UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA

MARCELA CRISTINA DAMIÃO ANDRUCIOLI

**MINI-IMPLANTES ORTODÔNTICOS: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE
ENDOTOXINA BACTERIANA, CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E MARCADORES DA
OSTEOCLASTOGÊNESE**

RIBEIRÃO PRETO
2013

MARCELA CRISTINA DAMIÃO ANDRUCIOLI

**MINI-IMPLANTES ORTODÔNTICOS: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE
ENDOTOXINA BACTERIANA, CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E MARCADORES DA
OSTEOCLASTOGÊNESE**

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.

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO NELSON-FILHO

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO

2013

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrucioli, Marcela Cristina Damião

Mini-implantes ortodônticos: avaliação microbiológica e quantificação de endotoxina bacteriana, citocinas pró-inflamatórias e marcadores da osteoclastogênese. Ribeirão Preto, 2013.

78p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.
Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja no Programa.

1. Procedimentos de ancoragem ortodôntica. 2. Microbiologia. 3. Citocinas.
4. NF-kappa B. 5. Ligante RANK. 6. Osteoprotegerina. 7. Endotoxina bacteriana.

Andrucioli, M.C.D. **Mini-implantes ortodônticos: avaliação microbiológica e quantificação de endotoxina bacteriana, citocinas pró-inflamatórias e marcadores da osteoclastogênese.**

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

MARCELA CRISTINA DAMIÃO ANDRUCIOLI

Nascimento	06 de dezembro de 1980 – Pontal – São Paulo
Filiação	Guilherme Andrucioi Júnior Regina Célia Damião Andrucioi
1998-2001	Graduação Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo – FORP/USP
2003-2004	Especialização em Ortodontia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo – FORP/USP Monografia intitulada “Contagem de <i>Streptococcus mutans</i> em biofilme formado adjacente a bráquetes colados com CIV modificado por resina”
2007-2009	Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Nível Mestrado, Área de Concentração Ortodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista – FOA/UNESP Dissertação intitulada “Detecção de microrganismos em bráquetes metálicos <i>in vivo</i> , com ou sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> ”
2009-2013	Pós-Graduação em Ciências Nível Doutorado, Área de Concentração Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo – FORP/USP Dissertação intitulada “Mini-implantes ortodônticos: avaliação microbiológica e quantificação de endotoxina bacteriana, citocinas pró-inflamatórias e marcadores da osteoclastogênese”

Ofereço ...

A Deus,

Por ser presença viva em minha vida e nunca me deixar desistir.

Entrego a Ti, Senhor, a minha vida.

Dedico ...

*Aos meus pais,
Regina e Guilherme,*

*Meus maiores exemplos de vida,
meu amor, admiração e gratidão eternos.
Essa conquista também é de vocês.*

*Aos meus irmãos,
Andréa e Guilherme,*

*Por estarem sempre ao meu lado,
me apoiando e ajudando sempre.*

*Aos meus cunhados,
Francisco e Jacqueline,*

Por todos os momentos compartilhados, meu agradecimento.

*Ao meu sobrinho e afilhado,
João Francisco,
Pelas alegrias e amor sem medida.*

AGRADECIMENTOS **E**SPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho,

Professor, Pesquisador, Orientador e Amigo;

Pude conhecer nestes anos todos, desde a Graduação, um pouco de cada um deles. Posso dizer, com muito orgulho, que você participou de todas as etapas da minha formação profissional.

Obrigada por ter acreditado em mim sempre.

Minha imensa admiração e agradecimento.

AGRADECIMENTOS **E**SPECIAIS

À Profª. Drª. Mírian Aiko Nakane Matsumoto

Meu exemplo, também desde a Graduação, na Ortodontia.

Sinônimo de competência e dedicação.

*Agradeço pelos conhecimentos compartilhados, pelas orientações
profissionais, pelos conselhos e amizade.*

Obrigada pela confiança em mim depositada todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Adilson Tomasin

Expresso meu sincero agradecimento e meu profundo respeito.

*Obrigada por acreditar na minha capacidade profissional e pelo
incansável incentivo. Pelos seus ensinamentos, orientações, conselhos e,
acima de tudo, pela amizade.*

*Sinto-me honrada em poder dividir com o senhor a clínica da
Especialização. Minha inestimável admiração.*

À Profª. Drª. Maria da Conceição Pereira Saraiva

*Pela dedicação e auxílio na realização da Análise Estatística deste estudo,
pelos ensinamentos compartilhados e, também, pela amizade.*

Meus sinceros agradecimentos.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e da 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 da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora Prof^ª. Dr^ª. Léa Assed Bezerra da Silva e da Vice-Coordenadora Prof^ª. Dr^ª. Raquel Assed Bezerra Segato.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, 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. Kranya Victória Díaz Serrano, Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Borsatto, Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof^ª. Dr^ª. Raquel Assed Bezerra Segato e Prof^ª. Dr^ª. Andiara De Rossi Daldegan, pelos conhecimentos compartilhados, pela atenção, agradável convivência e pela valiosa contribuição em minha formação acadêmica e científica.

Aos professores da disciplina de Ortodontia, Prof. Dr. Adilson Tomasin, Prof^ª. Dr^ª. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira e Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, e do Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Prof. Dr. Ademar Valente, Prof^ª. Dr^ª. Carla Enoki Itikawa, Prof. Marcelo Mestriner, Prof. Dr. Milton Santamaria Júnior, por partilhar de seus conhecimentos e experiências profissionais, minha admiração e respeito.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Fukada, pela dedicação, paciência e inestimável colaboração na análise de PCR. Deixo registrado meu respeito e gratidão.

À Prof^a. Dr^a. Magda Feres e Prof^a. Dr^a. Luciene Cristina Figueiredo, pela inestimável colaboração na análise de checkerboard DNA-DNA hybridization, pela atenção e disponibilidade, expresso meu reconhecimento e estima.

À Prof^a. Dr^a. Lucia Helena Faccioli e ao Dr. Carlos Arterio Sorgi, pela cordialidade e imensa cooperação nos procedimentos laboratoriais para quantificação da endotoxina bacteriana.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Marco Antonio dos Santo e Fátima Aparecida Jacinto Daniel, pela atenção, por estarem sempre à disposição, pelo convívio diário e amizade. Em especial à Nilza Letícia Magalhães, pela amizade, agradável convivência e disponibilidade em ajudar no laboratório sempre que precisei. Muito obrigada.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilloto, pelo auxílio prestado durante todo o curso e pela atenção com que sempre atenderam às minhas solicitações.

À Izilvânia Q. Barreto e Ana Polay, pelo auxílio técnico na realização do processamento das amostras. Obrigada pela dedicação e atenção.

Ao colega Eduardo Zanella, pelo auxílio na instalação e remoção dos mini-implantes.

Às amigas do Curso de Pós-Graduação Ana Zilda Nazar Bergamo, Luciane Almeida, Marília Pacífico Lucisano e Carolina Paes Torres Mantovani, pela companhia, auxílio sempre que necessário e, acima de tudo, pela amizade. Meus sinceros agradecimentos.

Ao funcionário da Seção de Informática Paulo Marcos Fazzio, pela disponibilidade e gentileza no auxílio na confecção de figuras, meu muito obrigada.

Aos alunos da 5ª e 6ª turma do Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pelo respeito e agradável convivência.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela agradável convivência, ainda que por vezes pudesse parecer pequena.

Aos funcionários das Clínicas I, II e III da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e da Fundação Odontológica de Ribeirão Preto (FUNORP), pelo respeito e atenção a mim prestados e pela disponibilidade em ajudar sempre, em especial à secretária do Curso de Especialização em Ortodontia, Rosemary Alves de Sá.

Aos Pacientes, que permitiram a realização deste estudo, minha gratidão pela confiança em mim depositada.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa), pelo auxílio financeiro (Auxílio regular), indispensável para o desenvolvimento deste estudo.

