliadas por meio do imunoensaio ELISA (Ribagin e Rashkova, 2012; Kim et al., 2013; Wang et al., 2013). Entretanto, este teste requer volumes maiores para análise, limitando a avaliação de amostras com volumes reduzidos (Gaestel et al., 2002; Hoffmann et al., 2002). O *Luminex*® é uma técnica que utiliza cores de microesferas uniformes com dois corantes fluorescentes. Por meio de concentrações precisas destes corantes, 100 distintos conjuntos de esferas de cores podem ser criados, cada um revestido com um anticorpo de captura específico permitindo, assim, que pequenos volumes sejam avaliados com precisão, apesar de realizar múltiplas análises de citocinas simultaneamente (Dupont, 2005).

Estudos recentes apontam que as citocinas e as quimiocinas são a chave para a compreensão da reabsorção óssea, durante o movimento ortodôntico (Garlet et al., 2008; Andrade et al., 2009; García-López et al., 2013; Kitauro et al., 2014), e para o estudo de condições patológicas inflamatórias, como a gengivite e periodontite (Cochran, 2008; Ramseier et al., 2009). Estes mediadores podem levar à reabsorção óssea e/ou radicular (Consolaro e Consolaro, 2009; Vicielli et al., 2009; de Rossi et al., 2010; De Oliveira et al., 2014).

A remodelação óssea é controlada pelo equilíbrio entre RANK/RANKL/OPG (Yamaguchi, 2009; Belibasakis e Bostanci, 2012). O sistema RANK/RANKL/OPG é responsável pela estimulação/paralisação dos processos de reabsorção dos tecidos mineralizados (Yamaguchi, 2009; Belibasakis e Bostanci, 2012). Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF- α regulam o equilíbrio entre as proteínas desse sistema, atuando de modo a aumentar a expressão de RANKL e diminuindo a OPG (Lee et al., 2004; Iwasaki et al., 2006; Carmona-Rodríguez et al., 2007; Belibasakis e Guggenheim, 2011) ocasionando, deste modo, patologia óssea destrutiva (Cochran, 2008).

Acredita-se que os diferentes desenhos dos bráquetes também poderiam interferir no maior ou menor acúmulo de biofilme bacteriano (van Gastel et al., 2007) e, possivelmente, modular a liberação de citocinas pro-inflamatórias. Os bráquetes autoligados apresentam um desenho que facilita a higienização e a ausência de ligaduras para fixação do arco ortodôntico no slot parece diminuir o número de sítios de retenção de biofilme dental (Čelar et al., 2013; Fleming e O'Brien, 2013). Este tipo de bráquete foi lançado no comércio especializado em 1930, com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento e o desconforto causado ao paciente e diminuir o tempo de atendimento no consultório, uma vez que não seria necessário o uso de ligaduras para retenção do fio no slot. Os bráquetes autoligados podem ser divididos em duas categorias: 1) Ativos, onde a trava promove força sobre o fio; e 2) Passivos, que apenas apresentam um travamento lateral sem exercer força sobre o fio. Como exemplo de bráquetes

autoligados ativos e passivos pode-se citar, respectivamente, o In-Ovation®R (Dentsply – GAC) e o SmartClip™ (3M Unitek) (Chen et al., 2010; Fleming e Johal, 2010).

Na literatura específica, observa-se que vários autores vem se preocupando em avaliar a contaminação microbiana de bráquetes autoligados, após sua utilização clínica (Pellegrini et al., 2009; Ireland et al., 2013; Mummolo et al., 2013; Pejda et al., 2013). No entanto, esses trabalhos são restritos à utilização de técnicas de cultura microbiana e PCR (van Gastel et al., 2007; Pandis et al., 2010; Baka et al., 2013; Jurela et al., 2013). Além disso, de acordo com uma revisão sistemática recentemente publicada, os autores concluíram que não há evidências suficientes, até o momento para embasar uma possível influência do desenho do bráquete (convencional ou autoligado) sobre a formação de unidades formadoras de colônias e adesão, porém limitada aos *Streptococcus mutans* (Nascimento et al., 2014).

Pelo exposto, verifica-se a importância da realização de estudos clínicos avaliando o efeito do uso de diferentes desenhos/tipos de bráquetes sobre a microbiota salivar, sobre o biofilme *in situ* e sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular, a fim de estabelecer protocolos clínicos com menor risco de desencadear doenças como a cárie dental e a doença periodontal.

Para abordar o tema proposto, foram desenvolvidos estudos divididos nos 4 capítulos a seguir:

1. Alterações no volume do fluido crevicular e nos parâmetros periodontais, após a colagem de bráquetes metálicos autoligados e convencionais.
2. Micro-organismos relacionados direta ou indiretamente à cárie dental, na saliva e *in situ*, em diferentes tipos de bráquetes (convencionais e autoligados).
3. Detecção de complexos microbianos pela técnica *checkerboard DNA DNA hybridization*, pré e pós-colagem de bráquetes convencionais e autoligados.
4. Níveis de citocinas no fluido crevicular e perfil microbiano *in situ*, após a colagem de bráquetes convencionais e autoligados.

Capítulo 1

Alterações no volume do fluido crevicular e nos parâmetros periodontais, após a colagem de bráquetes metálicos autoligados e convencionais.

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por vários micro-organismos incluindo bactérias, vírus e fungos. Sendo colonizada por bactérias que podem causar doenças como a cárie e a doença periodontal. Quando o equilíbrio biológico é rompido, a doença se manifesta (Socransky et al., 1998; Haffajee e Socransky, 2005; Wade, 2013).

O acúmulo de biofilme nos tecidos dentários próximos à gengiva livre promove a inflamação gengival, resultante diretamente da liberação de toxinas, lipopolissacarídeos ou enzimas, e indiretamente da resposta imune do organismo (Azuma, 2006; Sudjalim et al., 2007; Lo et al., 2008; Demling et al., 2009; van Gastel et al., 2009; Armitage e Cullinan, 2010). Fatores de proteção do hospedeiro, como o epitélio, o fluido crevicular, a imunidade e a capacidade de regeneração celular podem controlar a ação dos periodontopatógenos (Armitage e Cullinan, 2010).

Os aparelhos ortodônticos promovem alterações no meio bucal (Anhoury et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2011a,b Andrucio et al., 2012), em função da variedade de materiais sólidos e elásticos utilizados em sua composição (Steinberg e Eyal, 2004), bem como seus diferentes desenhos (van Gastel et al., 2007). As superfícies irregulares atuam como áreas de retenção elevando, assim, a concentração de micro-organismos (Leung et al. 2006; Lessa et al., 2007; Magno et al., 2008). Além disso, dificultam a higienização e limitam a autolimpeza mecânica promovida pela saliva e pela movimentação da musculatura (Faltermeier et al., 2007). A presença de apinhamento, overjet, overbite e mordida aberta também podem interferir no acúmulo de biofilme (Ashley et al., 1998; Staufer e Landmesser, 2004; Ngom et al., 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vivo*, as alterações no índice de placa (PI), índice gengival (GI), índice de sangramento gengival (GBI) e no volume do fluido crevicular, em pacientes com 3 diferentes tipos de bráquetes metálicos (autoligados e convencionais), a fim de verificar se o desenho dos bráquetes interfere no acúmulo de placa e na saúde gengival.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi previamente submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado sob o número 2010.1967.58.2. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis.

Selecionou-se 20 pacientes de ambos os sexos, sendo 11 do sexo feminino (55%) e 9 do sexo masculino (45%), com idade variando entre 11 e 15 anos (média de 13,3 anos; $SD \pm 1,03$), com dentição permanente completa, da Clínica de Especialização de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão: não terem realizado tratamento ortodôntico prévio; não terem feito uso de antibiótico nos 3 meses que antecederam o estudo; não estarem sob uso de medicação sistêmica; não terem sido submetidos a tratamento periodontal nos 3 meses anteriores ao início do estudo; não serem fumantes; não apresentarem sinal clínico de gengivite e não serem portadores de desordens sistêmicas que pudessem interferir na condição periodontal, previamente à instalação do aparelho; não apresentarem anomalias craniofaciais; e não apresentarem apinhamento, overjet e overbite severos, segundo critérios ICON (Daniels & Richmond, 2000).

Após a seleção dos pacientes procedeu-se à determinação do índice de placa (Löe, 1965); índice de sangramento gengival (Ainamo e Bay, 1975) e índice gengival (Löe, 1965). Para estes procedimentos foram utilizadas sondas periodontais milimetradas tipo PCPUNC-BR15 (HuFriedy do Brasil, RJ, RJ, Brasil).

Posteriormente, foi realizada a profilaxia utilizando pasta à base de água e pedrapomes de granulação fina sem flúor (S.S. White, Petrópolis, RJ, Brasil), taça de borracha. A seguir os dentes foram lavados e secos com jatos de ar comprimido.

O fluido crevicular foi coletado como preconizado por Iwasaki et al. (2001): o dente foi isolado com rolo de algodão e levemente seco com jato de ar. Uma tira de papel absorvente (PerioPaper®, Oraflow Inc., Plainview, USA) foi introduzida, cuidadosamente, no sulco gengival até o oferecimento de resistência, e mantida em posição por 30 segundos. Foram coletadas amostras de 3 regiões da face vestibular, de incisivos e caninos superiores, (região mesial, central e distal) de maneira consecutiva, sendo obtido o volume total para cada dente.

O volume do fluido crevicular, em cada tira de papel, foi quantificado por meio do aparelho Periotron® 8000 (Oraflow Inc., Plainview, USA), previamente calibrado. Para minimizar o efeito da evaporação, este volume foi mensurado no máximo 5 segundos após a

remoção. A curva de calibração foi construída por meio de regressão polinomial de quarta ordem (Chapple, 1999). Por meio desta curva de calibração, os volumes desconhecidos das amostras foram obtidos, convertendo-se os *scores* que o aparelho fornece em volume (μL) do fluido crevicular.

Em seguida, os 20 pacientes selecionados receberam, nos incisivos e caninos superiores, bráquetes metálicos convencionais (Gemini™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) e dois tipos de bráquetes metálicos autoligados (In-Ovation®R, Dentsply, GAC e SmartClip™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), que foram colados de forma aleatória em sistema de rodízio. Todos os bráquetes foram colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante (Figura 1). Durante a colagem, tomou-se o cuidado para que o agente de união (XT primer) não entrasse em contato com o tecido gengival. Após a colagem foi inserido um fio ortodôntico 0.14" (Dentsply, GAC), de maneira passiva para não promover movimentação (Figura 1).

Figura 1- Colagem dos bráquetes e colheita do fluido crevicular.

- A-** Bráquete autoligado SmartClip™.
- B-** Bráquete convencional Gemini™.
- C-** Bráquete autoligado In-Ovation®R.
- D-** Colagem dos bráquetes nos seis dentes anteriores superiores.
- E-** Aparelho Periotron® 8000.
- F-** Tira de papel absorvente, PerioPaper®.
- G-** Colheita do fluido gengival crevicular.

Após a montagem dos aparelhos ortodônticos, todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal, fornecidas por um único operador e, para minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados obtidos, os mesmos receberam escovas dentais (Professional®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, S B Campo, SP, BR) e dentifrício fluoretado (Creme Dental Oral-B® Pro-Saúde®, 2012 Procter & Gamble do Brasil) para higiene bucal diária.

Decorridos trinta (T1) e sessenta (T2) dias da montagem do aparelho, nova coleta de dados foi realizada.

Para o índice de placa no tempo T0, utilizou-se a média do índice dos seis dentes anteriores, como preconizado por Pandis et al. (2008). Nos tempos T1 e T2 empregaram-se os valores individuais coletados de cada dente especificamente.

Análise estatística

Para comparação do PI, GI e GBI entre os diferentes tipos de bráquetes foram aplicados os testes não-paramétricos de Friedman e Wilcoxon, com correção de Bonferroni.

Para avaliar o volume do fluido crevicular empregou-se teste não-paramétrico de Wilcoxon. As variáveis do volume do fluido crevicular entre os sexos foi comparado por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

A correlação entre os parâmetros periodontais, oclusão e fluido crevicular foi realizada pelo coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman.

O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sexos, para os escores de PI, GI e GBI escores e volume do fluido crevicular, entre os três diferentes tipos de bráquetes. Não houve correlação entre o grau de apinhamento, overjet e overbite com os escores de PI, GI e GBI e volume do fluido crevicular no tempo inicial T0 ($p > 0,05$).

Os dentes que receberam o bráquete metálico convencional Gemini™ e o autoligado In-Ovation®R não apresentaram diferença estatisticamente significativa para PI quando comparados os tempos T0, T1 e T2 ($p = 0,54$). Entretanto, os dentes que receberam bráquete autoligado SmartClip™ apresentaram diferença significativa para PI entre os tempos avaliados ($p = 0,04$). Aplicando-se o teste Wilcoxon observou-se que a diferença significativa ocorreu entre os tempos T0 e T2 com valores maiores em T2 ($p = 0,04$) (Figura 2).

Figura 2- Índice de Placa. T0- antes da colagem; T1-30 dias depois da colagem; T2-60 dias depois da colagem dos bráquetes convencionais (Gemini™), bráquetes autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R); * diferença estatística.

Não foi observada diferença significativa no GBI e GI nos dentes analisados, independentemente do tipo de bráquete utilizado ($p > 0,05$) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1- Análise descritiva do Índice de Sangramento Gengival, pré e pós colagem de bráquetes convencionais (Gemini™), e autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R)

Bráquete		M (Q1-Q3)	p
Gemini™	T0	0,0 (0,0-1,0)	>0,05
	T1	0,0 (0,0-2,0)	
	T2	0,0 (0,0-2,0)	
SmartClip™	T1	0,0 (0,0-2,0)	>0,05
	T2	0,0 (0,0-2,0)	
	T2	0,0 (0,0-2,0)	
In-Ovation®R	T1	0,0 (0,0-2,0)	>0,05
	T2	0,0 (0,0-2,0)	
	T2	0,0 (0,0-2,0)	

T0 – antes da colagem dos bráquetes; T1- 30 dias após a colagem dos bráquetes; T2- 60 dias após a colagem dos bráquetes; M – mediana; Q1- primeiro quartil; Q3- terceiro quartil.

Tabela 2 – Análise descritiva do Índice Gengival, pré e pós colagem de bráquetes convencionais (Gemini™), e autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R)

Bráquete		Sítio Mesiovestibular M (Q1-Q3)	Sítio Vestibular M (Q1-Q3)	Sítio Distovestibular M (Q1-Q3)	p
Gemini™	T0	1,0 (1,0-1,67)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,17)	>0,05
	T1	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	
	T2	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	
SmartClip™	T1	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,17)	>0,05
	T2	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	
In-Ovation®R	T1	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,17)	>0,05
	T2	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	

T0 – antes da colagem dos bráquetes; T1- 30 dias após a colagem dos bráquetes; T2- 60 dias após a colagem dos bráquetes; M – mediana; Q1- primeiro quartil; Q3- terceiro quartil.

Com relação ao volume do fluido crevicular, não foi possível detectar diferença significativa entre os dentes que receberam bráquete convencional Gemini™ e o autoligado In-Ovation®R ($p>0,05$).

Para os dentes que receberam, bráquetes autoligados SmartClip™, verificou-se diferença significativa quando comparou-se T0 e T2 (0,01), sendo os valores de T2 maiores que os de T0 (Figura 3).

Figura 3- Volume do fluido crevicular, antes (T0) da colagem, 30 (T1) e 60 (T2) dias após a colagem de bráquetes autoligados SmartClip™; bráquetes convencionais Gemini™ e bráquetes autoligados In-Ovation®R. *diferença estatística.

Não houve correlação significativa entre PI e o volume do fluido crevicular, nos dentes que receberam os bráquetes autoligados In-Ovation®R e o convencionais Gemini™. Correlação positiva foi observada apenas nos dentes que receberam o bráquete autoligado SmartClip™ no tempo T2 ($p=0,05$).

DISCUSSÃO

No presente estudo não foi observada correlação entre o volume do fluido crevicular e os parâmetros periodontais com apinhamento, overjet e overbite, antes da colagem dos bráquetes. Este dado sugere que a maloclusão não interferiu nos resultados obtidos neste trabalho. Do mesmo modo, Ingervall et al. (1977) e Ashley et al. (1998) não encontraram efeito adverso do apinhamento sobre o periodonto, em casos de pacientes com adequada higiene bucal. No entanto, Staufer e Landmesser (2004) encontraram correlação entre gengivite crônica e apinhamento maior que 3mm. No presente estudo, a maioria dos pacientes não apresentaram apinhamento ou apresentaram apinhamento leve de aproximadamente 2mm, e apresentaram pequeno overbite e overjet.