Às minhas tias Sandra Mara Damião Contart e Sarita Damião Médici e à minha prima e afilhada Yasmin Damião Contart, que sempre me incentivaram e apoiaram e pelo muito que representam pra mim.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa. Minha lembrança e gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO.	64
REFERÊNCIAS	66

RESUMO

Andrucioli, MCD. **Mini-implantes ortodônticos: avaliação microbiológica e quantificação de endotoxina bacteriana, citocinas pró-inflamatórias e marcadores da osteoclastogênese.** 2013. 78 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Os mini-implantes ortodônticos vem sendo amplamente utilizados na prática clínica como dispositivos de ancoragem. No entanto, há casos em que ocorre sua perda durante o tratamento. Inúmeros aspectos tem sido analisados com o intuito de detectar as causas do insucesso, porém estas ainda não estão totalmente esclarecidas. Portanto, utilizando-se dois grupos de mini-implantes - com estabilidade (sucesso) e sem estabilidade (falha) -, os objetivos do presente estudo *in vivo* foram: 1) avaliar a contaminação microbiana, empregando sondas de DNA para 40 espécies de bactérias, por meio da técnica de biologia molecular *checkerboard DNA-DNA hybridization*; 2) quantificar a endotoxina bacteriana presente nos mini-implantes dos dois grupos por meio do teste *Limulus Amebocyte Lysate* ; e 3) quantificar as citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-6, IL-17 e TNF- α e proteínas marcadoras da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) por meio da técnica *real-time polymerase chain reaction*. Dezesseis pacientes de ambos os sexos (11-49 anos) em tratamento ortodôntico com aparelho corretivo e mini-implantes foram selecionados, sendo obtidos 19 mini-implantes com estabilidade e 10 mini-implantes sem estabilidade. O tempo médio de permanência na boca foi de 23,8 meses para os mini-implantes estáveis e 6,7 meses para os mini-implantes sem estabilidade. Foram utilizados mini-implantes da marca Neodent, com 1,6mm de diâmetro e com 7,0 ou 9,0 mm de comprimento, colocados na maxila e/ou mandíbula. Todos os mini-implantes foram instalados e removidos pelo mesmo cirurgião. No momento da remoção, foram coletados os mini-implantes e amostras de gengiva ao redor dos mesmos. Os mini-implantes foram processados para a detecção dos micro-organismos e para a quantificação da endotoxina bacteriana. As amostras de gengiva foram processadas para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias e proteínas marcadoras da osteoclastogênese. Os resultados obtidos foram analisados por meio do teste não-paramétrico de soma de postos de Wilcoxon, considerando-se os conglomerados, utilizando o software SAS. O nível de significância adotado foi de 5%. Todas (100%) as 40 espécies de micro-organismos foram observadas em ambos os grupos de mini-implantes, com diferentes porcentagens de ocorrência. Não foi possível observar diferença entre os grupos com relação aos complexos microbianos (azul, roxo, amarelo, verde, laranja, vermelho e outras espécies). Também não foi possível observar diferença na quantificação de endotoxina e das citocinas e marcadores da osteoclastogênese ($p>0,05$), com exceção da IL-6 ($p<0,05$). Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que a contaminação microbiana e a quantidade de endotoxina nos mini-implantes, assim como a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-17 e TNF- α e dos marcadores da osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG no tecido gengival circundante não atuaram como fatores responsáveis pela perda da estabilidade dos mini-implantes e que a maior expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 pode estar diretamente relacionada à perda da estabilidade dos mini-implantes, sugerindo-se estudos adicionais.

PALAVRAS-CHAVE: Procedimentos de ancoragem ortodôntica. Microbiologia. Citocinas. NF-Kappa B. Ligante RANK. Osteoprotegerina. Endotoxina.

ABSTRACT

Andrucioli, MCD. **Orthodontic mini-implants: microbiological evaluation and quantification of bacterial endotoxin, proinflammatory cytokines and osteoclastogenesis markers.** 2013. 78 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Orthodontic mini-implants have been widely used in clinical practice as anchorage devices. However, their loss may occur during the treatment. Several aspects have been investigated to identify the causes of failure, but they are not yet completely elucidated. Therefore, using two groups of mini-implants - stable and unstable/loose - the objectives of this *in vivo* study were: 1) to evaluate the microbial contamination, using DNA probes for 40 bacterial species by the checkerboard DNA-DNA hybridization biomolecular technique; 2) to quantify the bacterial endotoxin present in both groups of mini-implants by the Limulus Amebocyte Lysate assay; and 3) to quantify the proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-6, IL-17 and TNF- α and the osteoclastogenesis marker proteins (RANK, RANKL and OPG) by real-time polymerase chain reaction technique. Sixteen patients of both sexes (11 to 49 years old) under orthodontic treatment with corrective appliance and mini-implants were selected, obtaining 19 stable mini-implants and 10 unstable/loose mini-implants. The mean time of permanence in the mouth was 23.8 months for stable mini-implants and 6.7 months for unstable/loose mini-implants. The mini-implants (1.6 mm diameter x 7.0 or 9.0 mm long; Neodent) were placed in the maxilla and/or mandible. All mini-implants were placed and removed by the same surgeon. At the moment of removal, the mini-implants and periimplant gingival tissue samples were collected. The mini-implants were processed for detection of microorganisms and quantification of bacterial endotoxin, while the gingival tissue samples were processed for quantification of proinflammatory cytokines and osteoclastogenesis protein markers. The results were analyzed statistically by the nonparametric Wilcoxon rank-sum test, considering the conglomerates, using SAS software. A significance level of 5% was adopted for all analyses. All (100%) 40 microbial species were observed in both groups of mini-implants, with different percentages of occurrence. No differences could be observed between the groups with respect to the microbial complexes (blue, purple, yellow, green, orange, red and other species). There was no significant difference either in the quantification of endotoxin and cytokines and osteoclastogenesis markers ($p > 0.05$), except for IL-6 ($p < 0.05$). Based on the obtained results, it may be concluded that neither the microbial contamination and amount of endotoxin in mini-implants, nor the expression of proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-17 and TNF- α and osteoclastogenesis markers RANK, RANKL and OPG in the periimplant gingival tissue acted as factors responsible for the loss of stability of the mini-implants, and that the higher expression of the IL-6 proinflammatory cytokine may be directly associated with the loss of stability of the mini-implants, suggesting additional studies.

KEYWORDS: Orthodontic anchorage procedures. Microbiology. Cytokines. NF-Kappa B. RANK Ligand. Osteoprotegerin. Endotoxin.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A "Ancoragem Ortodôntica", que pode ser definida como a resistência que um dente oferece ao movimento dentário (Graber e Vanarsdall, 1994), é um fator importante para a adequada aplicação da mecânica ortodôntica e seu controle é fundamental para o sucesso do tratamento (Tseng et al., 2006; Schätzle et al., 2009).

Tradicionalmente, a ancoragem ortodôntica pode ser realizada utilizando-se os elementos dentais, cortical óssea alveolar, palato, elásticos, músculos, cabeça, face e nuca (Ruellas, 2013). No entanto, esses tipos de ancoragem apresentam algumas limitações, como efeitos colaterais indesejáveis da ancoragem intra-bucal, por incapacidade do recurso utilizado em resistir ao movimento dentário indesejado e também devido à falta de colaboração ideal por parte do paciente no uso dos dispositivos de ancoragem extra-bucais, para a obtenção de um resultado satisfatório (Guray et al., 1997; Yao et al., 2008; Apel et al., 2009; Kaya et al., 2009; Ruellas, 2013). Para superar essas limitações, foram introduzidos dispositivos de ancoragem temporária (DAT), que são dispositivos fixos ancorados ao osso e removidos após a conclusão do movimento dentário desejado, permitindo maior controle mecânico e independência em relação à colaboração por parte do paciente (Creekmore e Eklund, 1983).

Os DAT tem ganhado popularidade crescente nas últimas décadas (Creekmore e Eklund, 1983; Kanomi, 1997; Leung et al., 2008; Yao et al., 2008; Uemura et al., 2012; Pithon et al., 2013), e dentre eles, os mini-implantes apresentam vantagens como alta versatilidade em relação aos implantes dentários e mini-placas por possuírem dimensões reduzidas, colocação cirúrgica simples, possibilidade de aplicação de carga imediata e menor custo (Wiechmann et al., 2007; Chen et al., 2009).

De acordo com a literatura, a taxa de sucesso clínico dos mini-implantes é elevada, sendo superior a 80% (Miyawaki et al., 2003; Cheng et al., 2004; Park et al., 2006; Reynders et al., 2009). A sua estabilidade primária está relacionada às características mecânicas da interface entre o mini-implante e o osso (Costa et al., 1998; Miyawaki et al., 2003; Cheng et al., 2004; Deguchi et al., 2006; Motoyoshi et al., 2006; Park et al., 2006; Janssen et al., 2008; Chen et al., 2009; Motoyoshi et al., 2010; Marquezan et al., 2011; Marquezan et al., 2012). De acordo com Motoyoshi et al. (2005), a estabilidade a longo

prazo (secundária) dos mini-implantes está relacionada à estabilidade primária ou inicial, logo após a instalação, e suportada pela ósseo-integração. No entanto, considera-se que os mini-implantes praticamente não sofrem osseointegração, sendo sua retenção basicamente mecânica e temporária (Elias et al., 2011).

Na literatura, há relatos de falhas no uso de mini-implantes, com perda de estabilidade durante o tratamento (Freitas et al., 2012). As variáveis que influenciam as taxas de sucesso, de acordo com Reynders et al. (2009, 2012), podem estar relacionadas ao implante, ao paciente, à localização e também a fatores relacionados à técnica de colocação cirúrgica, à mecânica ortodôntica e à higienização do mini-implante.

Os fatores relacionados aos mini-implantes incluem o material utilizado na sua fabricação, desenho e tratamento da superfície, além do diâmetro e comprimento; os fatores relacionados ao paciente são sexo, idade, estado de saúde geral e dentário; fatores relacionados à localização incluem características específicas dos tecidos moles e mineralizados, como qualidade e quantidade de osso onde o mini-implante será colocado, espessura da cortical óssea, colocação em áreas de gengiva livre ou inserida e a proximidade com raízes; os fatores relacionados à cirurgia incluem a experiência do cirurgião e a técnica cirúrgica: com ou sem retalho, parafusos autoperfurantes ou autorrosqueáveis, orifício piloto apenas no córtex ou no comprimento total do parafuso, diâmetro da broca piloto, refrigeração, velocidade e pressão de perfuração do osso, tipo de ancoragem (mono ou bicortical), direção e torque de inserção; e os fatores relacionados à mecânica ortodôntica englobam o tempo do início de aplicação da força, tipo de força aplicada (intermitente ou contínua), magnitude, duração e direção da força. Os fatores relacionados à higienização do implante visam o controle da ocorrência de peri-implantite (Reynders et al., 2009).

Complicações no uso dos mini-implantes como inflamação persistente, dor e desconforto são aspectos pouco explorados na literatura específica (Reynders et al., 2009). De acordo com Tseng et al. (2006) e Wu et al. (2009), a higiene bucal também pode ter influência no sucesso dos mini-implantes, podendo conduzir à inflamação dos tecidos circundantes e, conseqüentemente, à sua perda. Miyawaki et al. (2003), Takaki et al. (2010) e Freitas et al. (2012) também salientaram que a intensidade da inflamação nos tecidos moles ao redor dos mini-implantes pode ser considerada como um potencial fator de complicação para os DAT, contribuindo para a perda da sua estabilidade.

Os mini-implantes são colocados transgengivalmente e, portanto, são diretamente acessíveis a todos os tipos de micro-organismos presentes na cavidade bucal, entre eles bactérias conhecidas por sua implicação na periodontite e na peri-implantite. Sabe-se que a microbiota periodontopatogênica é composta predominantemente por micro-organismos anaeróbios (Jenkins e Papapanou, 2001; Albandar e Rams, 2002; Lakhssassi et al., 2005), particularmente Gram-negativos (Mombelli e Décaillet, 2011), que apresentam a endotoxina bacteriana em sua parede celular (Rietschel e Brade, 1992; Leonardo et al., 2010), e níveis elevados de bactérias fusiformes e espiroquetas (Atack et al., 1996).

De acordo com Freitas et al. (2012), 24 horas após a colocação do mini-implante na cavidade bucal a colonização microbiana já está estabelecida. Essas bactérias podem penetrar ao longo do mini-implante, promovendo a infecção dos tecidos moles e mineralizados, principalmente quando a higiene bucal do paciente é insatisfatória (Apel et al., 2009). No entanto, de acordo com Tortamano et al. (2012), a colonização da superfície dos mini-implantes por bactérias patogênicas deve ser mais profundamente investigada como causa da falha destes dispositivos.

Em Ortodontia, os micro-organismos podem ser detectados em aparelhos removíveis e fixos tradicionalmente por técnicas de cultura microbiana (Brêtas et al., 2005; Lessa et al., 2007; Peixoto et al., 2011), 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; Andruciole et al., 2012; Nelson-Filho et al., 2012; Barker et al., 2013), que 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 (Shibli et al., 2008; Ioannou et al., 2009; Lee et al., 2012; Silva et al., 2011; Novaes et al., 2012), Endodontia (Vianna et al., 2008; Siqueira e Rôças, 2009; Rôças et al., 2010; Ito et al., 2011), Implantodontia (Maximo et al., 2009; Canullo et al., 2010; Freitas et al., 2011; Charalampakis et al., 2012), Odontopediatria (Ruvieri et al., 2007; Gizani et al., 2009; Ito et al., 2011), Cariologia (Filoche et al., 2008; Gizani et al., 2009; Nelun et al., 2011) e Ortodontia (Nelson-Filho et al., 2011a, Nelson-Filho et al., 2011b; Andruciole et al., 2012; Nelson-Filho et al., 2012).

A contaminação em mini-implantes, especialmente por bactérias periodontopatogênicas, também tem sido avaliada (Apel et al., 2009; Freitas et al., 2012; Tortamano et al.; 2012), porém por outras técnicas de biologia molecular, como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Microarray*.

Paralelamente, sabe-se que os patógenos periodontais induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-17, entre outras, que podem levar à inflamação do tecido gengival e estimular a produção de proteínas ligadas à reabsorção óssea, como o RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa β*), o RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa β Ligand*) e a osteoprotegerina (OPG) (Wright et al., 2009; Duarte et al., 2009; Ayon et al., 2011; Javed et al., 2011; Hamdy et al., 2011; Severino et al., 2011; Güncü et al., 2012; Kitaura et al., 2013), conduzindo à perda óssea (Mogi et al., 2004; Greenfield et al., 2005; Bostanci et al., 2007; Beidelschies et al., 2008). O RANK é expresso em precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros, enquanto que o seu ligante RANKL é expresso particularmente em osteoblastos. Para a diferenciação e ativação dos osteoclastos é necessário que haja a interação RANK/RANKL, enquanto que a OPG interfere negativamente nesse processo, inibindo a reabsorção óssea (Boyle et al., 2003; Bostanci et al., 2007; Duarte et al., 2009). Essas citocinas e proteínas relacionadas à inflamação e à reabsorção óssea podem ser detectadas e quantificadas por métodos imunohistoquímicos (Silva et al., 2012), métodos imunoenzimáticos, como o Elisa (Bostanci et al., 2007; Severino et al., 2011; Güncü et al., 2012), ou por métodos de biologia molecular como o PCR (Omar et al., 2011; Morra et al., 2012).

Em Ortodontia, já foi evidenciada a importância da expressão de citocinas pró-inflamatórias e dos mediadores da osteoclastogênese nos tecidos periodontais durante a movimentação dentária, induzidos pelo *stress* mecânico (Yamaguchi, 2009). Especificamente em mini-implantes, estudos como os de Sari e Uçar (2007) e Hamamci et al. (2012) salientaram a importância da expressão dessas citocinas pró-inflamatórias também durante a movimentação dentária. De acordo com estes estudos, dentre as citocinas avaliadas, houve alteração nos níveis de IL-2 e IL-8, contrariamente ao que ocorreu com IL-1 β e IL-6 no fluido crevicular ao redor dos mini-implantes.