Vários fatores podem interferir na gênese da doença periodontal, como o epitélio, o fluxo salivar, o fluido crevicular, a imunidade celular, a capacidade de regeneração celular inata do organismo (Zambon, 1996; Papaioannou et al., 2009; Armitage e Cullinan, 2010) e, também, a localização do dente na arcada, além da efetividade da higiene bucal (Papaioannou et al., 2009). Neste estudo os diferentes bráquetes foram colados na região de incisivos e caninos superiores em sistema de rodízio, uma vez que, segundo Haffajee et al. (2009), a região de incisivos e caninos superiores apresenta a menor quantidade e o menor número de espécies de micro-organismos, e é de fácil higienização, minimizando a interferência da capacidade individual de efetividade de escovação.

A posição de colagem dos acessórios é outro fator de inferência na alteração da microbiota e acúmulo de biofilme (van Gastel et al., 2007). Neste estudo, todos os acessórios foram colados supra-gengivalmente e no mínimo 0,5mm aquém da margem livre da gengiva. Portanto, as possíveis alterações encontradas não foram reflexo da penetração sub-gengival do acessório que, segundo Lee et al. (2005) e Gomes et al. (2007), podem interferir no acúmulo de biofilme e no volume do fluido crevicular.

Além disso os adesivos dentinários podem promover uma reação adversa na gengiva, pois apresentam toxicidade sobre os fibroblastos (Huang et al., 2006) e os monômeros residuais podem promover inflamação gengival e irritação (Gioka et al., 2005). No

presente estudo, a fim de efetuar uma avaliação longitudinal pós-colagem de diferentes tipos de bráquetes, os dados foram coletados antes da colagem e após 30 e 60 dias da colagem dos bráquetes, para que os resíduos de adesivo ou a ação do ácido condicionante(Lee et al., 2005; Gomes et al., 2007;) não interferissem no volume do fluido ou ocasionassem irritação gengival.

Há consenso na literatura de que, após a colagem do aparelho ortodôntico, ocorre alteração da microbiota bucal, podendo ocasionar gengivite e desenvolvimento de doença periodontal(Steinberg e Eyal, 2004; Baka et al., 2013; Nascimento et al., 2013). Neste estudo, verificou-se um aumento não significativo dos parâmetros avaliados nos tempo T1 e T2, quando comparou-se os três tipos de bráquetes, corroborando com os achados de Pandis et al. (2008) que não verificaram diferenças no índice de placa ao compararem bráquetes autoligados com convencionais.

No entanto, o aumento no índice de placa e no volume do fluido crevicular se mostrou significativo, quando comparou-se os dados coletados nos diferentes tempos, somente nos dentes que receberam os bráquetes autoligados SmartClip™, sugerindo que o desenho do bráquete pode aumentar o acúmulo de placa e o volume do fluido. Não houve diferença com relação ao aumento no índice de placa e do volume do fluido crevicular para bráquetes convencionais Gemini™ e autoligados In-Ovation®R, já o bráquete autoligado SmartClip™ que apresenta um diâmetro mesio-distal maior que o outro bráquete autoligado analisado e um sistema de travamento lateral, adotado pelo fabricante para diminuir área retentiva, promoveu maior retenção de placa, segundo os resultados obtidos neste trabalho, indicando que o tamanho e o desenho deste bráquete interferiu nos parâmetros analisados.

O fluido crevicular é influenciado pela inflamação dos tecidos gengivais(Socransky e Haffajee, 2005). Em situações de saúde, apresenta um fluxo de 3-8µL/h e, quando estimulado, em situação de inflamação se transforma em um exsudato inflamatório e seu fluxo aumenta para 20 µL/h (Griffiths, 2003). No presente estudo, ocorreu alteração significativa do volume do fluido crevicular apenas para o bráquete autoligado SmartClip™, entre os tempos T0 e T2. De acordo com Teles et al.(2009), a alteração do volume do fluido pode ser um fator importante para o monitoramento da progressão da doença periodontal. Deve-se ressaltar que, no presente estudo, ocorreu aumento significativo em T2, no volume do flui

do crevicular e índice de placa, para o bráquete SmartClip™.

van Gastel et al. (2011) constataram em um estudo recente que as alterações gengivais que ocorreram durante o uso de aparelhos ortodônticos são reversíveis, porém a

evolução de problemas periodontais, em pacientes jovens, são incertas e, portanto, medidas que venham prevenir e minimizar as alterações na microbiota devem ser adotadas.

Os dados do presente estudo também apontam para que medidas de prevenção sejam tomadas, visando minimizar possíveis alterações periodontais. Os resultados revelaram o aumento no Índice de placa e no volume do fluido crevicular 60 dias após a colagem dos bráquetes autoligados SmartClip™, indicando que o desenho do bráquete pode influenciar nos parâmetros clínicos nos estágios iniciais do tratamento ortodôntico.

Capítulo 2

Micro-organismos relacionados direta ou indiretamente à cárie dental, na saliva e *in situ*, em diferentes tipos de bráquetes (convencionais e autoligados)

INTRODUÇÃO

A desmineralização do esmalte e a cavitação, em decorrência da cárie dental, estão entre os principais tópicos de interesse na área da Ortodontia (Baka et al., 2013; Jung et al., 2014), pois este problema clínico é relevante e compromete, inclusive, a estética (Ramoglu et al., 2009). A cárie dental é causada pela produção de ácidos, resultante da fermentação de carboidratos da dieta pelas bactérias, na cavidade bucal, principalmente pelas espécies *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus* ssp. (Iwano et al. 2010; Saravia et al., 2011; Takahashi e Nyvad, 2011). Um aumento destas espécies ocorre entre 6 e 12 semanas após a instalação de aparelhos ortodônticos (Sanpei et al., 2010).

Dentre as espécies de micro-organismos que compõem o grupo mutans, *S. mutans* é a espécie mais frequentemente isolada. Entretanto, estudos recentes relataram a importância da coexistência das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* no desenvolvimento da cárie dental e na elevação do risco à cárie nos pacientes multicolonizados. Os *S. sobrinus* são mais dependentes de sacarose que os *S. mutans*, sendo mais acidogênicos (Seki et al. 2006; Saravia et al. 2011; Ghasempour et al., 2013). Sabe-se que os níveis salivares de micro-organismos como *S. mutans*, *Lactobacillus* ssp. e *S. sobrinus* podem predizer o risco de desenvolver manchas brancas e lesões de cárie, durante o tratamento ortodôntico (Al Mulla et al., 2009; Sanpei et al., 2010; Jurela et al., 2013).

Paralelamente, a literatura relata a importância da avaliação de outras espécies como *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis* e *S. sanguinis*, pois estas bactérias intituladas colonizadoras pioneiras estabelecem pontos de fixação e podem antagonizar ou favorecer a colonização por *S. mutans* e *Lactobacillus* (Becker et al., 2002; Kreth et al., 2005). Espécies de *Candida* ssp também interagem com *S. mutans* e *Lactobacillus*, favorecendo a criação de um microambiente com pH ácido (Metwalli et al., 2013; Falsetta et al., 2014).

As alterações microbiológicas que ocorrem após a instalação dos aparelhos ortodônticos também se tornaram um tópico bastante estudado a partir dos anos 1980. Estudos empregando técnicas de cultura microbiana (Bretas et al., 2005; Papaioannou et al., 2007; Lessa et al., 2007; Brusca et al., 2007; Magno et al. 2008; Maruo et al., 2008; Peixoto et al., 2011) e biologia molecular (Anhoury et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2011 ab; Andrucio et al., 2012; do Nascimento et al., 2013) revelaram a ocorrência de colonização *in situ* por micro-organismos cariogênicos, como *S. mutans* e *Lactobacillus*, nas diferentes partes que compõem os aparelhos ortodônticos, incluindo os bráquetes convencionais.

Acredita-se que os diferentes desenhos de bráquetes sejam um fator que poderia interferir no acúmulo de biofilme bacteriano (van Gastel et al., 2007). Os bráquetes

autoligados, introduzidos na Ortodontia em 1930, apresentam um desenho que facilita a higienização e a ausência de ligaduras para fixação do arco ortodôntico no *slot* poderia diminuir o número de sítios de retenção de biofilme dental (Čelar et al., 2013; Fleming e O'Brien, 2013). No entanto, estudos avaliando a contaminação microbiana de bráquetes autoligados são escassos (Kaklamanos e Athanasiou 2011; Nascimento et al. 2014) e limitados basicamente ao bráquete da marca In-Ovation®R (Dentsply GAC), empregando técnicas de cultura microbiana (Chen et al., 2010; Fleming e Johal, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações nos níveis de diferentes micro-organismos envolvidos direta ou indiretamente na cárie dental, na saliva e *in situ*, pré e pós-colagem de diferentes tipos de bráquetes metálicos (convencionais e autoligados).

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo número 0062.0.138.000-10), foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis pelos pacientes participantes da pesquisa.

O cálculo amostral foi realizado pelo programa *SPSS SamplePower* (IBM *software-Statistical Package for the Social Sciences*, In. Chicago Illinois, USA), indicando que em uma amostra de 20 pacientes por grupo haveria 80% de probabilidade de ser evidenciado um efeito estatisticamente significativo. O cálculo foi baseado em cinco fatores: diferença das médias, dispersão dos escores, perda amostral, valor de alfa em 0,05 e considerando-se que os dados seriam avaliados segundo uma análise bicaudal.

Selecionou-se 20 pacientes de ambos os sexos, sendo 11 do sexo feminino (55%) e 9 do sexo masculino (45%), com idade variando entre 11 e 15 anos (média de 13,3 anos; SD $\pm$ 1,03), com dentição permanente completa, da Clínica de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão: não terem realizado tratamento ortodôntico prévio; não terem feito uso de antibiótico nos 3 meses que antecederam o estudo; não estarem sob uso de medicação sistêmica; não terem sido submetidos a tratamento periodontal nos 3 meses anteriores ao início do estudo; não serem fumantes; não serem portadores de desordens sistêmicas que pudessem interferir na condição periodontal, previamente à instalação do aparelho; não apresentarem anomalias craniofaciais; e não apresentarem apinhamento, overjet e overbite severos, segundo critérios ICON (Daniels e Richmond, 2000).

Além disso, todos os pacientes apresentavam, inicialmente, ausência de alterações periodontais, confirmada pelos seguintes índices: Índice de Placa (Loe, 1965); Índice de Sangramento Gingival (Ainamo e Bay, 1975); e Índice Gingival (Loe, 1965) no sítio mesiovestibular, Índice Gingival no sítio vestibular e Índice Gingival no sítio distovestibular nos incisivos e caninos superiores. Os valores medianos (1º quartil e 3º quartil) obtidos na amostra selecionada foram: Índice de placa 1,0 (1,0-2,0); Índice de sangramento gengival 0,0 (0,0-1,0); Índice Gingival no sítio mesiovestibular 1,0 (1,0-1,67); Índice Gingival no sítio mesial 1,0 (1,0-1,0); e Índice Gingival no disto vestibular 1,0 (1,0-1,17).

Previamente à colagem dos bráquetes ortodônticos foi coletado 1 mL de saliva não estimulada, em tubos tipo Falcon, contendo pérolas de vidro. Um total de 30 µL de saliva foram transferidos para tubos plásticos para microcentrifuga (*Eppendorf* AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 120 µL de solução tampão TE [10 mM Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Co., St.Luis, MO, EUA)] pH 7,6, homogeneizada em vortex por 30 segundos a 2000 rpm. A seguir, foram acrescentados 100 µL de NaOH (Labsynth) e os tubos foram estocados a -20°C, até o momento da análise molecular, para a determinação dos níveis iniciais dos seguintes micro-organismos (bactérias e fungos) na saliva (*baseline* – amostra S0): *Streptococcus mutans* (ATCC-25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC-27352), *Streptococcus gordonii* (ATCC-10558), *Streptococcus mitis* (ATCC-49456), *Streptococcus oralis* (ATCC-35037), *Streptococcus sanguinis* (ATCC-10556), *Lactobacillus casei* (ATCC-393), *Candida tropicalis* (ATCC-13803), *Candida krusei* (ATCC-2159), *Candida glabrata* (ATCC-66032), *Candida dubliniensis* (ATCC-44508) e *Candida albicans* (ATCC-10231).

Após a realização de profilaxia utilizando pasta à base de pedra-pomes e água e taça de borracha montada em contra-ângulo, em baixa rotação, os 20 pacientes selecionados receberam, nos incisivos e caninos superiores, bráquetes metálicos convencionais (Gemini™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) e dois tipos de bráquetes metálicos autoligados (In-Ovation®R, Dentsply GAC Islandia, NY, USA; e SmartClip™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), que foram colados de forma aleatória, em sistema de rodízio. Todos os bráquetes foram colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante, por 1 operador experiente. Após a colagem, foi inserido um fio ortodôntico 0,14" (Dentsply GAC, Islandia, NY, USA), de maneira passiva para não promover movimentação. Nos bráquetes convencionais foram utilizadas ligaduras elastoméricas (Morelli®, Sorocaba, SP, Brasil).

Após a colagem dos bráquetes ortodônticos, todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal, fornecidas pelo mesmo operador e, para minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados obtidos, os mesmos receberam escovas dentais (Professional® Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP, BR) e dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP, BR) padronizados, para higiene bucal diária.

Decorridos 30 (T1) e 60 (T2) dias após a colagem dos bráquetes, foi realizada nova colheita de 1 mL de saliva não estimulada (amostras S1 e S2) e remoção de um bráquete de cada tipo (convencional e autoligados In-Ovation®R e SmartClip™), para avaliação microbiológica *in situ*.

Um bráquete de cada tipo foi removido em T1, nestes dentes novos bráquetes foram colados. Em T2 todos os bráquetes foram removidos e analisados somente os que permaneceram por 60 dias na cavidade bucal. Quando removido o bráquete convencional, analisou-se o conjunto: bráquete e ligadura elastomérica, em T1 a ligadura permaneceu 30 dias e em T2 60 dias na cavidade bucal.

Os bráquetes removidos foram colocados individualmente em tubos plásticos para microcentrifuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 150 µL de solução tampão TE [10 mM Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Co., St. Luis, MO, EUA)], pH 7,6. Os tubos foram codificados e agitados vigorosamente em aparelho Mixtron, em velocidade máxima, para dessorção do material, sendo os bráquetes retirados dos tubos com uma pinça clínica esterilizada. Em seguida, foram acrescentados 100 µL NaOH (Labsynth) a 0,5M e os tubos foram estocados a -20°C, até o momento da análise microbiológica.

As amostras de saliva e as amostras obtidas dos bráquetes *in situ* foram analisadas pelo método *checkerboard DNA-DNA hybridization*, no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, seguindo o protocolo descrito por do Nascimento et al. (2009; 2010). As amostras foram fervidas por 5 minutos para desnaturação do DNA. Posteriormente, foram acrescentados 800µl de acetato de amônia (5M). O conteúdo de cada tubo das amostras foi depositado individualmente na membrana de nylon (HybondN⁺, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) a qual foi levada ao forno de hibridização por 2 horas a uma temperatura de 80°C, para fixação. Como controle, foram utilizadas quantidades de DNA correspondentes a 10⁵ e 10⁶ células dos micro-organismos em estudo, as quais foram também desnaturadas, precipitadas e aplicadas sobre as membranas.

Posteriormente, as membranas foram pré-hibridizadas a 60°C por 2 horas em solução de hibridização (*buffer hybridization*; NaCl 0,5 M; *blocking reagent* 0,4% w/v), seguida

da aplicação de sondas marcadas com o genoma das espécies em estudo. A hibridação foi realizada por 16 horas (*overnight*) a 60°C, com solução de hibridização, sob suave agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas duas vezes, a 65°C por 30 minutos, em solução primária de lavagem (*urea* 2M; *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 0,1%; NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,0; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1mM; *blocking reagent* 0,2) e duas vezes com solução secundária de lavagem (Tris base 1M; NaCl 2M, MgCl₂ 1M), à temperatura ambiente, por 15 minutos. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com reagente de detecção CDP-Star (GE Healthcare). Sinais positivos de hibridização foram detectados pela exposição da membrana em ECL Hyperfilm-MP (GE Healthcare). As imagens obtidas no filme foram digitalizadas e analisadas pelo programa TotalLab™ Quant v13 software (TotalLab Ltd, Newcastle, UK).

Pela comparação da intensidade dos sinais de quimioluminescência das amostras dos bráquetes com os grupos controles obtidos pelo *checkerboard DNA-DNA hybridization*, obteve-se a quantidade de micro-organismos em cada bráquete, em µg.

A comparação da quantidade de cada espécie avaliada na saliva e *in situ*, para os diferentes tipos de bráquetes, nos diferentes tempos, foi realizada por meio de teste não-paramétrico de Friedman e pós-teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas no SPSS Statistics 17.0 software (IBM Software-Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, Illinois, USA). O nível de significância adotado foi 5%.

RESULTADOS

Antes da colagem dos bráquetes ortodônticos identificou-se, na saliva, a presença de todos os micro-organismos avaliados, exceto *S. gordonii*. Por outro lado, nos períodos de 30 e 60 dias após a colagem, todas as 12 espécies de micro-organismos (bactérias e fungos) estavam presentes nas amostras coletadas.

Trinta dias após a colagem dos bráquetes ortodônticos, verificou-se aumento significativo, nos níveis salivares, apenas para *S. sobrinus* (p=0,02), *L. casei* (p=0,005) e *S. oralis* (p=0,02). No período de 60 dias, observou-se diferença significativa apenas para 2 espécies de *Candida* [*C. krusei* (p=0,0003) e *C. glabrata* (p=0,048)], cujos níveis sofreram redução, em comparação aos demais períodos.

Os níveis salivares dos micro-organismos avaliados (bactérias e fungos), antes e após 30 e 60 dias da colagem dos bráquetes, podem ser verificados na tabela 3.

Tabela 3 - Níveis de micro-organismos (em µg) na saliva de pacientes, antes e após 30 e 60 dias da colagem dos bráquetes

Micro-organismos	S0 M (Q1-Q3)	S1 M (Q1-Q3)	S2 M (Q1-Q3)	p
<i>S. sobrinus</i>	0,0 (0,0-271037)	280064 (266564-324660)	0,0 (0,0-330291)	0,0242* (S0≠S1)
<i>L. casei</i>	0,0 (0,0-325257)	170599 (0,0-214312)	0,0 (0,0-0,0)	0,0058* (S0≠S1)
<i>S. mutans</i>	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-193411)	0,0 (0,0-171906)	0,6361
<i>S. gordonii</i>	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,1462
<i>S. mitis</i>	0,0 (0,0-0,0)	80252 (0,0-188220)	0,0 (0,0-196861)	0,1520
<i>S. oralis</i>	0,0 (0,0-273842)	209922 (0,0-251802)	0,0 (0,0-0,0)	0,0180* (S0≠S1)
<i>S. sanguinis</i>	0,0 (0,0-272674)	249863 (202190-286498)	0,0 (0,0-0,0)	0,1409
<i>C. tropicalis</i>	260190 (0,0-270540)	161459 (0,0-188482)	197384 (166561-204803)	0,3628
<i>C. krusei</i>	271641 (259741-289643)	227514 (39416-263161)	191768 (0,0-218399)	0,0003* (S0≠S1)
<i>C. glabrata</i>	128245 (0,0-268632)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0487*
<i>C. dubliniensis</i>	131089 (0,0-274239)	214949 (0,0-274196)	0,0 (0,0-216409)	0,4325
<i>C. albicans</i>	0,0 (0,0-277106)	66045 (0,0-187348)	210996 (0,0-222619)	0,9852

S0: amostra de saliva obtida antes da colagem dos bráquetes; S1: amostra de saliva obtida 30 dias após a colagem; S2: amostra de saliva obtida 60 dias após a colagem; M – mediana; Q1- primeiro quartil; Q3- terceiro quartil. *: diferença significativa; #: diferença significativa no pós-teste.

Com relação aos níveis de micro-organismos nos bráquetes, *in situ*, observou-se a presença das 12 espécies de micro-organismos avaliadas (bactérias e fungos), 30 e 60 dias após a colagem, independentemente do desenho do bráquete (convencional ou autoligado). Os níveis dos micro-organismos avaliados (bactérias e fungos) nos bráquetes Gemini™ (convencional), In-Ovation®R e SmartClip™ (autoligados), antes e após 30 e 60 dias da colagem, podem ser verificados na tabela 4.

Tabela 4 - Níveis de micro-organismos (em µg) nos bráquetes convencionais (Gemini™), e autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R), *in situ*, 30 e 60 dias após da colagem dos bráquetes

Micro-organismos	Bráquetes	Mediana (Q1-Q3)	
		T1	T2
<i>S. sobrinus</i>	SmartClip™	229396,45(0,0-331093,10)	245250,08(145412,34-297163,59)
	Gemini™	103698,86(0,0-324453,20)	228529,34(0,0-316621,76)
	In-Ovation®R	269196,03(0,0-337686,73)	266417,09(32393,63-312299,09)
<i>L. casei</i>	SmartClip™	188451,44(0,0-270529,75)	0,0(0,0-244640,49)
	Gemini™	83599,13(0,0-271445,01)	0,0(0,0-244586,71)
	In-Ovation®R	238668,66(0,0-312317,47)	188793,37(0,0-248557,50)
<i>S. mutans</i>	SmartClip™	0,0(0,0-291153,74)	117437,54(0,0-248024,41)
	Gemini™	102961,77(0,0-299300,41)	168728,16(0,0-263970,05)
	In-Ovation®R	265645,18(0,0-321508,76)	190429,53(24783,26-267117,13)
<i>S. gordonii</i>	SmartClip™	63739,12(0,0-268349,86)	163418,56(0,0-278692,48)
	Gemini™	0,0(0,0-312829,34)	110543,01 (0,0-280680,52)
	In-Ovation®R	205810,92(0,0-285781,09)	94014,27(0,0-274832,84)
<i>S. mitis</i>	SmartClip™	224870,43(0,0-283854,55)	222423,38(167806,34-330565,51)
	Gemini™	249949,40(0,0-294321,99)	261267,63(114788,44-292419,04)
	In-Ovation®R	262582,27(0,0-360685,43)	245637,44(178210,77-338216,68)
<i>S. oralis</i>	SmartClip™	0,0(0,0-308353,89)	261866,37(142495,85-270881,00)
	Gemini™	102608,33(0,0-297789,01)	262905,13(171751,31-268280,58)
	In-Ovation®R	0,0(0,0-302435,52)	256674,76(156528,12-274384,12)
<i>S. sanguinis</i>	SmartClip™	0,0(0,0-212668,52)	263752,27(38114,82-318048,49)
	Gemini™	0,0(0,0-211476,08)	259467,05(0,0-295769,56)
	In-Ovation®R	67596,42(0,0-222247,24)	243114,19(0,0-311810,48)
<i>C. tropicalis</i>	SmartClip™	214423,93(0,0-290815,17)	266301,46(217816,96-280194,74)
	Gemini™	207813,34(0,0-307781,49)	259926,69(203584,53-270819,02)
	In-Ovation®R	248642,83(46757,04-222247,24)	266566,78(209800,44-280081,62)
<i>C. krusei</i>	SmartClip™	228723,58(0,0-305808,89)	194526,19(0,0-271091,50)
	Gemini™	0,0(0,0-262351,39)	231246,53(0,0-267602,95)
	In-Ovation®R	197653,61(0,0-293614,44)	247064,15(0,0-276256,22)
<i>C. glabrata</i>	SmartClip™	233010,78(0,0-289774,00)	263761,98(209816,66-273095,73)
	Gemini™	203070,01(0,0-262809,27)	231864,30(143796,45-268986,90)
	In-Ovation®R	234162,17(0,0-299763,68)	238464,29(24811,56-281343,85)
<i>C. dubliniensis</i>	SmartClip™	249629,36(0,0-330435,63)	213342,86(46312,89-264530,29)
	Gemini™	249629,36(0,0-330435,63)	238423,42(0,0-265894,52)
	In-Ovation®R	265475,77(0,0-328211,06)	156899,97(0,0-262567,60)
<i>C. albicans</i>	SmartClip™	0,0(0,0-281885,08)	0,0(0,0-142707,81)
	Gemini™	99267,75(0,0-269276,58)	0,0(0,0-257001,03)
	In-Ovation®R	0,0(0,0-243412,28)	0,0(0,0-260334,46)

T1: amostra *in situ*, obtida 30 dias após a colagem dos bráquetes; T2: amostra *in situ*, obtida 60 dias após a colagem dos bráquetes; Q1- primeiro quartil; Q3- terceiro quartil.

A comparação efetuada entre os bráquetes Gemini™ (convencional), In-Ovation®R e SmartClip™ (autoligados), nos períodos de 30 e 60 dias, permitiu evidenciar diferença significativa apenas para *S. mutans* ($p=0,047$), cujos níveis foram maiores no tempo T2 (60 dias após a colagem) para o bráquete autoligado In-Ovation®R (Figura 4).

Figura 4 - Níveis de *S. mutans*, *in situ*, nos diferentes bráquetes: autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R) e convencionais (Gemini™), 30 e 60 dias após a colagem.

Os níveis de *Candida ssp.*, *in situ*, se alteraram durante o período avaliado, como observado na tabela 4.

A comparação dos níveis de micro-organismos na saliva e nos bráquetes *in situ*, aos 30 dias, evidenciou diferença significativa para *S. mutans* ($p=0,004$), que mostrou maiores níveis para o bráquete autoligado In-Ovation®R (Figura 5).

Figura 5 - Níveis de *S. mutans* na saliva e *in situ*, 30 dias após a colagem dos bráquetes autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R) e convencionais (Gemini™).

No período de 60 dias, a comparação dos níveis de micro-organismos na saliva e nos bráquetes *in situ*, evidenciou diferença significativa para *L. casei* ($p=0,003$) e *S. mutans* ($p=0,049$), com maiores níveis para o bráquete autoligado In-Ovation®R (Figura 6).

Figura 6 - Níveis de *S. mutans* e *L. casei* na saliva e *in situ*, 60 dias após a colagem dos bráquetes autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R) e convencionais (Gemini™).

DISCUSSÃO

Sabe-se que é possível detectar a presença de bactérias cariogênicas na saliva antes da colonização das superfícies dentais. Por isso, a saliva vem sendo considerada um excelente marcador precoce para detecção do risco à cárie (Lawrence, 2002; Boutaga et al. 2007; Slots e Slots, 2011a). Existe interação entre os componentes salivares e micro-

organismos, que é determinante para os primeiros passos de formação do biofilme dental (Ahn et al., 2002; Kim et al., 2007). Entretanto, estudos evidenciam que os níveis bacterianos nas superfícies dentárias são mais elevados que os níveis salivares, e a contaminação *in situ* deve ser avaliada (Boutaga et al., 2007; Ramseier et al., 2009; Saygun et al., 2011). Esse fato foi também observado no presente estudo, onde os níveis de *S. mutans* e *L. casei*, que são micro-organismos cariogênicos, foram maiores nos bráquetes *in situ* que na saliva.

Os aparelhos ortodônticos promovem alterações específicas no meio bucal (Anhoury et al., 2002), em função da variedade de acessórios sólidos e elásticos utilizados (Steinberg e Eyal, 2004). Observa-se um aumento no acúmulo de biofilme microbiano, uma vez que os acessórios que constituem o aparelho apresentam superfícies irregulares, as quais funcionam como áreas de retenção elevando, assim, a concentração de micro-organismos na saliva e redução do pH (Ahn et al., 2007). Além disso, dificultam a higienização, limitam a ocorrência da auto-limpeza mecânica ocasionada pela saliva e pela movimentação da musculatura (Steinberg e Eyal, 2004).

O aumento da contaminação bacteriana, após a instalação do aparelho ortodôntico, pode ser influenciado por fatores como desenho do bráquete, ligadura utilizada para a fixação do fio, proximidade da colagem do bráquete com o sulco gengival e presença de molas e ganchos, dentre outros (Brêtas et al., 2005; Lessa et al., 2007; Magno et al., 2008; Jurela et al., 2013). A fim de controlar possíveis fatores de confusão que pudessem interferir nos resultados, no presente trabalho todos os bráquetes foram colados a pelo menos 0,5mm da gengiva livre, o excesso de material foi completamente removido e todos os pacientes receberam instrução de higiene bucal, escova dental e dentifrício padronizados. Além disso, a colagem dos bráquetes foi realizada somente na região anterior superior, por um único operador (Ortodontista) experiente, de tal modo que o mesmo número de cada tipo de bráquete fosse colado nos incisivos centrais, incisivos laterais e caninos, tanto do lado esquerdo quanto direito. A região anterior superior foi escolhida pois, segundo Haffajee et al. (2009), é a região que apresenta menor contaminação bacteriana e a escovação realizada pelos pacientes é mais efetiva.

A ligadura escolhida no presente trabalho para fixar o fio ao *slot* dos bráquetes convencionais foi a elastomérica, por ser a mais frequentemente utilizada pelos profissionais (Garcez et al., 2011; Condò et al., 2012). De acordo com os resultados obtidos, observamos maiores níveis de *S. mutans*, após 60 dias da colagem, apenas para o bráquete autoligado In-Ovation®R, em comparação ao bráquete convencional Gemini™, onde foram utilizadas as ligaduras elastoméricas.

Os *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. mitis* são considerados colonizadores pioneiros e podem inibir a colonização por *S. mutans*, competindo por sítios de adesão e ligação na superfície do esmalte, em função da produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Becker et al., 2002; Kreth et al., 2005). A análise dos dados obtidos *in situ* no presente trabalho permitiram evidenciar que, numericamente, houve diminuição dos níveis de *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. mitis*, no período de 60 dias, para os bráquetes SmartClip™ e Gemini™. No entanto, isso não ocorreu com o bráquete autoligado In-Ovation®R, onde observou-se redução dos níveis de *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. mitis* e concomitante aumento dos níveis de *S. mutans*, o que pode ser justificado pelo antagonismo existente entre essas espécies (Kolenbrander et al., 2006; Kuramitsu e Wang, 2006; Marsh, 2010; Takahashi e Nyvad, 2011). Esses resultados nos permitem inferir que o desenho do bráquete pode influenciar na contaminação microbiana dos bráquetes *in situ*. Embora Jurela et al. (2013), Pandis et al. (2010) e Mummolo et al. (2013) tenham avaliado a influência dos bráquetes autoligados (estéticos ou metálicos) nos níveis salivares de *S. mutans*, poucos trabalhos (Baka et al., 2013; Nascimento et al., 2013) foram publicados, até o momento, avaliando a contaminação *in situ*, nesses bráquetes.

Os resultados do presente estudo são discordantes dos apresentados por Baka et al. (2013) e Nascimento et al. (2013), que não verificaram diferença significativa na contaminação *in situ* por *S. mutans* entre bráquetes autoligados e convencionais, com ligaduras metálicas. Deve-se ressaltar que esses trabalhos foram conduzidos empregando a técnica PCR, e não a técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*, e um deles (Nascimento et al., 2013) foi efetuado com bráquetes autoligados estéticos, e não metálicos, como no presente trabalho.

As 3 espécies de micro-organismos cariogênicos avaliadas no presente estudo (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*) foram detectadas nos bráquetes *in situ*, em todos os pacientes (100%), independentemente do desenho do bráquete (convencional ou autoligado), durante todo o período experimental (30 e 60 dias). Esses resultados evidenciam que esses micro-organismos são componentes importantes da microbiota dos bráquetes convencionais e autoligados, em pacientes sob tratamento ortodôntico corretivo.

Com relação aos *S. sobrinus*, micro-organismos altamente agressivos, por serem muito acidogênicos e, portanto, serem extremamente cariogênicos (de Soet et al., 1990; van Hout, 1994; Becker et al., 2002), que predominam em pacientes com dieta rica em sacarose (Ajdić et al., 2002; Lindquist e Emilson, 2004), observou-se que, embora tenham sofrido aumento significativo na saliva 30 dias após a colagem dos bráquetes ortodônticos, não aumentaram significativamente nos bráquetes *in situ*, durante todo o período experimental.

A coexistência de *S. mutans* e de *S. sobrinus* parece ser um fator relevante no desenvolvimento da cárie dental. Pacientes que albergam essas 2 espécies de micro-organismos cariogênicos (pacientes multicolonizados) apresentam maior risco de desenvolvimento de lesões de cárie, quando comparadas a pacientes que apresentam apenas *S. mutans* (Rupf et al., 2006; Seki et al. 2006). No presente estudo, a multicolonização foi observada nos bráquetes *in situ*, independentemente do desenho (convencional e autoligado), durante todo o período experimental (30 e 60 dias após a colagem), evidenciando a elevação do risco à cárie dos pacientes, nos estágios iniciais do tratamento ortodôntico.