Outro aspecto também relevante é que os micro-organismos Gram-negativos, além de gerarem produtos e subprodutos tóxicos aos tecidos, contem a endotoxina em sua parede celular. Esse conhecimento é particularmente importante, uma vez que a

endotoxina, também conhecida como LPS em função de sua natureza lipopolissacarídica, é liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana, exercendo uma série de efeitos biológicos importantes (Rietschel e Brade, 1992; Leonardo et al., 2004; Leonardo et al., 2010; Morra et al., 2012), que conduzem à ocorrência de reação inflamatória e reabsorção óssea (Nelson-Filho et al., 2002; Rogers et al., 2007; Silva et al., 2008; Sosroseno et al., 2009; Nelson-Filho et al., 2011b).

Sabe-se que a doença periodontal, em humanos, é caracterizada pela destruição das estruturas de suporte do elemento dental (McDevitt et al., 2000), iniciada pela interação de micro-organismos periodontopatogênicos com as células do hospedeiro (Sheikhi et al., 2000; Preshaw e Taylor, 2011). A endotoxina bacteriana constitui um dos maiores fatores de virulência da superfície de micro-organismos Gram-negativos, atuando como um potente estímulo para uma grande variedade de células do hospedeiro, via receptores como a proteína ligante da endotoxina (LBP), CD14 e “toll-like receptors” (TLRs) 2 e 4 (Ren et al., 2005; Lu et al., 2008; Greenfield et al., 2010; Bonsignore et al., 2013), o que resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias e amplificação da resposta imune do hospedeiro (Antal-Szalmás et al., 1997; Morra et al., 2012).

A endotoxina induz a produção de óxido nítrico (Sosroseno et al., 2009; Takahashi et al., 2011), ativa o sistema complemento (Morrison e Kline, 1977) e, no interior dos tecidos periodontais e fluido gengival crevicular, ativa monócitos, macrófagos e fibroblastos a produzirem citocinas pró-inflamatórias clássicas, como a IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Lee et al., 1995; Tsai et al., 1995; Bi et al., 2001; Greenfield et al., 2005; Beidelschies et al., 2008; Morra et al., 2012), induzindo inflamação. Essas citocinas também estimulam as metaloproteinases da matriz como as collagenases, que destroem os tecidos devido à degradação dos componentes da matriz extracelular. Além disso, a IL-1 e o TNF- α induzem a reabsorção óssea, diretamente, estimulando a IL-6, ou indiretamente, estimulando efetores associados com a osteoclastogênese, como o RANK, o RANKL e a OPG. A endotoxina por si só pode conduzir ao aumento da expressão osteoblástica de prostaglandina E2, RANKL, IL-1 e TNF- α (Roux e Orcel, 2000; Boyce e Xing, 2008) e inibir diretamente a osteogênese (Loomer et al., 1995). Distúrbios na homeostasia do metabolismo do colágeno no interior do tecido gengival podem também ser ocasionados pela endotoxina (Takahashi et al., 2008).

Do ponto de vista ortodôntico, Knoernschild et al. (1999) avaliaram a afinidade da endotoxina bacteriana de *P. gingivalis* e de *E. coli* a bráquetes, *in vitro*,

enquanto que Nelson-Filho et al. (2011b) avaliaram *in vivo* a afinidade da endotoxina de bactérias peridontopatogênicas a bráquetes, uma vez que sabe-se que a endotoxina apresenta afinidade por materiais metálicos. De acordo com os resultados desses estudos *in vitro* e *in vivo*, observou-se a que a endotoxina se adere aos bráquetes, evidenciando que essa afinidade poderia afetar a concentração de endotoxina no sulco gengival, contribuindo para a inflamação dos tecidos adjacentes aos bráquetes. Por analogia, processo semelhante poderia ocorrer ao redor dos mini-implantes.

Embora os mini-implantes sejam amplamente utilizados na prática clínica, como já salientado há casos em que ocorre sua perda durante o tratamento. Inúmeros aspectos tem sido analisados com o intuito de detectar os motivos das falhas, porém estes ainda não estão totalmente esclarecidos. Aspectos como contaminação microbiana, inflamação persistente na região dos mini-implantes e perda óssea devem ser potencialmente considerados, justificando a necessidade da realização de avaliações microbiológicas, de citocinas pró-inflamatórias, de fatores osteoclastogênicos e da presença de endotoxina em casos de mini-implantes com e sem estabilidade. Este conhecimento poderia levar ao desenvolvimento de estratégias para favorecer o sucesso a longo prazo dos mini-implantes.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Pelo exposto, os objetivos do presente estudo foram analisar, em mini-implantes com estabilidade (sucesso) e sem estabilidade (falha):

1) A contaminação microbiana empregando sondas de DNA para 40 espécies de bactérias, por meio da técnica de biologia molecular *checkerboard DNA-DNA hybridization*.

2) A quantidade de endotoxina bacteriana presente nos mini-implantes por meio do teste *Limulus Amebocyte Lysate*.

3) A quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6, IL-17 e TNF- α) e de proteínas marcadoras da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) no tecido gengival circundante, por meio da técnica de biologia molecular *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Após a submissão do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo n. 19866013.0.0000.5419), foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis pelos indivíduos participantes da pesquisa.

Dezesseis pacientes de ambos os sexos (11-49 anos), que estavam em tratamento ortodôntico corretivo com a utilização de mini-implantes ou que tinham indicação de utilização de ancoragem ortodôntica com mini-implantes foram recrutados, em um período total de 12 meses, após anamnese e exame clínico. Para serem incluídos na pesquisa, os pacientes deveriam apresentar boa saúde geral e bucal, não serem fumantes e não terem feito uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos 3 meses que antecederam à remoção do mini-implante. Foram obtidos 19 mini-implantes com estabilidade, que cumpriram seu objetivo durante o tratamento, sem apresentarem mobilidade e que tiveram que ser removidos ao final da mecânica aplicada ou foram removidos ao final do tratamento, e 10 mini-implantes sem estabilidade, que foram removidos por apresentarem perda de estabilidade, que inviabilizou a aplicação de carga.

Foram utilizados mini-implantes da marca Neodent (Curitiba, PR, Brasil), com diâmetro de 1,6mm e com comprimentos de 7,0 ou 9,0 mm, colocados na maxila e/ou mandíbula pelo mesmo operador. Logo após a colocação dos mini-implantes, observou-se que todos apresentavam estabilidade primária adequada. Todos os pacientes receberam as mesmas instruções pós-cirúrgicas com relação à higiene bucal ao redor do mini-implante com escova macia durante a escovação dental e à utilização de antisséptico bucal, uma vez ao dia, durante a utilização do mini-implante. O tempo médio de permanência na boca foi de 23,8 meses para os mini-implantes estáveis e de 6,7 meses para os mini-implantes sem estabilidade.

No momento da remoção, os mini-implantes coletados foram individualmente armazenados em tubos plásticos para microcentrifuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339, Hamburg, Germany) de 1,5 mL, apirrogênicos, contendo 200 µL de água livre de pirogênio. Em seguida, cada tubo foi codificado e agitado vigorosamente em aparelho Mixtron (Toptronix, São Paulo, SP, Brasil), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para

dessorção do material aderido à sua superfície. Dos 200 µL, 150 µL foram centrifugados a 4.000 g por 12 minutos, com a finalidade de remover o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado em 150 µL de tampão TE e 100 µL de NaOH a 0,5 M e congelado a -20°C até o momento do processamento pela técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Os 50 µL restantes do volume de cada tubo foram congelados a -20°C para, posteriormente, serem submetidos à quantificação de endotoxina bacteriana por meio do teste *Limulus Amebocyte Lysate*. Como controle adicional, 10 mini-implantes foram retirados de suas embalagens originais, sem terem sido utilizados, e analisados com relação à quantidade de endotoxina, com a finalidade de verificar se não apresentavam contaminação oriunda do processo de fabricação industrial e/ou embalagem.

Adicionalmente, logo após a remoção dos mini-implantes da cavidade bucal removeu-se, com bisturi, 1 mm de tecido gengival ao redor dos mini-implantes, o qual foi colocado em tubo plástico de fundo chato para microcentrífuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339, Hamburg, Germany) de 2,0 mL, RNase free, contendo 200 µL de Trizol (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA). Também foram coletadas 10 amostras de gengiva obtidas da área de terceiros molares de pacientes em tratamento ortodôntico com indicação de extração e que não apresentavam sinais de inflamação (gengiva sadia – controle adicional). Os tubos foram congelados a -80°C até o momento do processamento pela técnica RT-PCR, para a identificação das citocinas pró-inflamatórias e proteínas marcadoras da osteoclastogênese.

Avaliação microbiológica - Detecção molecular de micro-organismos por meio da técnica checkerboard DNA-DNA hybridization

O conteúdo de cada amostra dos mini-implantes foi avaliado utilizando-se da técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization* (Socransky et al., 1994) para verificar a presença das 40 espécies bacterianas identificadas na Tabela 1. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos (azul ou grupo dos *Actinomyces*, roxo, amarelo, verde, laranja, vermelho e outras espécies) descritos por Socransky et al. (1998), que agruparam os micro-organismos presentes no biofilme subgengival, e cuja classificação foi posteriormente utilizada por Shibli et al. (2008) para avaliação da composição do biofilme

em implantes protéticos com e sem peri-implantite. As amostras foram aquecidas para lisar as células bacterianas e o DNA contido nas mesmas foi depositado sobre uma membrana de nylon com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), com o auxílio de um dispositivo específico (Minislot-30 – Immunetics INC, Boston, MA, USA).

Tabela 1. Cepas bacterianas empregadas para a obtenção das sondas de DNA

Espécies		Cepa
Complexo azul		
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Gram +	23860 ^a
<i>Actinomyces israeli</i>	Gram +	12102 ^a
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	Gram +	12104 ^a
Complexo roxo		
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Gram +	17929 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	Gram -	10790 ^a
Complexo amarelo		
<i>Streptococcus gordonii</i>	Gram +	10558 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	Gram +	27335 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	Gram +	49456 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	Gram +	35037 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Gram +	10556 ^a
Complexo verde		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> a + b	Gram -	43718 ^a
		29523 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	Gram -	33624 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	Gram -	33612 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	Gram -	23834 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	Gram -	33596 ^a
Complexo laranja		
<i>Campylobacter gracilis</i>	Gram -	33236 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	Gram -	33238 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	Gram -	51146 ^a
<i>Eubacterium nodatum</i>	Gram +	33099 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss nucleatum	Gram -	25586 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss polymorphum	Gram -	10953 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss vincentii	Gram -	49256 ^a
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	Gram -	33693 ^a
<i>Parvimonas micra</i>	Gram +	33270 ^a
<i>Prevotella intermedia</i>	Gram -	25611 ^a
<i>Prevotella nigrescens</i>	Gram -	33563 ^a
<i>Streptococcus constellatus</i>	Gram +	27823 ^a
Complexo vermelho		
<i>Tannerella forsythia</i>	Gram -	43037 ^a
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gram -	33277 ^a
<i>Treponema denticola</i>	Gram -	B1 ^b
Outras espécies		
<i>Gemella morbillorum</i>	Gram +	27824 ^a
<i>Leptotrichia buccalis</i>	Gram -	14201 ^a
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Gram -	25845 ^a
		11827 ^a
<i>Propionibacterium acnes</i> I + II	Gram +	11828 ^a
<i>Selenomonas noxia</i>	Gram -	43541 ^a
<i>Streptococcus anginosus</i>	Gram +	33397 ^a
<i>Treponema socranskii</i>	Gram -	S1 ^b
<i>Eubacterium saburreum</i>	Gram +	33271 ^a
<i>Actinomyces oris</i>	Gram +	43146 ^a
<i>Neisseria mucosa</i>	Gram -	19696 ^a

^a ATCC, American Type Culture Collection

^b Forsyth Institute, Boston, MA.

Após a fixação do DNA sobre a membrana, esta foi colocada em outro dispositivo (Miniblotter-45 – Immunetics Inc, Boston, MA, USA), com as linhas contendo o DNA das amostras posicionadas perpendicularmente às canaletas do Miniblotter-45. As sondas de DNA para as 40 espécies bacterianas marcadas com digoxigenina foram depositadas nas canaletas do Miniblotter-45 para a hibridização das sondas com o DNA das amostras. As membranas foram então lavadas em alta adstringência e as sondas de DNA foram detectadas utilizando-se o anticorpo anti-digoxigenina, conjugado à fosfatase alcalina, por meio da observação dos sinais de quimioluminescência. As duas últimas linhas horizontais da membrana apresentavam controles nas concentrações de 10^5 e 10^6 bactérias de cada espécie que estava sendo investigada. Os sinais produzidos foram comparados aos controles e convertidos em contagem absoluta (0 , 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 células bacterianas). A leitura dos resultados foi realizada duas vezes para a conferência dos resultados, por um único examinador calibrado ($Kappa > 0,8$) e cego com relação aos grupos avaliados. A sensibilidade foi ajustada para permitir a detecção de 10^4 células das espécies que estavam sendo avaliadas pelo ajuste da concentração das sondas de DNA.

Quantificação das citocinas pró-inflamatórias e de proteínas marcadoras da osteoclastogênese pela técnica “RT-PCR”, utilizando o Sistema SYBR Green

Isolamento do RNA e Amplificação do DNAc por PCR

A expressão de RNA mensageiro (RNA_m) foi avaliada para quantificação de citocinas (IL-1 α , IL-6, IL-17 e TNF- α) e marcadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) no tecido gengival ao redor dos mini-implantes com e sem estabilidade e nas amostras de gengiva sadia. As amostras foram mantidas em Trizol e congeladas a -80°C até o dia do processamento, quando foram descongeladas, trituradas em politron (Ultra Turrax, Ika-Werke, Staufen, BW, Germany), homogeneizadas durante 30 segundos em aparelho Mixtron (Toptronix, São Paulo, SP, Brasil) e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente. A extração de RNA total foi realizada utilizando kit de extração (Promega Corporation, Madison, WI, USA) seguindo instruções do fabricante. Alíquotas de 2 μL foram utilizadas para determinar a concentração de RNA $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada amostra, utilizando o Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Após a extração do RNA, o DNA

complementar (DNAC) foi sintetizado utilizando 1 µg de RNA e o Kit ImProm II (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

A análise quantitativa da expressão de RNAm foi realizada por meio do *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) utilizando o sistema de fluorescência SYBR Green (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) para a quantificação dos produtos de amplificação. As condições padrão de PCR consistiram de: 95°C (10 minutos), seguidas por 40 ciclos de 94°C (1 minuto), 58°C (1 minuto) e 72°C (2 minutos), seguidas por uma curva padrão de desnaturação. As sequências dos pares de *primers* para a amplificação específica das citocinas, dos fatores envolvidos na osteoclastogênese e gene de referência (GAPDH) foram designadas com o programa da empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), utilizando a sequência de nucleotídeos presente na base de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/): IL-1α, IL-6, IL-17 e TNF-α, RANK, RANKL, OPG e GAPDH.

As condições de reação de PCR para cada gene de interesse foram otimizadas com relação à concentração de *primers*, ausência da formação de dímeros (*primer dimer*) e eficiência da amplificação do gene alvo. A integridade de cada reação foi confirmada pela presença de um único pico na análise da curva de “*melting*”. Em cada reação foram utilizados 300 nM do *primer* específico, 2,0 µL de DNAC e o Mix SYBR® (SYBR® Select Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O limiar para determinação da positividade da reação de RT-PCR foi determinado com base em controles negativos (ausência de amostra e ausência da enzima Transcriptase Reversa). Para a análise do RNAm, o cálculo para determinação do nível relativo de expressão do gene de interesse foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems User’s Bulletin - P/N 4303859), utilizando como referência a expressão de GAPDH na mesma amostra, utilizando-se do método do “ciclo limiar” (*cycle threshold* - Ct).