Com relação aos lactobacilos, Sari e Birinci (2007) observaram que os níveis desses micro-organismos foi de 34 unidades formadoras de colônias (ufc) na saliva de pacientes, após a instalação de aparelho ortodôntico fixo, enquanto os níveis de *S. mutans* foram muito mais altos (460 ufc). Essa menor contaminação dos bráquetes *in situ* por *L. casei*, em comparação aos *S. mutans*, também foi observada, numericamente, no presente trabalho, para todos os tipos de bráquetes. Ressalta-se que os *S. mutans* são encontrados em grande quantidade nas lesões de manchas brancas, pois apresentam a capacidade de adesão, enquanto os *Lactobacillus spp* estão associados à progressão da doença, uma vez que não apresentam capacidade de adesão e necessitam de uma cavidade desenvolvida para permanecerem retidos mecanicamente, onde já ocorreu danos aos tecidos dentais (Mummolo et al., 2013).

Estudos recentes demonstram, também que há uma interação entre *S. mutans* e *Candida ssp*. Os fungos produzem exoenzimas como aspartilproteinase e fosfolipases, que degradam imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular, inibem a fagocitose por neutrófilos, induzem reações inflamatórias (Hube e Naglik 2005) e aumentam a produção ácida, viabilizando a proliferação de *S. mutans* (Brusca et al., 2007; Metwalli et al., 2013; Falsetta et al., 2014). No entanto, no presente estudo não foi observado aumento significativo nos níveis de espécies fúngicas na saliva e nos bráquetes *in situ*, embora os níveis de *S. mutans* tenham sido maiores no tempo T2 (60 dias após a colagem) apenas para o bráquete autoligado In-Ovation®R. Esses resultados demonstram que, de maneira geral, as alterações nos níveis bacterianos de *S. mutans* não sofreram influência dos níveis de *Candida ssp*.

Micro-organismos envolvidos direta ou indiretamente na cárie dental foram observados na saliva e nos bráquetes *in situ*. Na saliva, houve aumento significativo de algumas espécies (*S. oralis*, *L. casei* e *S. sobrinus*) envolvidas na adesão e início e progressão do processo de desmineralização, nos estágios iniciais do tratamento ortodôntico com bráquetes. *In situ*, foram observados maiores níveis de *S. mutans* e *L. casei* no bráquete In-Ovation®R, indicando que o desenho do bráquete parece ter influência nos níveis bacterianos de espécies cariogênicas.

Capítulo 3

Detecção de complexos microbianos pela técnica *checkerboard DNA DNA hybridization*, pré e pós-colagem de bráquetes convencionais e autoligados

---

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por mais de 1000 espécies de micro-organismos (Wilson, 2004; Zanin et al., 2006), incluindo vírus, protozoários, fungos e bactérias, que coabitam em homeostase. Quando o equilíbrio biológico é rompido, as doenças podem se manifestar (Socransky et al., 1998; Socransky e Haffajee, 2005; Langet al., 2009; Kebschull e Pn, 2011; Wade, 2013).

Sabe-se que os aparelhos ortodônticos são compostos por vários acessórios que apresentam superfícies irregulares, as quais funcionam como áreas de retenção, promovendo aumento no acúmulo de biofilme microbiano e elevando a concentração de micro-organismos (Ahn et al., 2007; Magno et al., 2008; Andrucio et al., 2012; Jurela et al., 2013). Além disso, limitam a ocorrência da limpeza mecânica ocasionada pela saliva e pela movimentação da musculatura (Sukontapatipark et al., 2001; Faltermeier et al., 2007; Jurela et al., 2013), o que favorece o acúmulo e a adesão de micro-organismos nas partes que compõem os aparelhos ortodônticos, sob a forma de biofilme, formado a partir dos micro-organismos da cavidade bucal.

Em 2008, Haffajee et al., empregando a técnica de biologia molecular *checkerboard DNA-DNA Hybridization* (CDDH), observaram que os micro-organismos que compõem o biofilme supragengival podem ser divididos em 6 complexos: roxo, verde, azul, amarelo, laranja e vermelho. Além destas espécies, haviam micro-organismos que não foram incluídos em nenhum dos complexos anteriores e são denominados como “outras espécies”. As espécies microbianas dos complexos amarelo, verde e roxo não são associadas com doenças específicas, porém geralmente colonizam o biofilme dental antes dos complexos laranja e vermelho (Socransky et al., 1998). Por outro lado, os micro-organismos dos complexos laranja e vermelho estão envolvidos no desenvolvimento da doença periodontal (Socransky et al., 1998; Haffajee et al., 2008) e são diretamente associados com a inflamação gengival, comumente observada durante o tratamento ortodôntico (Sallum et al. 2004; Lee et al., 2005).

Os micro-organismos pertencentes ao complexo vermelho também estão altamente associados com a presença de bolsas periodontais profundas e sangramento à sondagem, enquanto que o complexo laranja parece preceder o vermelho e apresenta característica menos agressiva. As espécies dos complexos amarelo, verde, roxo e o grupo dos *Actinomyces* demonstraram grande associação entre si e menor associação com o vermelho e laranja, e são representados por diversas espécies consideradas compatíveis com o

hospedeiro, sendo detectadas nos sítios gengivais saudáveis, no início da formação de biofilme dental. São micro-organismos que não estão relacionados com doenças específicas e, geralmente, colonizam o biofilme dental previamente às espécies dos complexos laranja e vermelho (Socransky et al., 1998).

Anhoury et al. (2002) efetuaram um estudo clínico, a fim de avaliar se havia diferença na composição microbiana de bráquetes metálicos e cerâmicos, por meio da técnica CDDH. Concluíram que embora haja diferenças na composição do biofilme formado na superfície de cada tipo de bráquete, essa composição é, em grande parte, muito similar entre os bráquetes metálicos e cerâmicos, e a significância clínica desse fato ainda é desconhecida. Também empregando a técnica CDDH, Andrucioi et al. (2012) evidenciaram que os bráquetes metálicos convencionais são multicolonizados por várias espécies de micro-organismos, incluindo os pertencentes aos complexos roxo, verde, laranja e vermelho, após curtos períodos de permanência na cavidade bucal (1 mês).

Acredita-se que os diferentes desenhos dos bráquetes também poderiam interferir no maior ou menor acúmulo de biofilme bacteriano (van Gastel et al., 2007). Os bráquetes autoligados apresentam um desenho que facilita a higienização e a ausência de ligaduras para fixação do arco ortodôntico no slot diminui o número de sítios de retenção de biofilme dental (Čelar et al., 2013; Fleming e O'Brien, 2013). Este tipo de bráquete foi lançado no comércio especializado em 1930, com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento e o desconforto causado ao paciente e diminuir o tempo de atendimento no consultório, uma vez que não seria necessário o uso de ligaduras para retenção do fio no *slot* (Chen et al., 2010; Fleming e Johal, 2010). Na literatura específica, observa-se que vários autores vem se preocupando em avaliar a contaminação microbiana de bráquetes autoligados, após sua utilização clínica (Pellegrini et al., 2009; Ireland et al., 2013; Mummolo et al., 2013; Pejda et al., 2013). No entanto, esses trabalhos são restritos à utilização de técnicas de cultura microbiana e PCR (van Gastel et al., 2007; Pandis et al., 2010; Baka et al., 2013; Jurela et al., 2013). Além disso, de acordo com uma revisão sistemática recentemente publicada, os autores concluíram que não há evidências suficientes até o momento para embasar uma possível influência do desenho do bráquete (convencional ou autoligado) sobre a formação de unidades formadoras de colônias e adesão de *Streptococcus mutans* (Nascimento et al., 2014). Verifica-se, assim, que até o momento não há estudos clínicos publicados avaliando os níveis de contaminação por diferentes complexos microbianos na saliva e *in situ*, após o uso de bráquetes autoligados, por meio da técnica CDDH.

O conhecimento da microbiota que coloniza as partes que compõem os aparelhos ortodônticos é importante para a seleção de materiais mais adequados, com menores níveis de contaminação após sua utilização clínica, e para a implementação de medidas preventivas específicas, durante o tratamento ortodôntico. Assim, o objetivo do presente trabalho será avaliar os níveis salivares e *in situ*, de 22 espécies de micro-organismos dos complexos roxo, verde, laranja e vermelho e “outras espécies”, pré e pós-colagem de bráquetes convencionais e autoligados, por meio de sondas de DNA, nos estágios iniciais do tratamento ortodôntico.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado contando com a participação de 20 pacientes, sendo 11 do sexo feminino e 9 do sexo masculino, com média de 13,3 anos ($SD \pm 1.005$), com dentição permanente completa, da Clínica de Especialização de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo - Brasil. O projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo número 0062.0.138.000-10), sendo obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis pelos pacientes participantes da pesquisa.

Este número de pacientes foi determinado levando-se em consideração o cálculo amostral realizado pelo programa SPSS SamplePower (IBM software- Statistical Package for the Social Sciences, In. Chigago Illinois, USA), indicando que em uma amostra de 20 pacientes por grupo haveria 80% de probabilidade de ser evidenciado um efeito estatisticamente significativo. O cálculo foi baseado em cinco fatores: diferença das médias, dispersão dos escores, perda amostral, valor de alfa em 0,05 e considerando-se que os dados seriam avaliados segundo uma análise bicaudal.

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão: não terem realizado tratamento ortodôntico prévio; não terem feito uso de antibiótico nos 3 meses que antecederam o estudo; não estarem sob uso de medicação sistêmica; não terem sido submetidos a tratamento periodontal nos 3 meses anteriores ao início do estudo; não serem fumantes; não serem portadores de desordens sistêmicas que pudessem interferir na condição periodontal, previamente à instalação do aparelho; não apresentarem anomalias craniofaciais; e não apresentarem apinhamento, overjet e overbite severos, segundo critérios ICON (Daniels e Richmond 2000).

Além disso, todos os pacientes apresentavam, inicialmente, ausência de alterações periodontais significativas, confirmada pelos seguintes índices: Índice de Placa (Loe, 1965); Índice de Sangramento Gengival (Ainamo e Bay, 1975); e Índice Gengival (Loe, 1965) nos sítios mesiovestibular, vestibular e distovestibular, dos incisivos e caninos superiores. Os valores medianos (1º quartil e 3º quartil) obtidos na amostra selecionada foram, Índice de placa 1,0 (1,0-2,0); Índice de sangramento gengival 0,0 (0,0-1,0); Índice Gengival: no sítio mesiovestibular 1,0 (1,0-1,67); no sítio mesial 1,0 (1,0-1,0); e no sítio disto vestibular 1,0 (1,0-1,17).

Previamente à colagem dos bráquetes ortodônticos foi coletado 1 mL de saliva não estimulada, em tubos tipo Falcon, contendo pérolas de vidro. Um total de 30 µL de saliva foram depositados em tubos plásticos para microcentrifuga (*Eppendorf* AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 120 µL de solução tampão TE [10 mM Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Co., St.Luis, MO, EUA)] pH 7,6, homogeneizada em vortex por 30 segundos a 2000 rpm. A seguir, foram acrescentados 100 µL de NaOH (Labsynth) e os tubos foram estocados a -20°C, até o momento da análise molecular, para a determinação dos níveis iniciais dos micro-organismos na saliva (baseline-S0) (Tabela 1 e 2).

Em seguida, os 20 pacientes selecionados receberam, nos incisivos e caninos superiores, bráquetes metálicos convencionais (Gemini™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) e dois tipos de bráquetes metálicos autoligados (In-Ovation®R, Dentsply, GAC e SmartClip™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), que foram colados de forma aleatória em sistema de rodízio em incisivos e caninos superiores. Todos os bráquetes foram colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante (Figura 1). Durante a colagem, tomou-se o cuidado para que o agente de união (XT primer) não entrasse em contato com o tecido gengival. Após a colagem foi inserido um fio ortodôntico 0.14" (Dentsply, GAC), de maneira passiva para não promover movimentação

Após a colagem dos bráquetes ortodônticos, todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal, fornecidas por um único operador e, para minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados obtidos, os mesmos receberam escovas dentais (Professional®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP, BR) e dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP, BR) padronizados, para higiene bucal diária.

Decorridos 30 (T1) e 60 (T2) dias após a colagem dos bráquetes, foi realizada nova colheita de 1 mL de saliva não estimulada (amostras S1 e S2) e remoção de um bráquete

de cada tipo (convencional e autoligados In-Ovation®R e SmartClip™), para avaliação microbiológica *in situ*.

Os bráquetes removidos foram colocados individualmente em tubos plásticos para microcentrífuga (*Eppendorf* AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 150 µL de solução tampão TE [10 mM Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Co., St. Luis, MO, EUA)], pH 7,6. Os tubos foram codificados e agitados vigorosamente em aparelho Mixtron, em velocidade máxima, para dessorção do material, sendo os bráquetes retirados do tubo com uma pinça clínica esterilizada. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de NaOH (Labsynth) a 0,5M e os tubos foram estocados a -20°C, até o momento da análise microbiológica.

As amostras de saliva e as amostras obtidas dos bráquetes *in situ* foram analisadas pelo método *checkerboard DNA-DNA hybridization*, no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, seguindo o protocolo descrito por Nascimento et al. (2009; 2010). As amostras foram fervidas por 5 minutos para desnaturação do DNA. Posteriormente, foram acrescentados 800µl de acetato de amônia (5M). O conteúdo de cada tubo das amostras foi depositado individualmente na membrana de nylon (HybondN⁺, Amershan Biosciences, Buckinghamshire, UK) o qual foi levada ao forno de hibridização por 2 horas a uma temperatura de 80°C, para fixação. Como controle, foram utilizadas quantidades de DNA correspondentes a 10⁵ e 10⁶ células dos micro-organismos em estudo (Tabela 1), as quais foram também desnaturadas, precipitadas e aplicadas sobre as membranas.

Posteriormente, as membranas foram pré-hibridizadas a 60°C por 2 horas em solução de hibridização (*buffer hybridization*; NaCl 0,5 M; *blocking reagent* 0,4% (w/v), seguida da aplicação de sondas marcadas com o genoma das espécies em estudo. A hibridação foi realizada por 16 horas (*overnight*) a 60°C, com solução de hibridização, sob suave agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas duas vezes, a 65°C por 30 minutos, em solução primária de lavagem (*urea* 2M; *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 0,1%; NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,0; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1mM; *blocking reagent* 0,2) e duas vezes com solução secundária de lavagem (Tris base 1M; NaCl 2M, MgCl₂ 1M), a temperatura ambiente, por 15 minutos. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com reagente de detecção CDP-Star (GE Healthcare). Sinais positivos de hibridização foram detectados pela exposição da membrana em ECL Hyperfilm-MP (GE Healthcare). As imagens obtidas no filme foram digitalizadas e analisadas pelo programa TotalLab™ Quant v13 software (TotalLab Ltd, Newcastle, UK).

Pela comparação da intensidade dos sinais de quimioluminescência das amostras dos bráquetes com os grupos controles obtidos pelo *checkerboard DNA-DNA hybridization*, obteve-se a quantidade de micro-organismos em cada bráquete, em µg.

A comparação da quantidade de cada espécie avaliada na saliva e *in situ*, nos diferentes tempos, foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Friedman e pós-teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas no SPSS Statistics 17.0 software (IBM Software-Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, Illinois, USA). O nível de significância adotado foi 5%.

RESULTADOS

Na saliva detectou-se inicialmente a presença de 11 espécies, pertencentes aos complexos roxo, verde, laranja e vermelho. 30 dias após a colagem observou-se a presença de 20 espécies, esta diferença se deu principalmente pelo aumento de espécies pertencentes ao complexo verde. Sessenta dias após a colagem observou-se a presença de 16 espécies, sendo que esta diminuição se deu pela ausência de espécies do complexo laranja (Tabela 5).

Quando comparou-se a amostra de saliva inicial (S0) com a amostra de saliva 30 (S1) e 60 (S2) dias após a colagem dos bráquetes, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para *N. mucosa*, *E. corrodens*, *A.a.a*, *A.a.b*, *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. nigrescens*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. aeruginosa*, *M. salivarium*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* (Tabela 5), com maiores níveis no período de 30 dias. Assim, observou-se diferença significativa em 15 das 22 espécies avaliadas.

Tabela 5 - Níveis de micro-organismos (em µg) na saliva de pacientes, antes e após 30 e 60 dias da colagem dos bráquetes

Micro-organismos e número ATCC	S0 M (Q1-Q3)	S1 M (Q1-Q3)	S2 M (Q1-Q3)	p
Complexo roxo				
<i>Veillonella parvula</i> (10790)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-204518)	0,0 (0,0-0,0)	p>0,05
<i>Neisseria mucosa</i> (25996)	-	0,0 (0,0-208862)	0,0 (0,0-0,0)	0.016* S0≠S1
Complexo verde				
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> (33624)	-	-	0,0 (0,0-00)	p>0,05
<i>Eikenella corrodens</i> (23834)	-	0,0 (0,0-0,0)	-	0.0183*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a</i> (29523)	-	0,0 (0,0-344154)	0,0 (0,0-0,0)	0.0119* S1≠S2
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans b</i> (29522)	-	252387,0 (0,0-286204)	0,0 (0,0-0,0)	0.0003* S0≠S1
Complexo laranja				
<i>Campylobacter rectus</i> (33238)	-	-	0,0 (0,0-0,0)	p>0,05 S0≠S2
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (25586)	299961 (0,0-328255)	0,0 (0,0-259499)	0,0 (0,0-0,0)	0.005*
<i>Fusobacterium periodonticum</i> (33693)	421291 (0,0-659694)	0,0 (0,0-312106)	-	<0.0001* S0≠S2
<i>Prevotella intermedia</i> (25611)	-	0,0 (0,0-0,0)	-	p>0,05
<i>Prevotella melaninogenica</i> (25845)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	-	p>0,05
<i>Prevotella nigrescens</i> (25261)	-	0,0 (0,0-208284)	0,0 (0,0-167564)	0.0170*
<i>Parvimonas micra</i> (33270)	136247 (0,0-285784)	0,0 (0,0-147898)	0,0 (0,0-0,0)	0,0083*
Complexo vermelho				
<i>Treponema denticola</i> (35405)	0,0 (0,0-270703)	262418 (52805,2-276434)	0,0 (0,0-208784)	0.0373*
<i>Tanerella forsythia</i> (43037)	0,0 (0,0-270956)	317795 (275408-364127)	254240 (0,0-321528)	0.0047* S0≠S1
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (33277)	-	182616 (0,0-264408)	0,0 (0,0-239271)	0.0040* S0≠S1
Outras espécies				
<i>Escherichia coli</i> (10798)	-	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	p>0,05
<i>Enterococcus faecalis</i> (51299)	294696 (0,0-313246)	0,0 (0,0-0,0)	-	0.0002* S0≠S2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (700603)	-	166110 (0,0-356123)	0,0 (0,0-178835)	0.0038* S0≠S1
<i>Mycoplasma salivarium</i> (23064)	0,0 (0,0-0,0)	192364 (0,0-282182)	0,0 (0,0-0,0)	0.0021*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	0,0 (0,0-269684)	0,0 (0,0-0,0)	-	0.0302*
<i>Porphyromonas endodontalis</i> (35406)	137766 (0,0-322981)	290444 (0,0-402417)	276404 (0,0-346494)	p>0,05

S0: amostra de saliva obtida antes da colagem dos bráquetes; S1: amostra de saliva obtida 30 dias após a colagem; S2: amostra de saliva obtida 60 dias após a colagem; M - mediana; Q1 - primeiro quartil; Q3 - terceiro quartil. *: diferença significativa; #: diferença significativa no pós-teste. ATCC: American Type Culture Collection; - : ausência.

A porcentagem de incidência das espécies bacterianas dos complexos roxo, verde, laranja, vermelho *in situ*, nos diferentes bráquetes, levando em consideração apenas o tempo (30 e 60 dias após a colagem dos bráquetes) podem ser observados na figura 7.

A comparação entre os tempos (30 e 60 dias após a colagem dos bráquetes), das espécies bacterianas dos complexos roxo, verde, laranja, vermelho *in situ*, nos diferentes bráquetes podem ser analisados na figura 8.

A porcentagem e a comparação de incidência das espécies bacterianas das “outras espécies” podem ser observadas na figura 9.

Figura 7 - Porcentagem de incidência de espécies bacterianas pertencentes aos diferentes complexos, avaliado pela técnica *checkerboard DNA DNA hybridization*.

Figura 8 - Mediana dos níveis de espécies bacterianas (expressos em $\mu\text{g} \times 10^5$) pertencentes aos diferentes complexos, avaliado pela técnica *checkerboard DNA DNA hybridization*. * diferença significativa, quando comparados os tempos T1 e T2 de cada bráquete separadamente.

Figura 9 - Mediana dos níveis de espécies bacterianas (expressos em $\mu\text{g} \times 10^5$), avaliado pela técnica *checkerboard DNA DNA hybridization*. * diferença significativa, quando comparados os tempos T1 e T2 de cada bráquete separadamente.

Figura 10 - Porcentagem de incidência de espécies bacterianas (outras espécies) avaliada pela técnica *checkerboard DNA DNA hybridization*

A comparação dos níveis bacterianos entre os três desenhos de bráquetes mostrou diferença significativa somente para uma espécie, pertencente ao complexo laranja, trinta dias após a instalação do aparelho: (*C. rectus* $p=0,043$). A comparação dos tipos de bráquetes 2 a 2, nesse período, evidenciou diferença entre o bráquete autoligado Smartclip™ e o autoligado In-Ovation®R ($p=0,0004$) e entre o autoligado In-Ovation®R e o convencional Gemini™

($p=0,012$), sendo que o bráquete autoligado In-Ovation®R apresentou os maiores níveis bacterianos, *in situ*, e o convencional Gemini™ os menores níveis (Figura 11).

Figura 11 - Níveis de *C. rectus* nos diferentes desenhos de bráquetes convencional: Gemini™ e autoligados: SmartClip™, In-Ovation®R, 30 dias (T1) após a colagem.

Os níveis bacterianos nos diferentes complexos se comportaram de maneira distinta, quando comparou-se o comportamento de cada desenho de bráquete individualmente nos períodos de 30 e 60 dias. Diferenças significativas foram identificadas apenas no complexo roxo ($p=0,027$), onde observou-se diminuição nos níveis de bactérias deste complexo, para o bráquete convencional Gemini™ quando comparados os níveis entre os tempos T0 e T1 (Figura 12).

Figura 12 - Complexos bacterianos em cada desenho de bráquete (autoligados: SmartClip™, In-Ovation®R, e convencional: Gemini™), individualmente nos períodos de 30 (T1) e 60 (T2) dias após a colagem, * diferença significativa.

Quando comparados os níveis bacterianos nos diferentes complexos entre os três diferentes desenhos de bráquetes (convencional e os dois autoligados), 30 e 60 após a colagem do aparelho, observou-se diferença significativa ($p=0,0041$) nos níveis bacterianos, somente para o complexo vermelho, 60 dias após a colagem, entre os bráquetes autoligado SmartClip™ e convencional Gemini™ (Figura 13).

Figura 13 - Complexos bacterianos nos diferentes bráquetes 30 (T1) e 60 (T2) dias após a colagem. Autoligados SmartClip™, In-Ovation®R, e convencional: Gemini™, * diferença significativa.

DISCUSSÃO

A inflamação gengival observada frequentemente após a colagem dos bráquetes ortodônticos, pode ser atribuída à proximidade destes com o sulco gengival, predispondo ao acúmulo de biofilme, *in situ* e nos tecidos dentários próximo à gengiva livre. (Lang et al., 2009; Nelson-Filho et al., 2011;). Este acúmulo de biofilme pode levar a alterações nos tecidos periodontais, causadas por uma microbiota mista, composta principalmente por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (Borrell e Papapanou, 2005; Kebschull e Pn, 2011) e por bactérias oportunistas como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. salivarium* e *E. faecalis*, que tem grande poder de invasão e são frequentemente associadas a fatores de risco em pacientes com problemas cardiológicos e imunosuprimidos, dentre outras (Gonçalves et al., 2007; Bresolin et al., 2014; Suzuki et al., 2014).

Resultados recentes, de estudos clínicos com bráquetes metálicos convencionais e biologia molecular apontam para a multicolinização que ocorre após a instalação dos aparelhos ortodônticos, revelando a complexidade da interação das espécies na colonização da superfície dentária e do bráquete, *in situ* (Iwano et al., 2010; Jurela et al., 2013; Barker et al., 2013).

Anhoury et al. (2002) não observaram diferenças na quantidade de micro-organismos cariogênicos, comparando bráquetes metálicos e cerâmicos, em um estudo clínico, pela técnica CDDH. No entanto, os bráquetes metálicos estavam mais intensamente contaminados que os bráquetes cerâmicos, por patógenos periodontais como *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum ss vincentii*, *S. anginosus* e *E. nodatum*. Por outro lado, os bráquetes cerâmicos mostraram maiores níveis de *E. corrodens*, *C. showae* e *S. noxia*. Nenhum padrão óbvio de colonização favorecendo um ou outro tipo de bráquete foi encontrado.

Em 2012, Andrucioli et al. relataram que os micro-organismos do complexo laranja foram os mais prevalentes no biofilme que recobre bráquetes metálicos, representando 40% da contagem microbiana total, reforçando o envolvimento desses micro-organismos na inflamação gengival, considerando a proximidade dos bráquetes com o tecido gengival.

No presente trabalho pôde-se verificar grande variabilidade na porcentagem de ocorrência das diversas espécies no período do estudo, concordando com Anhoury et al. (2002) e Andrucioli et al. (2012). Trinta dias após a colagem, no bráquete convencional Gemini™ verificou-se uma maior porcentagem de bactérias do complexo roxo seguido pelo

complexo vermelho. Padrão semelhante foi observado no bráquete autoligado SmartClip™, corroborando com os resultados dos estudos que apontam as alterações da microbiota após instalação dos aparelhos ortodônticos em função da quebra do equilíbrio do meio (Marsh, 2006; Demling et al., 2009; Barker et al. 2013). Já o bráquete autoligado In-Ovation®R apresentou níveis mais elevados no complexo vermelho e níveis semelhantes para os demais complexos.

Sessenta dias após a colagem, nos bráquetes metálicos convencionais Gemini™, verificou-se uma diminuição nos níveis das espécies do complexo roxo, relacionado com estágios iniciais de colonização (Haffajee et al., 2008), e o complexo verde se manteve estável, compatível com o estado de saúde periodontal. Os níveis das espécies do complexo laranja aumentaram, e os níveis das espécies do complexo vermelho diminuíram, porém sem ocorrência de alterações nos parâmetros clínicos, concordando com o descrito pela literatura, (Anhoury et al., 2002, Nelson-Filho et al., 2011; e Andrucioi et al., 2012)

Com relação aos bráquetes autoligados SmartClip™ e In-Ovation®R, verificou-se as altas porcentagens de bactérias dos complexos vermelho e laranja, 60 dias após a colagem, que são micro-organismos intimamente relacionados com a evolução da doença periodontal. A ausência de trabalhos publicados com bráquetes autoligados, avaliando a dinâmica das alterações bacterianas impossibilita a comparação direta com os resultados do presente estudo. No entanto, tornou-se, importante ressaltar a necessidade de estabelecer medidas de prevenção e higiene nos pacientes sob tratamento ortodôntico, especialmente com o uso de bráquetes autoligados, tendo em vista os elevados níveis de espécies periodopatogênicas observados.

Especificamente em bráquetes autoligados, poucos estudos avaliaram a microbiota periodontopatogênica. No presente estudo, após a colagem dos bráquetes, verificou-se na saliva aumento significativo, em T1, para *N. mucosa* (complexo roxo), *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans.a* e *A. actinomycetemcomitans.b* (complexo verde), *F. nucleatum*, *F. periodonctum* e *P. nigrescence* (complexo laranja). *T. dentícola*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* (complexo vermelho) indicando risco de desenvolvimento de alterações periodontais nos estágios iniciais do tratamento ortodôntico, corroborando com o trabalho de Naranjo et al. (2006) que avaliaram por meio de cultura bacteriana, 3 meses após a instalação do aparelho ortodôntico, os níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, e *Fusobacterium* que aumentaram significativamente, concluindo que o tratamento ortodôntico altera a microbiota, com risco de desenvolver doença periodontal.

Os bráquetes autoligados SmartClip™, 60 dias após a colagem, mostraram diferença significativa nos níveis de *F. Periodonctum*, espécie pertencente ao complexo laranja, correlacionada diretamente com quadros de gengivite e periodontite, além de *P. endodontalis* e *K. pneumoniae*, que tem papel na adesão, nutrição e maturação do biofilme dental (Kolenbrander et al., 2006; Darveau, 2010). *E. faecalis*, que apresenta capacidade de sobreviver e se desenvolver em ambientes considerados impróprios para muitas espécies bacterianas, identificado em lesões periapicais recorrentes e apontado como agente etiológico de infecções crônicas e relacionada com reabsorção dentinária (Hubble et al., 2003), também sofreu aumento nos bráquetes autoligados SmartClip™.

No bráquete autoligado In-Ovation®R, observou-se diferença nos níveis de *E. coli*, que é uma bactéria invasiva, que libera LPS (da Silva-Boghossian et al., 2011; Gamboa et al., 2013; Shaddox et al., 2013) com grande afinidade por bráquetes metálicos (Knoernschild et al., 1999; Nelson-Filho et al., 2011b)

Já no bráquete convencional Gemini™, observou-se aumento nos níveis de *P. endodontalis* e diminuição dos níveis de *N. mucosa*, *T. forsythia* e *P. aeruginosa*. Kitada et al. (2009), comparando pacientes com e sem aparelho ortodôntico, com bráquetes convencionais, verificaram aumento de bactérias oportunistas como *P. aeruginosa*, associada com a evolução da doença periodontal, e com infecções crônicas recorrentes, discordando do presente estudo.

Estes dados sugerem que o desenho do bráquete pode favorecer a maturação do biofilme e o desenvolvimento da doença periodontal, pois o presente estudo mostrou diferentes padrões de colonização e alterações microbianas distintas nos diferentes desenhos de bráquetes avaliados, como já salientado por van Gastel et al. (2009). Esses autores, em um estudo *in vitro* analisaram, por meio de cultura bacteriana, 7 tipos diferentes de bráquetes (cerâmicos convencionais e metálicos-autoligados e convencionais) e relataram que o bráquete autoligado Speed apresentou menor retenção de biofilme que os cerâmicos e que um outro metálico autoligado (Damon) e maior retenção de biofilme que os metálicos convencionais, concordando com os resultados observados para a análise de *P. Intermedia* no presente estudo.

Pejda et al. (2013) estudaram a contaminação bacteriana de bráquetes, por meio de PCR em diferentes pacientes: um grupo utilizou bráquete autoligado e outro bráquete convencional/ligadura metálica. Verificaram maiores níveis para *A. actinomycetemcomitans* nos bráquetes convencionais e não verificaram diferença para *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. Forsythia*. Concluíram que o desenho do bráquete não influenciou os parâmetros periodontais e nem a adesão bacteriana, discordando dos achados da presente pesquisa, onde verificamos aumento significativo nos bráquetes autoligados SmartClip™ para espécie *F. Periodunctum*

(complexo laranja), e nos bráquetes autoligados In-Ovation®R, para a espécie *C. Rectus*, 30 dias após a colagem.

O aparelho ortodôntico promove alterações na cavidade bucal nos estágios iniciais do tratamento. O desenho do bráquete parece ter influência nos níveis bacterianos de espécies envolvidas na doença periodontal.

Considerando a ampla variedade de espécies de micro-organismos detectadas nos bráquetes metálicos autoligados, estudos adicionais são necessários para direcionar o estabelecimento de protocolos preventivos efetivos no controle da contaminação microbiana e prevenir o desenvolvimento de bacteremias e patologias como a cárie dental e a doença periodontal, durante o tratamento ortodôntico.

Capítulo 4

Níveis de citocinas no fluido crevicular e perfil microbiano in situ, após a colagem de bráquetes convencionais e autoligados

---

INTRODUÇÃO

Atualmente, diversos tipos de bráquetes ortodônticos estão disponíveis para o uso clínico, sendo atribuídas diversas vantagens a cada um deles, com relação à velocidade da movimentação ortodôntica, à redução no número de consultas para manutenção e à efetividade do tratamento (Čelar et al., 2013; Fleming e O'Brien, 2013; Harradine, 2013). No entanto, independentemente do tipo, qualquer acessório ortodôntico aplicado no elemento dental pode promover alterações significativas na homeostase dos tecidos periodontais, por meio do estímulo à liberação de mediadores químicos no sulco gengival e pelo acúmulo ou alteração qualitativa do biofilme (Thomson, 2002; Naranjo et al., 2006; Kim et al., 2010; van Gastel et al., 2011; Pejda et al., 2013).