A média dos valores de Ct obtidas de duplicatas foi utilizada para o cálculo do nível de expressão gênica, normalizado por um controle interno (GAPDH) e comparado aos valores do gene alvo-controle interno de uma amostra controle para o cálculo do aumento relativo de expressão, por meio da fórmula $2^{-\Delta Ct}$, de acordo com as instruções do fabricante. Os dados obtidos foram expressos em porcentagem de expressão de GAPDH. Foi calculada também, a razão RANKL/OPG.

Quantificação de Endotoxina Bacteriana (LPS) por meio do teste “Limulus Amebocyte Lysate” PYROGENT™–5000

A quantificação da endotoxina bacteriana presente nos mini-implantes, expressa em UE/mL (Unidades de Endotoxina por mililitro), foi efetuada por meio do teste PYROGENT™–5000 (*Limulus Amebocyte Lysate* PYROGENT™–5000 – Lonza Walkersville, MD, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Uma curva padrão com quantidades conhecidas de endotoxina foi utilizada para determinar a concentração de endotoxina nas amostras. Em uma placa de poliestireno de 96 poços apirrogênica (96 Wells Cell Culture Cluster – non pyrogenic – Corning Incorporated – Tewksbury, MA, USA) foram pipetados, em duplicata, 100 µL das soluções preparadas de cada concentração de padrão conhecido (100 UE/mL; 10 UE/mL; 1,0 UE/mL; 0,1 UE/mL; 0,01 UE/mL) e 100 µL de controle negativo (água apirrogênica), também em duplicata. Nos demais poços da placa foram pipetados 100 µL de cada amostra obtida dos mini-implantes em quadruplicata, diluídas em água apirrogênica em uma proporção de 1:50.000, 1:100.000 e 1:500.000, baseada em padronização obtida em estudo piloto prévio.

Dois poços de cada amostra receberam 10 µL de solução contaminada com 10 unidades de endotoxina (1 UE/mL). Posteriormente, nos quatro poços de cada amostra, foram acrescentados 100 µL do reagente *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). A placa foi levada, então, a um leitor de microplacas (ELx808cse, Cambrex, Walkersville, MD, USA) e monitorada ao longo do tempo por meio de um software (WinKQCL V 3.00™, Cambrex, Walkersville, MD, USA), que mede o aumento de turvação (absorbância) na amostra, em um comprimento de onda de 340 nm. Utilizando-se da leitura inicial de cada amostra, o leitor determina o tempo necessário para a absorbância aumentar 0,03 unidades. Este tempo é conhecido como “Tempo de Reação”. O software WinKQCL V 3.00™ determina, então, uma correlação linear do tempo de reação com a respectiva concentração de endotoxina de cada amostra, ajustando automaticamente com a diluição utilizada, sabendo-se que o tempo requerido antes do aparecimento da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente na amostra, ou seja, na presença de uma grande quantidade de endotoxina a reação ocorre rapidamente e na presença de uma pequena quantidade de endotoxina o tempo de reação é aumentado.

Análise Estatística

A análise comparativa da descrição dos pacientes quanto ao sexo e idade e dos mini-implantes quanto ao tempo de permanência na boca foi realizada por meio de teste de comparação de médias para variáveis contínuas ou de proporções (teste de Wald) para variáveis categóricas, levando-se em consideração os indivíduos como conglomerados.

Os resultados obtidos foram analisados por meio do teste não-paramétrico de soma de postos de Wilcoxon, considerando-se os conglomerados (Rosner et al., 2003) e também por meio do teste de Kruskal-Wallis. As análises foram efetuadas utilizando os softwares SAS (Statistical Analysis System) for Windows versão 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

4. RESULTADOS

Um total de 29 mini-implantes foram obtidos de 16 pacientes, sendo 10 sem estabilidade e 19 com estabilidade. A análise descritiva dos dados obtidos dos indivíduos evidenciou que não houve diferença estatística entre os dois grupos quanto à idade e ao sexo. Houve diferença apenas com relação ao tempo médio de permanência na boca ($p=0,0058$ - Tabela 2), onde evidenciou-se que os mini-implantes com estabilidade permaneceram na cavidade bucal por tempo significativamente maior que os sem estabilidade.

Tabela 2: Análise descritiva dos dados referentes aos indivíduos e mini-implantes nos dois grupos (com e sem estabilidade)

	Mini-implantes com estabilidade (n=19)	Mini-implantes sem estabilidade (n=10)	P*
Sexo			
Masculino	52,6%	20,0%	0,1552
Feminino	47,4%	80,0%	
Tempo médio de permanência na boca	23,8 meses (Erro Padrão=5,0)	6,7 meses (Erro Padrão=1,7)	0,0058 [†]
Idade	29,8 anos (Erro Padrão=5,1)	27,9 anos (Erro Padrão=5,1)	0,7830

* p referente ao teste de Wald para variáveis categóricas ou teste de comparação de médias para variáveis contínuas, levando em consideração a dependência dos dados entre os indivíduos

[†] Diferença estatisticamente significativa.

Detecção molecular de micro-organismos por meio da técnica checkerboard DNA-DNA hybridization

Para a análise microbiológica pela técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization* foram utilizados 25 mini-implantes, em função de perdas durante o processamento laboratorial, dos quais 15 eram do grupo com estabilidade e 10 eram do grupo sem estabilidade. A Tabela 3 apresenta a análise descritiva dos dados dos pacientes, a qual indicou, à semelhança do anteriormente descrito, diferença significativa apenas para o tempo de permanência na boca ($p=0,0070$).

Tabela 3: Análise descritiva dos dados referentes aos indivíduos e mini-implantes nos dois grupos (com e sem estabilidade), utilizados para a avaliação microbiológica

	Mini-implantes com estabilidade (n=15)	Mini-implantes sem estabilidade (n=10)	p*
Sexo			
Masculino	60,0%	20,0%	0,0747
Feminino	40,0%	80,0%	
Tempo médio de permanência na boca	26,1 meses (Erro Padrão=5,8)	6,7 meses (Erro Padrão=1,7)	0,0070 [†]
Idade	28,7 anos (Erro Padrão=4,6)	27,9 anos (Erro Padrão=5,1)	0,8956

* p referente ao teste de Wald para variáveis categóricas ou teste de comparação de médias para variáveis contínuas, levando em consideração a dependência dos dados entre os indivíduos

[†] Diferença estatisticamente significativa.

A porcentagem de ocorrência das 40 espécies de micro-organismos dos complexos azul, roxo, amarelo, verde, laranja, vermelho e outras espécies, nos dois grupos, estão representadas na Figura 1.

Figura 1. Porcentagem de ocorrência das 40 espécies de micro-organismos nos mini-implantes com e sem estabilidade.

Todas (100%) as 40 espécies de micro-organismos foram observadas em ambos os grupos, com diferentes porcentagens de ocorrência. No grupo com estabilidade, a porcentagem da maioria das espécies foi maior, com exceção de *A. naeslundii* I e *F. Nucleatun (sp vicentii)*. Não foi possível observar diferença significativa ($p=0,2824$) com relação à porcentagem de ocorrência dos complexos microbianos, quando comparou-se os dois grupos (mini-implantes com e sem estabilidade) (Figuras 2 e 3).

Figura 2- Porcentagem de ocorrência dos complexos microbianos no grupo de mini-implantes com estabilidade.

Figura 3- Porcentagem de ocorrência dos complexos microbianos no grupo de mini-implantes sem estabilidade.

Com relação à análise semi quantitativa (número de células bacterianas), observou-se que o número total de micro-organismos das 40 espécies no grupo de mini-implantes com estabilidade variou de 830.000 a 38.230.000, com mediana de 12.950.000, enquanto que no grupo sem estabilidade variou de 450.000 a 42.750.000, com mediana de

8.490.000. Não foi possível encontrar diferença significativa no número total de micro-organismos entre os dois grupos avaliados ($p=0,75480$).

Considerando as espécies bacterianas isoladamente, apenas *P. micra*, *T. denticola* e *E. saburreum* apresentaram diferença significativa quando comparou-se os dois grupos ($p<0,05$), com menores quantidades de micro-organismos no grupo de mini-implantes sem estabilidade. A Tabela 4 apresenta a comparação entre os dois grupos de mini-implantes para todas as espécies avaliadas.