Estudos mostraram que o tipo de bráquete pode determinar o tipo de colonização bacteriana sobre a sua superfície (Anhoury et al., 2002; Faltermeier et al., 2007; Steinberg e Eyal, 2004). Recentemente Andruccioli et al. (2012) observaram que, em bráquetes metálicos convencionais, após 30 dias da instalação dos aparelhos, ocorreu uma multicolonização por diversas espécies de bactérias, incluindo cariogênicas e periodontopatogênicas, corroborando com estudos prévios que demonstraram a ocorrência de aumento significativo no biofilme, após a instalação de aparelhos ortodônticos (Naranjo et al., 2006; Topaloglu-Ak et al., 2011).

Por outro lado, Torlakovic et al. (2013), em um outro estudo recente também utilizando bráquetes metálicos convencionais, relataram a ocorrência de pequenas alterações no biofilme supragengival e concluíram que o aparelho ortodôntico não necessariamente altera a microbiota para uma composição mais periodontopatogênica (Torlakovic et al., 2013). No entanto, estudos avaliando as alterações ocasionadas pelo uso de diferentes tipos de bráquetes, especialmente autoligados, são escassos (Pandis et al., 2008; Pellegrini et al., 2009; Pejda et al., 2013; Ireland et al., 2013).

Outro aspecto importante, que pode estar relacionado à colonização microbiana, é a alteração promovida no ambiente subgengival, após a instalação de aparelhos ortodônticos, com relação à liberação de marcadores inflamatórios. Em condições patológicas, como no caso das periodontites, há liberação de citocinas e quimiocinas (Garlet et al., 2008; Andrade et al., 2009; Ramseier et al., 2009; Belibasakis e Bostanci, 2012), pois os tecidos de sustentação reagem às bactérias, aos seus produtos e subprodutos, com uma resposta imunológica e inflamatória (Azuma, 2006; Armitage e Cullinan, 2010; Armitage e Robertson, 2012;), promovendo reabsorção dos tecidos mineralizados (Consolaro e Consolaro, 2009;

Viecilli et al., 2009; de Rossi et al., 2010). Além disso, estas proteínas também regulam a reabsorção óssea durante o movimento ortodôntico (Garlet et al., 2008; Andrade et al., 2009).

Nos estágios iniciais da doença verifica-se a presença de gengivite, caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular e migração de células (neutrófilos e macrófagos) do sangue periférico para o fluido crevicular. Posteriormente, linfócitos T e B migram para o sítio da lesão. Estas células, além dos leucócitos e macrófagos, produzem citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e prostaglandinas (Marcaccini et al., 2010; Ziegler et al., 2010). Assim, de maneira integrada, a instalação e também o tipo de bráquete, mesmo na ausência de movimento ortodôntico, poderiam promover alterações significativas nos tecidos gengivais e periodontais.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi determinar *in vivo* a concentração de citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular, antes e após a colagem de diferentes tipos de bráquetes (convencionais e autoligados) e os níveis de bactérias periodontopatogênicas dos complexos vermelho e laranja nos bráquetes *in situ*.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado sob o número 0062.0.138.000-10. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis pelos pacientes participantes da pesquisa.

O cálculo amostral foi realizado pelo programa SPSS SamplePower (IBM software-Statistical Package for the Social Sciences, In. Chigago Illinois, USA), indicando que em uma amostra de 20 pacientes por grupo haveria 80% de probabilidade de ser evidenciado um efeito estatisticamente significativo. O cálculo foi baseado em cinco fatores: diferença das médias, dispersão dos escores, perda amostral, valor de alfa em 0,05 e considerando-se que os dados seriam avaliados segundo uma análise bicaudal.

Em seguida, foram selecionados 20 pacientes de ambos os sexos, sendo 11 do sexo feminino (55%) e 9 do sexo masculino (45%), com idade variando entre 11 e 15 anos (média de 13,3 anos; SD $\pm$ 1,03), com dentição permanente completa, da Clínica de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão: não terem realizado tratamento ortodôntico prévio; não terem feito uso de antibiótico nos 3 meses que antecederam o estudo;

não estarem sob uso de medicação sistêmica; não terem sido submetidos a tratamento periodontal nos 3 meses anteriores ao início do estudo; não serem fumantes; não serem portadores de desordens sistêmicas que pudessem interferir na condição periodontal, previamente à instalação do aparelho; não apresentarem anomalias craniofaciais; e não apresentarem apinhamento, overjet e overbite severos, segundo critérios ICON (Daniels e Richmond, 2000).

Além disso, todos os pacientes apresentavam, inicialmente, ausência de alterações periodontais, confirmada pelos seguintes índices: Índice de Placa (Loe, 1965); Índice de Sangramento Gengival (Ainamo e Bay, 1975); e Índice Gengival (Loe, 1965) nos sítios mesiovestibular, vestibular e distovestibular dos incisivos e caninos superiores. Os valores iniciais (mediana, 1º quartil e 3º quartil) obtidos na amostra foram, Índice de placa 1,0 (1,0-2,0); Índice de sangramento gengival 0,0 (0,0-1,0); Índice Gengival no sítio mesiovestibular 1,0 (1,0-1,67); Índice Gengival no sítio mesial 1,0 (1,0-1,0); e Índice Gengival no sítio distovestibular 1,0 (1,0-1,17).

Previamente à colagem dos bráquetes foi realizada a profilaxia utilizando pasta à base de pedra-pomes e água e taça de borracha. O fluido crevicular foi coletado como preconizado por Iwasaki et al. (2001). O dente foi isolado com rolo de algodão e levemente seco com jato de ar. Uma tira de papel absorvente (PerioPaper®, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA) foi introduzida no sulco gengival, cuidadosamente, até o oferecimento de resistência, e mantida em posição por 30 segundos. Foram coletadas amostras de 3 regiões da face vestibular de cada dente (região mesial, central e distal) de maneira consecutiva.

O volume do fluido crevicular, em cada tira de papel, foi quantificado por meio do aparelho Periotron® 8000 (Oraflow Inc., Plainview, NY, USA), previamente calibrado. Para minimizar o efeito da evaporação, este volume foi mensurado em, no máximo, 5 segundos após a remoção. As pinças do eletrodo foram limpas e secas com algodão e o monitor zerado após cada mensuração. Os valores das leituras efetuadas no Peritron, para as amostras obtidas das 3 regiões da face vestibular de cada dente (região mesial, central e distal) foram somados. Em seguida, a curva de calibração foi construída por meio de regressão polinomial de quarta ordem (Chapple, 1999) e, por meio desta curva, os volumes desconhecidos das amostras foram obtidos por interpolação, convertendo-se os escores fornecidos pelo aparelho para volume (µL) do fluido crevicular. Desta forma, obteve-se o volume total inicial de fluido crevicular para cada dente (T0).

Em seguida, os 20 pacientes selecionados receberam, nos incisivos e caninos superiores, bráquetes metálicos convencionais (Gemini™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) e dois tipos de bráquetes metálicos autoligados (In-Ovation®R, Dentsply GAC Islandia, NY, USA;

e SmartClip™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), que foram colados de forma aleatória, em sistema de rodízio. Todos os bráquetes foram colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante, por 1 operador experiente. Após a colagem, foi inserido um fio ortodôntico 0,14" (Dentsply GAC Islandia, NY, USA), de maneira passiva para não promover movimentação. Nos bráquetes convencionais foram utilizadas ligaduras elastoméricas (Morelli®, Sorocaba, SP, Brasil).

Após a montagem dos aparelhos ortodônticos, todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal, fornecidas por um único operador e, para minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados obtidos, os mesmos receberam escovas dentais (Professional®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) padronizados, para higiene bucal diária.

Após 60 dias, coletou-se novamente amostras do fluido crevicular, da mesma forma descrita anteriormente, sendo obtido o volume total final de fluido crevicular para cada dente (T1). Em seguida, foi realizada a remoção dos bráquetes para a detecção dos níveis de bactérias dos complexos laranja e vermelho *in situ*.

Os bráquetes removidos foram colocados individualmente em tubos plásticos para microcentrifuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 150 µl de solução tampão TE [10 mM Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Co., St.Luis, MO, EUA)] pH 7,6. Os tubos foram codificados e agitados vigorosamente em aparelho Mixtron, em velocidade máxima, para dessorção do material, sendo os bráquetes retirados dos tubos com uma pinça clínica esterilizada. A esta foram acrescentados 100µl NaOH (Labsynth) a 0,5 M. e estocados a -20°C até o momento da análise microbiológica.

Para a realização das análises microbiológicas pelo método *checkerboard DNA-DNA hybridization*, no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, foi seguido o protocolo descrito por Nascimento et al. (2009; 2010). As amostras foram fervidas por 5 minutos para desnaturação do DNA. Posteriormente, foram acrescentados 800µl de acetato de amônia (5M). O conteúdo de cada tubo foi depositado individualmente na membrana de nylon (HybondN+, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) e esta foi levada ao forno de hibridização por 2 horas a uma temperatura de 80°C, para fixação. Como controle, foram utilizadas quantidades de DNA correspondentes a 10⁵ e 10⁶ células de cada espécie dos complexos laranja [*Campylobacter rectus* (33238), *Fusobacterium nucleatum* (25586), *Fusobacterium periodonticum* (33693),

Prevotella intermedia (25611), *Prevotella melaninogenica* (25845), *Prevotella nigrescens* (25261)] e vermelho [*Porphyromonas gingivalis* (33277), *Tannerella forsythia* (43037) e *Treponema denticola* (35405)], as quais foram também desnaturadas, precipitadas e aplicadas sobre as membranas.

Posteriormente, as membranas foram pré-hibridizadas a 60°C por 2 horas em solução de hibridização (*buffer hybridization*; NaCl 0,5 M; *blocking reagent* 0,4% (w/v), seguida da aplicação de sondas marcadas com o genoma das espécies dos complexos vermelho e laranja. A hibridação foi realizada por 16 horas (*overnight*) a 60°C, com solução de hibridização, sob suave agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas duas vezes, a 65°C por 30 minutos, em solução primária de lavagem (*urea* 2M; *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 0,1%; NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,0; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1mM; *blocking reagent* 0,2) e duas vezes com solução secundária de lavagem (Tris base 1M; NaCl 2M, MgCl₂ 1M), à temperatura ambiente, por 15 minutos. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com reagente de detecção CDP-Star (GE Healthcare). Sinais positivos de hibridização foram detectados pela exposição da membrana em ECL Hyperfilm-MP (GE Healthcare). As imagens obtidas no filme foram digitalizadas e analisadas pelo programa TotalLab™ Quant v13 software (TotalLab Ltd, Newcastle, UK).

Pela comparação da intensidade dos sinais de quimioluminescência das amostras dos bráquetes com os grupos controles obtidos pelo *checkerboard DNA-DNA hybridization*, obteve-se a quantidade de micro-organismos em cada bráquete em ug.

As concentrações de citocinas pró-inflamatórias foram determinadas nas amostras obtidas do fluido crevicular, antes e 60 dias após a colagem dos diferentes tipos de bráquetes ortodônticos, por meio da técnica *Luminex*®, utilizando um kit (HCYTOMAG-60K-05; Millipore, Billerica, MA, EUA), de alta sensibilidade, para as seguintes citocinas humanas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12, e pelo instrumento MAGpix™ (MiraiBio, Alameda, CA, USA). As amostras foram individualmente avaliadas e as concentrações foram obtidas por meio de uma curva padrão determinada por uma equação polinomial de quinta ordem, obtida por meio de um programa específico (Xponent® Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Todos os resultados foram expressos em pg/mL.

Análise estatística

Durante a análise estatística, para comparar as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, antes e 60 dias após a colagem dos diferentes tipos de bráquetes, aplicou-se o modelo de análise de variância misto, seguida pelo teste de Tukey, no programa estatístico SAS® (SAS Campus Drive, North Carolina, USA). Esse modelo foi aplicado, a fim de levar em consideração a interdependência dos dados no mesmo indivíduo, considerados como fator aleatório (conglomerados). Devido à presença de alguns valores extremos, os dados foram convertidos em logaritmo, previamente à análise. Após a conversão, o impacto dos valores extremos na análise estatística foi levado em consideração, sendo observado que os mesmos não exerceram influência relevante nos resultados. A análise de resíduos foi efetuada para adequação aos pressupostos de todas as análises.

Os níveis de bactérias dos complexos laranja e vermelho *in situ*, nos diferentes tipos de bráquetes, foram comparados por meio dos testes não-paramétricos de Friedman e pós-teste de Dunn, empregando-se o SPSS Statistics 17.0 software (IBM Software-Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, Illinois, USA).

O nível de significância adotado para todas as análises foi 5%.

RESULTADOS

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos com relação à concentração das citocinas avaliadas, no fluido crevicular (pg/mL), nos períodos pré (T0) e pós-colagem (T1) dos bráquetes convencionais e autoligados.

Tabela 6 - Concentração das citocinas IL-12, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α (pg/mL) no fluido crevicular (média $\pm$ erro padrão), expressos em log, antes (T0) e 60 dias após (T1) a colagem de bráquetes convencionais (Gemini™) e autoligados (SmartClip™ e In-Ovation®R), *in vivo*

Citocina	Bráquete	Concentração em pg/mL (T0)	Concentração em pg/mL (T1)	Valor de p para a comparação entre T0 e T1	Valor de p para a comparação entre os diferentes tipos de bráquete
IL-12	SmartClip™	3,05 $\pm$ 0,27	2,82 $\pm$ 0,37	0,47	0,75
	Gemini™	3,03 $\pm$ 0,27	3,17 $\pm$ 0,37		
	In-Ovation®R	2,73 $\pm$ 0,27	3,22 $\pm$ 0,37		
IL-1 α	SmartClip™	5,68 $\pm$ 0,25	6,20 $\pm$ 0,22	0,065	0,56
	Gemini™	5,84 $\pm$ 0,25	6,31 $\pm$ 0,22		
	In-Ovation®R	5,82 $\pm$ 0,25	5,85 $\pm$ 0,22		
IL-1 β	SmartClip™	0,91 $\pm$ 0,27	0,65 $\pm$ 0,23	0,07	0,47
	Gemini™	1,11 $\pm$ 0,27	0,73 $\pm$ 0,23		
	In-Ovation®R	0,83 $\pm$ 0,27	0,48 $\pm$ 0,23		
IL-6	SmartClip™	1,67 $\pm$ 0,26	1,85 $\pm$ 0,27	0,54	0,06
	Gemini™	1,04 $\pm$ 0,26	1,38 $\pm$ 0,27		
	In-Ovation®R	1,68 $\pm$ 0,26	1,49 $\pm$ 0,27		
TNF- α	SmartClip™	0,81 $\pm$ 0,20	1,13 $\pm$ 0,21	0,02*	0,98
	Gemini™	0,70 $\pm$ 0,20	1,22 $\pm$ 0,21		
	In-Ovation®R	0,90 $\pm$ 0,20	0,99 $\pm$ 0,21		

*: diferença significativa, empregando-se o modelo de análise de variância misto, levando-se em consideração o indivíduo como conglomerado.

Em geral, 60 dias após a colagem dos bráquetes houve uma tendência de elevação das concentrações de IL-12, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α . No entanto, comparando-se as concentrações de citocinas, pré (T0) e pós (T1) colagem, verificou-se diferença significativa apenas para TNF- α (Figura 1), sem diferença entre os tipos de bráquetes (convencionais e autoligados).

Figura 14 - Concentração de TNF- α no fluido crevicular, antes (T0) e 60 (T1) dias após a colagem dos bráquetes convencionais (Gemini™) e autoligados (In-Ovation®R e SmartClip™). O asterisco representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Com relação aos níveis de bactérias periodontopatogênicas nos bráquetes *in situ*, observou-se a presença dos complexos vermelho e laranja em todos (100%) os bráquetes utilizados (convencionais e autoligados). Não foi evidenciada diferença significativa entre os 3 tipos de bráquetes (Gemini™, In-Ovation®R e SmartClip™) com relação ao complexo laranja ($p > 0,05$). No entanto, diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada para o complexo vermelho, entre os bráquetes Gemini™ e SmartClip™, sendo os maiores níveis detectados nos bráquetes SmartClip™, 60 dias após a colagem (Figura 15).

Figura 15 - Níveis de bactérias dos complexos laranja e vermelho *in situ*, nos bráquetes convencionais (Gemini™) e autoligados (In-Ovation®R e SmartClip™), 60 dias após a colagem, * diferença significativa.