Tabela 4. Detecção de micro-organismos nos mini-implantes (MI) com estabilidade e sem estabilidade

Micro-organismos	M(Q1-Q3) MI com estabilidade n = 15	M(Q1-Q3) MI sem estabilidade n = 10	Z	p
Complexo azul				
<i>A. naeslundii</i> I	100.000 (0 – 500.000)	500.000 (10.000 – 1.000.000)	0,9863	0,3239
<i>A. gerencseriae</i>	10.000 (0 – 100.000)	0 (0 – 500.000)	-0,0069	0,9945
<i>A. israelii</i>	500.000 (100.000 – 500.000)	500.000 (0 – 500.000)	-0,1552	0,8767
Complexo roxo				
<i>V. parvula</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	0 (0 – 500.000)	-0,9144	0,3605
<i>A. odontolyticus</i> I	500.000 (10.000 – 500.000)	55.000 (0 – 500.000)	-1,4236	0,1546
Complexo amarelo				
<i>S. sanguinis</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	55.000 (0 – 500.000)	-1,5493	0,1213
<i>S. oralis</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	100.000 (0 – 500.000)	-1,1029	0,2701
<i>S. intermedius</i>	500.000 (100.000 – 500.000)	100.000 (0 – 500.000)	-0,3049	0,7604
<i>S. gordonii</i>	10.000 (0 – 500.000)	0 (0 – 500.000)	-0,3024	0,7624
<i>S. mitis</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	300.000 (0 – 500.000)	-0,4891	0,6247
Complexo verde				
<i>A. actinomycetencomytans</i>	0 (0 – 500.000)	0 (0 - 0)	-0,4299	0,6673
<i>C. ochracea</i>	100.000 (100.000 – 500.000)	50.000 (0 – 100.000)	-0,9559	0,3391
<i>C. gingivalis</i>	100.000 (10.000 – 500.000)	0 (0 – 100.000)	-1,0409	0,2979
<i>E. corrodens</i>	10.000 (0 – 100.000)	0 (0 - 0)	-0,7213	0,4708
<i>C. sputigena</i>	500.000 (0 – 1.000.000)	5.000 (0 – 100.000)	-1,1204	0,2625
Complexo laranja				
<i>S. constellatus</i>	10.000 (0 - 500.000)	5.000 (0 – 100.000)	-0,4025	0,6873
<i>E. nodatum</i>	500.000 (100.000 – 500.000)	300.000 (10.000 – 500.000)	-0,0882	0,9298
<i>F. nucleatum</i> (sp <i>vincentii</i>)	100.000 (10.000 – 500.000)	100.000 (100.000 – 500.000)	0,4375	0,6617

Tabela 4. Continuação

Micro-organismos	M(Q1-Q3) MI com estabilidade n = 15	M(Q1-Q3) MI sem estabilidade n = 10	Z	p
<i>F. nucleatum (sp polymorphum)</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	100.000 (0 – 500.000)	-0,2265	0,8208
<i>F. nucleatum (sp nucleatum)</i>	500.000 (0 – 500.000)	50.000 (0 – 500.000)	-0,8046	0,4210
<i>C. rectus</i>	100.000 (0 – 100.000)	0 (0 – 10.000)	-1,7385	0,0821
<i>P. micra</i>	500.000 (500.000 – 1.000.000)	100.000 (0 – 100.000)	-2,2159	0,0267*
<i>P. nigrescens</i>	100.000 (10.000 – 500.000)	50.000 (0 – 500.000)	-1,1087	0,2676
<i>C. showae</i>	100.000 (10.000 – 500.000)	10.000 (0 – 10.000)	-0,8467	0,3972
<i>F. periodonticum</i>	100.000 (0 – 500.000)	0 (0 – 10.000)	-0,9821	0,3261
<i>C. gracilis</i>	100.000 (10.000 – 500.000)	10.000 (0 – 100.000)	-0,3369	0,7362
<i>P. intermedia</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	55.000 (0 – 500.000)	-1,4973	0,1343
Complexo vermelho				
<i>P. gingivalis</i>	500.000 (10.000 – 1.000.000)	500.000 (10.000 – 500.000)	-0,7384	0,4603
<i>T. denticola</i>	500.000 (500.000 – 500.000)	100.000 (0 – 100.000)	-2,7199	0,0065*
<i>T. forsythia</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	5.000 (0 – 500.000)	-1,3922	0,1639
Outras espécies				
<i>T. socranskii</i>	0 (0 – 10.000)	0 (0 – 0)	-0,8784	0,3797
<i>E. saburreum</i>	500.000 (100.000 – 500.000)	10.000 (0 – 100.000)	-1,9712	0,0487*
<i>S. anginosus</i>	100.000 (10.000 – 500.000)	5.000 (0 – 500.000)	-1,1209	0,2623
<i>A. oris (naeslundii II)</i>	500.000 (10.000 – 500.000)	55.000 (0 – 100.000)	-1,2730	0,2030
<i>N. mucosa</i>	1.000.000 (100.000 – 1.000.000)	100.000 (10.000 – 500.000)	-1,6893	0,0912
<i>S. noxia</i>	0 (0 – 100.000)	0 (0 – 0)	-0,3673	0,7134
<i>P. acnes</i>	0 (0 – 10.000)	0 (0 – 0)	-1,3419	0,1796
<i>P. melaninogenica</i>	500.000 (100.000 – 1.000.000)	100.000 (100.000 – 1.000.000)	-1,0475	0,2949
<i>G. morbillorum</i>	500.000 (10.000 – 500.000)	10.000 (10.000 – 100.000)	-0,9525	0,3408
<i>L. buccalis</i>	500.000 (100.000 – 500.000)	100.000 (0 – 500.000)	-0,5614	0,5746

* p estatisticamente significativo para o teste de soma de postos de Wilcoxon considerando a dependência dos dados entre os indivíduos
 Z: valor da estatística Z para o teste de soma de postos de Wilcoxon considerando a dependência dos dados entre os indivíduos
 Os valores estão expressos em M(Q1-Q3), onde M é a mediana, Q1 é o primeiro quartil e Q3 é o terceiro quartil.

Quando os micro-organismos foram avaliados por complexos, também não foi possível observar diferença significativa entre eles, com relação à análise semi-quantitativa (Tabela 5).

Tabela 5. Detecção de micro-organismos nos mini-implantes (MI) com e sem estabilidade, por complexos

Micro-organismos	M(Q1-Q3) MI com estabilidade n = 15	M(Q1-Q3) MI sem estabilidade n = 10	Z	p*
Complexo azul	610.000 (210.000 – 1.100.000)	1.050.000 (100.000 – 1.500.000)	0,6549	0,5125
Complexo roxo	1.000.000 (500.000 – 1.500.000)	100.000 (0 – 1.000.000)	-1,2923	0,1962
Complexo amarelo	1.300.000 (700.000 – 3.500.000)	705.000 (100.000 – 2.100.000)	-1,2531	0,2102
Complexo verde	620.000 (120.000 – 2.600.000)	100.000 (0 – 700.000)	-1,2803	0,2004
Complexo laranja	3.340.000 (1.030.000 – 6.700.000)	1.570.000 (200.000 – 3.210.000)	-0,5771	0,5639
Complexo vermelho	1.500.000 (1.100.000 – 2.000.000)	600.000 (210.000 – 1.100.000)	-1,8198	0,0688
Outras espécies	2.710.000 (1.500.000 – 4.210.000)	1.165.000 (300.000 – 2.200.000)	-1,3123	0,1894

* valor de p para o teste de soma de postos de Wilcoxon considerando a dependência dos dados entre os indivíduos

Z: valor da estatística Z para o teste de soma de postos de Wilcoxon considerando a dependência dos dados entre os indivíduos
Os valores estão expressos em M(Q1-Q3), onde M é a mediana, Q1 é o primeiro quartil e Q3 é o terceiro quartil.