DISCUSSÃO

A gengivite e a periodontite são doenças multifatoriais que, frente ao acúmulo de biofilme, respondem com aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular e migração de células (neutrófilos e macrófagos) do sangue periférico para o fluido crevicular. Posteriormente, linfócitos T e B migram para o sítio da lesão. Estas células, além de leucócitos e macrófagos, produzem citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandinas (Marcaccini et al., 2010; Ziegler et al., 2010). As células do ligamento periodontal também respondem aos produtos bacterianos secretando citocinas e promovendo a remodelação do tecido ósseo (Taba, et al. 2005; Kim et al., 2013). Em doenças inflamatórias crônicas como a periodontite, osteoporose e artrite observa-se a ocorrência de reabsorção óssea, que está intimamente ligada ao desequilíbrio do sistema imune frente à inflamação (Zwerina et al., 2004).

O fluido crevicular é um importante marcador da ecologia do sulco e da bolsa periodontal, contendo citocinas secretadas, produtos e subprodutos bacterianos (Goodson, 2003; Griffiths, 2003; Lamster e Ahlo, 2007). Como o volume e a composição do fluido crevicular sofrem alterações frente à inflamação nos tecidos gengivais (Socransky e Haffajee, 2005), sua análise é um método adequado para estudo de alterações patológicas em humanos, pois pode ser obtido de forma não invasiva e permite repetir a coleta no mesmo sítio. Citocinas presentes no fluido crevicular durante o tratamento ortodôntico fornecem informações sobre o metabolismo celular, a saúde periodontal e a remodelação óssea, uma vez que podem, também, modular a diferenciação e a proliferação de osteoclastos (Griffiths, 2003; Uitto, 2003; Yamaguchi, 2009; Zainal Ariffin et al., 2011).

Segundo van Gastel et al. (2011), para a análise da concentração de citocinas e a influência da variabilidade bacteriana na secreção destas proteínas no fluido crevicular é importante levar em consideração fatores como sexo e idade. No presente estudo, estes 2 parâmetros, além da interdependência dos dados no mesmo indivíduo, considerados como fator aleatório (conglomerados), foram levados em consideração durante a análise estatística, empregando o modelo de análise de variância misto. Devemos ressaltar que a amostra foi constituída de pacientes jovens, inicialmente sem sinais clínicos de gengivite.

Com relação às citocinas IL-6, IL-1 α e IL1- β , sabe-se que induzem a diferenciação e proliferação de osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. Durante a movimentação ortodôntica, altos níveis de IL-6, IL-1 α e IL1- β são identificados no lado de compressão (Salla et al., 2012; Kitaura et al., 2014). No entanto, no presente trabalho o fluido crevicular foi coletado antes e 60 dias após a colagem e, durante todo o período experimental, o fio

ortodôntico foi mantido de maneira passiva em todos os bráquetes (convencionais e autoligados), o que possivelmente explica a ausência de interferência nas concentrações de IL-6, IL-1 α e IL-1 β , nos períodos pré e pós colagem. van Gastel et al. (2011) não verificaram aumento significativo de IL-6, quando compararam dentes com bráquetes convencionais Generus (GAC) e dentes bandados.

A IL-1 (α e β) são potentes estimuladores da reabsorção óssea (Bletsa et al., 2006; Bletsa et al., 2011; Apuzzo et al., 2013). No presente trabalho, as concentrações de IL-1 α e IL-1 β não aumentaram significativamente 60 dias após a colagem dos bráquetes. Entretanto, estas citocinas estavam presentes antes da colagem dos bráquetes, corroborando com Kamma et al. (2009), que verificaram altos níveis de IL-1 β em adolescentes, quando comparados com adultos jovens.

Vários trabalhos demonstraram que a concentração de IL-1 β aumenta durante os estágios iniciais do movimento ortodôntico, principalmente no lado de compressão (Lee et al., 2004; Meikle, 2006; Ren et al., 2007; Ren e Vissink, 2008; Magloire et al., 2009). Quando o movimento se estabiliza, sua concentração diminui, retornado às concentrações iniciais. Quando os tecidos se encontram alterados, como por exemplo nos casos gengivite ou periodontite, a concentração de IL-1 β se mantém elevada, sendo esta citocina associada à perda óssea em sítios com presença de patologia (Cochran 2008; Huynh-Ba et al., 2007; Ren e Vissink, 2008; Taba et al., 2008;). No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as concentrações de IL-1 α e β no fluido crevicular não são influenciadas pelo desenho do bráquete.

Inversamente, a IL-12 inibe a formação de osteoclastos, pois induz a diferenciação de células T-helper1, que por sua vez aumentam a secreção de INF- γ (Fox et al., 2000; Kitaura et al., 2014). Estudos apontam que a osteoclastogênese induzida pelo sistema RANK/RANKL/OPG diminui na presença de IL-12 (Nagata et al., 2003). No presente trabalho, não foi observada diferença significativa nos níveis dessa citocina, pré e pós colagem, nos 3 desenhos de bráquetes avaliados. No entanto, ocorreu um aumento numérico desta citocina nos bráquetes convencionais Gemini™ e nos autoligados In-Ovation®R, e diminuição nos bráquetes autoligados SmartClip™. A ausência de trabalhos publicados avaliando a influência do desenho dos bráquetes (convencionais e autoligados), sem a aplicação de força ortodôntica, na produção de IL-12, impossibilita a comparação com os resultados do presente trabalho.

O TNF- α é uma citocina secretada por linfócitos, fibroblastos, leucócitos e células epiteliais do tecido gengival, que apresenta um papel chave no processo inflamatório como indutor da reabsorção óssea, por meio da sobre-expressão do receptor de fator nuclear κ B

(RANKL) (Wei et al. 2005; Ren et al. 2007). Sua secreção é aumentada pelo estímulo da endotoxina bacteriana, constituinte da parede celular de micro-organismos Gram-negativos do complexo vermelho (Holt e Ebersole, 2005; Kajiya et al., 2010) que, aderidas à superfície dos bráquetes *in situ*, poderia induzir inflamação (Nelson-Filho et al., 2011b). No presente trabalho, observou-se aumento da concentração de TNF- α 60 dias após a colagem que, embora sem diferença significativa quando comparado aos bráquetes Gemini™ e In-Ovation®R, pode ter sido influenciada pelos altos níveis de bactérias do complexo vermelho, no bráquete SmartClip™.

Deve-se ressaltar que os níveis de micro-organismos do complexo vermelho, *in situ*, foram significativamente maiores nos bráquetes autoligados SmartClip™, quando comparados com os bráquetes convencionais Gemini™, no período de 60 dias. Estudos na área da Periodontia evidenciam que bactérias do complexo roxo, amarelo e verde têm correlação negativa com citocinas relacionadas à reabsorção óssea, enquanto as bactérias do complexo laranja e vermelho apresentam correlação positiva com estes marcadores (Lang et al., 2009; Armitage e Cullinan, 2010; Teles et al., 2010). No presente estudo, no período de 60 dias, observamos maiores níveis de micro-organismos do complexo vermelho, simultaneamente com aumento significativo de TNF- α , apenas para os bráquetes autoligados SmartClip™.

O desenho do bráquete não modulou a concentração de citocinas no fluido crevicular, entretanto influenciou os níveis de bactérias do complexo vermelho *in situ*. De acordo com os parâmetros avaliados, o bráquete SmartClip™ apresentou pior desempenho, tendo em vista que apresentou os maiores níveis de bactérias periodontopatogênicas do complexo vermelho simultaneamente a níveis mais elevados de TNF- α .

Estudos clínicos adicionais são necessários, a fim de avaliar o desempenho dos bráquetes autoligados, com relação à liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, em presença de movimentação ortodôntica ativa.

Conclusão

CONCLUSÃO

Considerando as condições específicas deste estudo e os resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- O desenho do bráquete modulou o índice de placa, o volume do fluido crevicular, e os níveis bacterianos *in situ* do complexo vermelho, sendo o bráquete autoligado SmartClip™ o que apresentou o pior desempenho, nesse aspecto.
- Os níveis bacterianos *in situ* de espécies relacionada à cárie dental e as espécies do complexo laranja, envolvidas na doença periodontal foram maiores no bráquete autoligado In-Ovation®R, que apresentou os piores resultados, nesse aspecto.
- Os níveis bacterianos na saliva, de espécies relacionadas à cárie dental, foram menores que os detectados nos bráquetes, *in situ*, sendo os maiores valores observados nos bráquetes autoligados In-Ovation®R.
- A concentração de citocinas no fluido crevicular não foi modulada pelo desenho do bráquete, ocorrendo um aumento na concentração de TNF- α nos três tipos de bráquetes (convencional Gemini™ e os autoligados SmartClip™ e In-Ovation®R), 60 dias após a colagem.
- A análise global dos resultados obtidos nos diferentes parâmetros analisados no presente estudo permitiu evidenciar, em geral, melhores resultados clínicos com o bráquete metálico convencional Gemini™.

Referências

REFERÊNCIAS

- Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of Salivary Proteins in the Adherence of Oral Streptococci to Various Orthodontic Brackets. *J Dental Res*. 2002;81(6):411–415.
- Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007;131(6):736–41.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec;25(4):229-35.
- Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(22):14434–9.
- Airila-Månsson S, Söder B, Kari K, Meurman J.H. Influence of combinations of bacteria on the levels of prostaglandin E2, interleukin-1beta, and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid and on the severity of periodontal disease. *J Periodontol*. 2006;77(6):1025–31.
- Al Mulla AH, Kharsa SAI, Kjellberg H, Birkhed D. Caries risk profiles in orthodontic patients at follow-up using Cariogram. *Angle Orthod*. 2009;79(2):323–30.
- Andrade I, Taddei SR, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira L, Silva T, Teixeira MM. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Den Res*. 2009;88(11):1037–41.
- Andrucioli MCD, Nelson-Filho P, Matsumoto, MAN, Saraiva MCP, Feres M, de Figueiredo LC, Martins LP. Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;141(1)24–9.
- Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou L.L. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod*. 2002;72(4):338–43.
- Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-biavati A, Perillo L. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in mice and men: overview and clinical relevance. *ScientificWorldJournal*. 2013; 23;2013:105873.
- Armitage GC, Cullinan MP. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010;53(63):12–27.

Armitage GC, Robertson PB. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc.* 2009 Sep;140 Suppl 1:36S-43S.

Ashley FP, Usiskin L, Wilson RF, Wagaiyu E. The relationship between irregularity of the incisor teeth, plaque, and gingivitis: a study in a group of schoolchildren aged 11-14 years. *Eur J Orthod.* 1998;20(1):65-72.

Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res.* 2006;41(5):361-73.

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. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;144(2), 260-7.

Barker CS, Soro V, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Microbial contamination of "as received" and "clinic exposed" orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013 Mar;143(3):317-23.

Başaran G, Ozer T, Kaya FA, Kaplan A, Hamamci O. Interleukine-1beta and tumor necrosis factor-alpha levels in the human gingival sulcus during orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2006 Sep;76(5):830-6.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):1001-9.

Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):239-48.

Belibasakis GN, Guggenheim B. Induction of prostaglandin E(2) and interleukin-6 in gingival fibroblasts by oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Dec;63(3):381-6.

Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 2006 Oct;114(5):423-9.

Borrell LN, e Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology.* 2005;32Suppl6:132-58.

Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodont.* 2007;78(1):79–86.

Bresolin AC, Pronsatti MM, Pasqualotto LN, et al. Effectiveness of periodontal treatment on the improvement of inflammatory markers in children. *Archives of Oral Biology*, 2014;59(6):639–44.

Brêtas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MAN. Effect of 0.4% stannous fluoride gel on *Streptococci* mutans in relation to elastomeric rings and steel ligatures in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;127(4).

Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod.* 2007;77(2):331-6.

Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(3):763-9.

Čelar A, Schedlberger M, Dörfler P, Bertl M. Systematic review on self-ligating vs. conventional brackets: initial pain, number of visits, treatment time. *J Orofac Orthop.* 2013;74(1):40–51.

Chapple IL, Landini G, Griffiths GS, Patel NC, Ward RS. Calibration of the Periotron 8000 and 6000 by polynomial regression. *J Periodontal Res.* 1999 Feb;34(2):79-86.

Chen SSH, Greenlee GM, Kim JE, Smith CL, Huang GJ. Systematic review of self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;137(6):726.e1–726.e18; discussion 726–7.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79:1569–76.

Condò R, Casaglia A, Condò SG, Cerroni L. Plaque retention on elastomeric ligatures. An in vivo study. *Oral Implantol.* 2013;5(4):92-9.

Consolaro A, Consolaro FM. A reabsorção radicular ortodôntica é inflamatória , os fenômenos geneticamente gerenciados , mas não é hereditariamente transmitida sobre a identificação dos receptores P2X7 e CP-23.R *Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2009;14(4):25-32.

Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(1):6-11.

Daniels C, Richmond S. The development of the index of complexity, outcome and need (ICON). *J Orthodont*. 2000;27(2):149–62.

Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol*. 2000. 2001;26:33–53.

Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Reviews. Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):481–90.

de Rossi A. Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Reabsorção Radicular Fisiológica de Dentes Decíduos. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2010;10(3):505–511.

Dupont P, Hocquet D, Jeannot K, Chavanet P, Plésiat P. Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Apr;55(4):518-22. Epub 2005 Feb 18

de Soet JJ1, Holbrook WP, van Amerongen WE, Schipper E, Homburg CH, de Graaff J. Prevalence of *Streptococcus sobrinus* in relation to dental caries in children from Iceland and The Netherlands. *J Dent Child*. 1990 Sep-Oct;57(5):337-42.

de Oliveira KM, da Silva RA, de Rossi A, Fukada SY, Feres M, Nelson-Filho P, da Silva LA. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. *Int Endod J*. 2014.

Demling A, Heuer W, Elter C, Heidenblut T, Bach FW, Schwestka-Polly R, Stiesch-Scholz M. Analysis of supra- and subgingival long-term biofilm formation on orthodontic bands. *Eur J Orthod*. 2009;31(2):202-6.

do Nascimento C, Barbosa RES, Issa JPM, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque Junior RF Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to evaluate the internal contamination of dental implants and comparison of bacterial leakage with cast or pre-machined abutments. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(6):571–7.

do Nascimento C, de Albuquerque RF, Monesi N, Candido-Silva J.A. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):3039–40.

do Nascimento C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. *Arch Oral Biol*. 2013;58(7):853–61.

do Nascimento LEAG, Pithon MM, dos Santos RL, Freitas AOA, Alviano DS, Nojima LI, et al. Colonization of *Streptococcus mutans* on esthetic brackets: self-ligating vs conventional. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;143(4 Suppl):S72–7.

do Nascimento LE, Souza MM, Azevedo AR, Maia LC. Are self-ligating brackets related to less formation of *Streptococcus mutans* colonies? A systematic review. *Dental Press J Orthod*. 2014;19(1):60-8.

Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MBB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Júnior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(5):514–20.

Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(5):416–22.

Farronato G, Giannini L, Galbiati G, Cannalire P, Martinelli G, Tubertini I, Maspero C. Oral tissues and orthodontic treatment: common side effects. *Minerva Stomatol*. 2013 Nov-Dec;62(11-12):431-46.

Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes the virulence of plaque-biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014;82(5):1968-81.

Faltermeier A, Bürgers R, Rosentritt M. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to orthodontic adhesives with various filler-volume fractions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007;132(6):728.e7–728.

Fleming PS, Johal A. Self-ligating brackets in orthodontics. A systematic review. *Angle Orthod*. 2010;80(3):575–84.

Fleming PS, O'Brien K. Self-ligating brackets do not increase treatment efficiency. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;143(1):11–9.

Fox SW, Fuller K, Bayley KE, Lean JM, Chambers TJ. 2000 TGF-beta 1 and IFN-gamma direct macrophage activation by TNF-alpha to osteoclastic or cytotoxic phenotype. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):4957-6

Gamboa F, García DA, Acosta A, Mizrahi D, Paz A, Martínez D, Arévalo A, Aristizabal F, Abba M. Presence and antimicrobial profile of gram-negative facultative anaerobe rods in patients with chronic periodontitis and gingivitis. *Acta Odontol Latinoam*. 2013;26(1):24-30

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. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(4):e193-8.

García-López S, Villanueva R, Meikle MC. Alterations in the Synthesis of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and Their Downstream Targets RANKL and OPG by Mouse Calvarial Osteoblasts In vitro: Inhibition of Bone Resorption by Cyclic Mechanical Strain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:160.

Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha FDQ, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine*. 2008;42(3):330-5.

Gellen LS, Wall-Manning GM, Sissons CH. Checkerboard DNA-DNA hybridization technology using digoxigenin detection. *Methods Mol Biol*. 2007;353(6):39-67.

Ghasempour M1, Rajabnia R, Irannejad A, Hamzeh M, Ferdosi E, Bagheri M. Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus in saliva of preschool children with different levels of caries activity. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013;10(4):440-5.

Gioka C, Bourauel C, Hiskia A, Kletsas D, Eliades T, Eliades G. Light-cured or chemically cured orthodontic adhesive resins? A selection based on the degree of cure, monomer leaching, and cytotoxicity. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005;127(4):413-9.

Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, Kavadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(3):193-200.

- Gojkov-Vukelic M, Hadzic S, Dedic A, Konjhodzic R, Beslagic E. 2013 Application of a diode laser in the reduction of targeted periodontal pathogens. *Acta Inform Med.* 2013;21(4):237–40.
- Gomes SC, Varela CC, da Veiga SL, Rösing CK, Oppermann RV. Periodontal conditions in subjects following orthodontic therapy. A preliminary study. *Eur J Orthod.* 2007;29(5):477–81.
- Gonçalves LDS, Soares Ferreira SM, Souza CO, Souto R, Colombo AP. Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive Brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV-seronegative Brazilians with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology.* 2007;78(1):87–96.
- Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol 2000.* 2003;31:43–54.
- Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* 2003;31(11):32–42.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000.* 2005;38, 9–12.
- Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *J Oral Microbiol.* 2008;23(3):196–205.
- Haffajee AD, Teles RP, Patel MR, Song X, Yaskell T, Socransky SS. Factors affecting human supragingival biofilm composition. II. Tooth position. *Journal of Periodontal Research.* 2009;44(4):520–8.
- Hamdy AA, Ebrahim MA. (2011). The effect of interleukin-1 allele 2 genotype (IL-1a(-889) and IL-1b(+3954)) on the individual's susceptibility to peri-implantitis: case-control study. *J Oral Implantol.* 2011 Jun;37(3):325–34.
- Harradine N. Self-ligating brackets increase treatment efficiency. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;143(1):10–8, 11–9.
- Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005;38:72–122.

Huang H, Chang EJ, Ryu J, Lee ZH, Lee Y, Kim HH. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(1):99–105.

Huang L, Artun J. Is the postretention relapse of maxillary and mandibular incisor alignment related? *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;120(1), 9–19.

Hube B, Naglik Candida albicans proteinases: resolving the mystery of a gene family. *J. Microbiology*. 2001 Aug;147(Pt 8):1997-2005.

Hubble TS1, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of Enterococcus faecalis proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr;18(2):121-6.

Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Salvi GE. The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 1977 Aug;4(3):214-22.

Ingervall B, Jacobsson U, Nyman SJ. A clinical study of the relationship between crowding of teeth, plaque and gingival condition. *Clin Periodontol*. 1977 Aug;4(3):214-22.

Ireland AJ, Soro V, Sprague SV, Harradine NW, Day C, Al-Anezi S, Jenkinson HF, Sherriff M, Dymock D, Sandy JR. The effects of different orthodontic appliances upon microbial communities. *Orthod Craniofac Res*. 2014;17(2):115-23.

Isaka J1, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, Tachikawa T, Hasegawa K. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol*. 2001;72(3):314-23.

Iwano Y, Sugano N, Matsumoto K, Nishihara R, Iizuka T, Yoshinuma N, Ito K. Salivary microbial levels in relation to periodontal status and caries development. *J Periodontol*. 2010;45(2):165–9.

Iwasaki LR, Gibson CS, Crouch LD, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. Speed of tooth movement is related to stress and IL-1 gene polymorphisms. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006;130(6):698.

- Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt R, Petro TM. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol*. 2001;46(2):185–9.
- Jung WS, Kim H, Park SY, Cho EJ, Ahn SJ. Quantitative analysis of changes in salivary mutans streptococci after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014;145(5):603–9.
- Jurela A, Repic D, Pejda S, Juric H, Vidakovic R, Matic I, Bosnjak A. The effect of two different bracket types on the salivary levels of S mutans and S sobrinus in the early phase of orthodontic treatment. *Angle Orthod*. 2013;83(1):140–5.
- Kajiya M, Giro G, Taubman M, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol*. 2010;8:2.
- Kaklamanos EG, Athanasiou AE. Systematic review of self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139(2):145–6;author reply 146–7.
- Karacay S, Saygun I, Bengi AO, Serdar M. Tumor necrosis factor-alpha levels during two different canine distalization techniques. *Angle Orthod*. 2007;77(1):142–7.
- Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol*. 2000;27(7):453–65.
- Kebschull M, Pn P. Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:17–27.
- Khalaf K. Factors Affecting the Formation, Severity and Location of White Spot Lesions during Orthodontic Treatment with Fixed Appliances. *J Oral Maxillofac Res*. 2014 Apr 1;5(1):e4.
- Kikkert R, Laine ML, Aarden L, van Winkelhoff J. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Jun;22(3):145–51.
- Kim K, Heimisdottir K, Gebauer U, Persson GR. Clinical and microbiological findings at sites treated with orthodontic fixed appliances in adolescents. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010;137(2):223–8.

Kim S, Park W, Son W, Ahn H, Ro J. Enamel surface evaluation after removal of orthodontic composite remnants by intraoral sandblasting: A 3-dimensional surface profilometry study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007 Jul;132(1):71-6

Kim SJ, Park KH, Park YG, Lee SW, Kang YG. Compressive stress induced the up-regulation of M-CSF, RANKL, TNF- α expression and the down-regulation of OPG expression in PDL cells via the integrin-FAK pathway. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(6):707–16.

Kitada K, de Toledo A e Oho T. Increase in detectable opportunistic bacteria in the oral cavity of orthodontic patients. *International Journal of Dental Hygiene*. 2009;7(2):121–5.

Kitaura H1, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:181849.

Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Effect of cytokines on osteoclast formation and bone resorption during mechanical force loading of the periodontal membrane. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:617032.

Knoernschild KL, Rogers HM, Lefebvre C., Fortson WM, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999;115(6):634–9.

Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodont 2000*. 2006;42(5), 47–79.

Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm. *J Bacteriol*. 2005 Nov;187(21):7193-203.

Kuramitsu HK, Wang BY. Virulence properties of cariogenic bacteria. *BMC Oral Health*. 2006 Jun 15;6 Suppl 1:S11.

Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:216–29.

Lang NP, Schätzle M, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009;36:3–8.

Lawrence HP. Salivary Markers of Systemic Disease : Noninvasive Diagnosis of Disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc*. 2002 Mar;68(3):170-4.

- Leblebicioglu B, Kulekci G, Ciftci S, Keskin F, Badur S. Salivary detection of periodontopathic bacteria and periodontal health status in dental students. *Anaerobe*. 2009;15(3):82–6.
- Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1 β and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004;125(2), 168–177.
- Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, et al. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol*. 2005;43(3):260-5.
- Lessa FC1, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007 Jun;131(6):705.e11-7.
- Leung NM, Chen R, Rudney JD. Oral bacteria in plaque and invading buccal cells of young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006;130(6):698.e11-8.
- Lindquist B, Emilson CG. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Research*. 2004;38(2):95–103.
- Lo BAM, Di Marco R, Milazzo I, Nicolosi D, Calì G, Rossetti B, Blandino G. Microbiological and clinical periodontal effects of fixed orthodontic appliances in pediatric patients. *The New Microbiologica*. 2008;31(2):299–302.
- Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol*. 1967;38(6):Suppl:610-6.
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*. 2009;312B(5):416–24.
- Magno AFF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Faria G, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008;133(4 Suppl), S104–9.
- Mannaa A, Carlén A, Campus G, Lingström P. Supragingival plaque microbial analysis in reflection to caries experience. *BMC Oral Health*. 2013;13:5.

Marcaccini AM, Amato PF, Leão FV, Gerlach RF, Ferreira JTL. Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010;138(5), 613–6.

Marcaccini AM, Meschiari C, Zuard, LR, de Sousa TS, Taba M, Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2010;37(2):180–90.

Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clinics of North America*. 2010;54(3):441–54.

Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement : 100 years after Carl Sandstedt, *Eur J Orthod*. 2006 Jun;28(3):221-40.

Metwalli KH, Khan S, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathogens*. 2013;9(10):e1003616.

Mummolo S, Marchetti E, Giuca MR, Gallusi G, Tecc, S, Gatto R, Marzo G. In-office bacteria test for a microbial monitoring during the conventional and self-ligating orthodontic treatment. *Head & Face Medicine*, 2013;9(1):7.

Nagata N, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN- γ possibly induced from non-T cell population. *Bone*. 2003;33(4), 721–732.

Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006;130(3), 275.e17–22.

Nelson-Filho P, Carpio-Horta KO, Andrucioli MCD, Feres M, Bezerra da Silva RA, Garcia, FW, Romano FL. Molecular detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* on metallic brackets by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;142(4), 481–6.

Nelson-Filho P, Olmedo LYG, Andrucioli MCD, Saraiva MDCP, Matsumoto MAN, 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(a);39(7), 513–7.

- Nelson-Filho P, Valdez RMA, Andrucioli MCD, Saraiva MCP, Feres M, Sorgi CA, Faccioli LH. Gram-negative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without an antimicrobial agent: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011(b);140(6), e281–7.
- Ngom PI, Diagne F, Benoist HM, Thiam F. Intraarch and interarch relationships of the anterior teeth and periodontal conditions. *Angle Orthod*. 2006;76(2):236–42.
- Pandis N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *Eur J Orthod*. 2010;32(1), 94–9.
- Pandis N, Vlachopoulos K, Polychronopoulou A, Madianos P, Eliades T. Periodontal condition of the mandibular anterior dentition in patients with conventional and self-ligating brackets. *Orthod Craniofac Res*. 2008;11(4):211–5.
- Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiology and Immunology*. 2009;24(3):183–9.
- Paz LC. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod*. 2007;33(6):652–62.
- Peixoto IT, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. Evaluation of home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: A randomized clinical investigation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011 Jul;140(1):51–7.
- Pejda S, Varga ML, Milosevic SA, Mestrovic S, Sla M, Repic D, Bosnjak A. Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. *Angle Orthod*. 2013;83(1):133–9.
- Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA, Maier T, Machida CA. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;135(4):426.e1–426.e9.
- Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod*. 2005;31(5):380–6.

Ramoglu SI, Uysal T, Ulker M, Ertas H. Microleakage under ceramic and metallic brackets bonded with resin-modified glass ionomer. *Angle Orthod.* 2009;79(1):138–43.

Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne C. et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol.* 2009;80(3):436–46.

Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol.* 2007;78(3):453–8.

Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation-a potential public health threat? *Clin Oral Investig.* 2014 Apr 13.

Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(2):89–97.

Ribagin LS, Rashkova MR. Matrix Metalloproteinase-8 And Interleukin-1B In Gingival Fluid Of Children In The First Three Months Of Orthodontic Treatment With Fixed Appliances. *Folia Medica.* 2012;54(3):50–56.

Rupf S, Merte K, Eschrich K, Kneist S. Streptococcus sobrinus in children and its influence on caries activity. *European Archives of Paediatric Dentistry* 2006;7:17–22.

Salla JT, Taddei SRDA, Queiroz-Junior CM, Andrade Junior I, Teixeira MM, Silva TA. The effect of IL-1 receptor antagonist on orthodontic tooth movement in mice. *Archives of Oral Biology,* 2012;57(5):519–24.

Sallum EJ1, Nouer DF, Klein MI, Gonçalves RB, Machion L, Wilson Sallum A, Sallum. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 Sep;126(3):363-6.

Sanpei S, Endo T, Shimooka S. Caries risk factors in children under treatment with sectional brackets. *Angle Orthod.* 2010;80(3):509–14.

Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, da Silva LAB, da Silva RAB, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. *Microbiological Research.* 2011;166(1):63–7.

- Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RAB, de Rossi, A, Faria G, Silva LAB, Emilson CG. Recovery of mutans streptococci on MSB, SB-20 and SB-20M agar media. *Archives of Oral Biology*. 2013;58(3):311–6.
- Sari E, Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients. *Angle Orthod*. 2007;77(5):881–4.
- Saygun I, Nizam N, Keskiner I, Bal V, Kubar A, Açikel C et al. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J Periodontal Res*. 2011;46(2):235–9.
- Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(1):47–52.
- Shaddox LM, Gonçalves PF, Vovk A, Alli N, Huang H, Hou W. et al. LPS-induced inflammatory response after therapy of aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2013;92(8):702–8.
- Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009;88(11):969–81.
- Siqueira JF, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26(2):255–73.
- Slots J, Slots H. Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk. *Periodontol*. 2000. 2011a;55(1):48–69.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
- Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *J Oral Microbiol*. 2004;19(6):352–62.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000, 2005;38:135–87.
- Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2002;29(3):260–8.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. “Checkerboard” DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994;17(4):788–92.

Stauffer K, Landmesser H. Effects of Crowding in the Lower Anterior Segment – a Risk Evaluation Depending upon the Degree of Crowding. *J Orofac Orthop*. 2004;(1):13–25.

Steinberg D, Eyal S. Initial biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. *J Oral Rehabil*. 2004;31(11):1041–5.

Sudjalim TR, Woods MG, Manton DJ, Reynolds EC. Prevention of demineralization around orthodontic brackets in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007;131(6), 705.e1–9.

Sukontapatipark W, El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod*. 2001;23(5):475–84.

Suzuki JI, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Aoyama N, Tada Y, et al. Periodontitis in Cardiovascular Disease Patients with or without Marfan Syndrome -A Possible Role of *Prevotella intermedia*. *PloS One*. 2014; 9(4):e95521.

Taba M Jr1, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005 Jul;49(3):551-71.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294–303.

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. *J Periodontol Research*. 2009;44(3):411–7.

Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky SS, Haffajee AD. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol*. 2010;81(1):89–98.

Thomson WM. Orthodontic treatment outcomes in the long term: findings from a longitudinal study of New Zealanders. *Angle Orthod*. 2002;72(5):449–55.

Topaloglu-Ak A, Ertugrul F, Eden E, Ates M, Bulut H. Effect of orthodontic appliances on oral microbiota--6 month follow-up. *J Clin Pediatr Dent*. 2011;35(4):433–6.

Torlakovic L, Paster BJ, Ogaard B, Olsen I. Changes in the supragingival microbiota surrounding brackets of upper central incisors during orthodontic treatment. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2013;71(6):1547–54.

- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelei, RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 2003;19(5):641–4.
- Uitto VJ. Gingival crevice fluid an introduction. *Periodontology* 2000. 2003;31(7):9–11.
- 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.
- 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. *Eur J Orthod.*, 2011;33(1):15–21.
- van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Pauwels M, Coucke W, Carels C. Microbial adhesion on different bracket types in vitro. *Angle Orthod*. 2009;79(5):915–21.
- van Gastel J, Teughels W, Quirynen M, Struyf S, Van Damme J, Coucke W, Carels C. Longitudinal changes in gingival crevicular fluid after placement of fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139(6):735–44.
- van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994;73(3):672–81.
- van Loveren C, Buijs JF, ten Cate JM. Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5. *Caries Res*. 2000 Nov-Dec;34(6):481–5.
- Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008;23(4):282–90.
- Viecilli RF, Katona TR, Chen J, Hartsfield JK, Roberts WE. Orthodontic mechanotransduction and the role of the P2X7 receptor. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;135(6), 694.e1–16; discussion 694–5.
- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013;69(1):137–43.
- Wang Y, Wang H, Ye Q, Ye J, Xu C, Lin L, et al. Co-regulation of LPS and tensile strain downregulating osteogenicity via c-fos expression. *Life Sciences*. 2013;93(1):38–43.
- Wei S1, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):282–90.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):412–8.

Yamaguchi M. RANK / RANKL / OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(2):113-9.

Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N. Inhibitory effects of IL-12 on experimental tooth movement and root resorption in mice. *Arch Oral Biol.* 2012 Jan;57(1):36-43.

Zainal Ariffin SH, Yamamoto Z, Zainol Abidin IZ, Megat Abdul Wahab R, Zainal Ariffin Z. Cellular and molecular changes in orthodontic tooth movement. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1788–803.

Zambon J.J. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):879-925.

Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):64–9.

Ziegler N, Alonso A, Steinberg T, Woodnutt D, Kohl A, Müssig E, et al. Mechano-transduction in periodontal ligament cells identifies activated states of MAP-kinases p42/44 and p38-stress kinase as a mechanism for MMP-13 expression. *BMC Cell Biology.* 2010;11:10.

Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis and Rheumatism.* 2004;50(1):277–90.