Quantificação de Endotoxina Bacteriana (LPS) por meio do teste “Limulus Amebocyte Lysate PYROGENT™-5000”

Dos 29 mini-implantes inicialmente selecionados, 23 foram utilizados para a quantificação de endotoxina em função de perdas durante o processamento laboratorial, dos quais 14 eram do grupo com estabilidade e 9 eram do grupo sem estabilidade. A Tabela 6 apresenta a análise descritiva dos dados dos indivíduos, evidenciando diferença apenas para o tempo médio de permanência na boca dos mini-implantes ($p=0,0075$).

Tabela 6: Análise descritiva dos dados referentes aos indivíduos e mini-implantes nos dois grupos (com e sem estabilidade), utilizados para a quantificação de endotoxina bacteriana

	Mini-implantes com estabilidade (n=14)	Mini-implantes sem estabilidade (n=9)	p*
Sexo			
Masculino	57,1%	11,1%	0,0537
Feminino	42,9%	88,9%	
Tempo médio de permanência na boca	23,1 meses (Erro Padrão=4,9)	6,7 meses (Erro Padrão=1,7)	0,0075 [†]
Idade	26,2 anos (Erro Padrão=3,9)	27,2 anos (Erro Padrão=5,7)	0,8682

* p referente ao teste de Wald para variáveis categóricas ou teste de comparação de médias para variáveis contínuas, levando em consideração a dependência dos dados entre os indivíduos

[†] Diferença estatisticamente significativa.

A quantificação de endotoxina para o grupo de mini-implantes com estabilidade evidenciou valores que variaram de 7.750 UE/mL a 343.000 UE/mL, com mediana de 65.750 UE/mL. Com relação ao grupo de mini-implantes sem estabilidade, os valores variaram de 2.850 UE/mL a 105.000 UE/mL, com mediana de 43.500 UE/mL. Quando os grupos foram comparados, não foi possível encontrar diferença significativa entre eles ($p=0,63613$). A Tabela 7 apresenta a comparação entre os dois grupos.

Tabela 7. Quantificação de endotoxina nos mini-implantes (MI) com estabilidade e sem estabilidade

	M(Q1-Q3) MI com estabilidade n = 14	M(Q1-Q3) MI sem estabilidade n = 9	Z	p*
Unidades de endotoxina (UE)	65.750 (54.000 – 119.000)	43.500 (30.300 – 67.900)	-0,4731	0,6361

* valor de p para o teste de soma de postos de Wilcoxon considerando a dependência dos dados entre os indivíduos

Z: valor da estatística Z para o teste de soma de postos de Wilcoxon considerando a dependência dos dados entre os indivíduos

Os valores estão expressos em M(Q1-Q3), onde M é a mediana, Q1 é o primeiro quartil e Q3 é o terceiro quartil.

Ressalta-se que, no grupo controle adicional de mini-implantes retirados da embalagem original, não utilizados, não foi detectada a presença de endotoxina bacteriana (valores inferiores a 0,01 UE).

Quantificação das citocinas pró-inflamatórias e de proteínas marcadoras da osteoclastogênese pela técnica “RT-PCR”

Para essa análise foram consideradas amostras de gengiva removidas da região ao redor de 18 mini-implantes do total de 29 inicialmente selecionados, em decorrência da necessidade de realização de estudo piloto prévio para adaptação da metodologia e de perdas durante o processamento laboratorial. Das 18 amostras utilizadas, 11 eram do grupo com estabilidade e 7 eram do grupo sem estabilidade. Além disso, foram analisadas as 10 amostras de gengiva normal. A Tabela 8 apresenta a análise descritiva dos dados dos pacientes, onde foi evidenciado, como nas análises anteriores, que o tempo de permanência na boca foi maior para o grupo com estabilidade ($p=0,0116$).

Tabela 8: Análise descritiva dos dados referentes aos indivíduos e mini-implantes nos dois grupos (com e sem estabilidade), utilizados para a quantificação de citocinas e marcadores da osteoclastogênese

	Mini-implantes com estabilidade (n=11)	Mini-implantes sem estabilidade (n=7)	P*
Sexo			
Masculino	45,5%	14,3%	0,2757
Feminino	54,5%	85,7%	
Tempo médio de permanência na boca	29,4 meses (Erro Padrão=6,8)	7,57 meses (Erro Padrão=1,9)	0,0116 [†]
Idade	34,0 anos (Erro Padrão=5,8)	21,7 anos (Erro Parão=4,0)	0,0837

* p referente ao teste de Wald para variáveis categóricas ou teste de comparação de médias para variáveis contínuas, levando em consideração a dependência dos dados entre os indivíduos

[†] Diferença estatisticamente significativa.

Comparando-se os grupos de mini-implantes com e sem estabilidade, com relação às citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6, IL-17 e TNF- α), foi possível identificar diferença significativa apenas para a IL-6 (p=0,0397) (Figura 4), com níveis significativamente superiores para o grupo de mini-implantes sem estabilidade.

Por outro lado, a comparação entre os dois grupos não evidenciou diferença significativa com relação aos marcadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL, OPG) (p>0,05) (Figura 5).

Figura 4 - Quantificação das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-17 e TNF- α , em porcentagem de expressão de GAPDH, na gengiva ao redor dos mini-implantes com e sem estabilidade

* p estatisticamente significante para o teste de soma de postos de Wilcoxon considerando a dependência dos dados entre os indivíduos.

Figura 5 - Quantificação dos mediadores da osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG, em porcentagem de expressão de GAPDH, na gengiva ao redor dos mini-implantes com e sem estabilidade.

Em geral, as amostras de gengiva normal apresentaram menores valores numéricos de citocinas pró-inflamatórias e de marcadores da osteoclastogênese, quando comparados aos valores obtidos para os mini-implantes com e sem estabilidade, com exceção da IL-6, cujos valores foram menores nos mini-implantes com estabilidade (Tabela 9).

Tabela 9. Quantificação de citocinas e mediadores da osteoclastogênese em porcentagem de expressão de GAPDH na gengiva ao redor dos mini-implantes (MI) com estabilidade, sem estabilidade e gengiva sadia

Citocinas e Mediadores da osteoclastogênese	M(Q1-Q3) MI sem estabilidade n = 7	M(Q1-Q3) MI com estabilidade n = 11	M(Q1-Q3) Gengiva sadia n = 4
IL-1α	4,8483 (0,6349 - 11,3105)	2,6817 (1,6135 - 4,8826)	1,5555 (0,2279 - 4,4391)
IL-6	0,1761 (0,0643 - 0,3153)	0,0486 (0,0248 - 0,0587)	0,1286 (0,0967 - 0,3534)
IL-17	0,0033 (0,0013 - 0,0339)	0,0029 (0,0021 - 0,0138)	0,0036 (0,0005 - 0,0087)
TNF-α	0,0299 (0,0204 - 0,1030)	0,0376 (0,0129 - 0,0441)	0,0173 (0,0079 - 0,0366)
RANK	0,1952 (0,1181 - 0,2385)	0,2454 (0,0853 - 0,3107)	0,0902 (0,0489 - 0,1129)
RANKL	0,0759 (0,0588 - 0,1968)	0,0564 (0,0332 - 0,1331)	0,0692 (0,0239 - 0,1023)
OPG	0,6449 (0,2618 - 0,8846)	0,2634 (0,1791 - 0,3985)	0,0989 (0,0299 - 0,1628)

Os valores das medianas obtidos durante o cálculo da razão RANKL/OPG foram 0,2836 para o grupo de mini-implantes com estabilidade, 0,2278 para o grupo de mini-implantes sem estabilidade e 0,6319 para as amostras de gengiva normal, sem diferença significativa entre os grupos ($p=0,0705$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Da metodologia

O presente estudo é classificado como um estudo observacional, do tipo caso-controle, onde se tem um grupo com um desfecho (que apresenta a doença) e outro grupo sem o desfecho (que não apresenta a doença). O desfecho, neste caso, é representado pela perda da estabilidade (mini-implantes sem estabilidade), que foi comparado a outro grupo sem o desfecho (mini-implantes com estabilidade), onde os mini-implantes exerceram sua função até o final do movimento desejado. Neste tipo de estudo, os fatores de confusão devem ser levados em consideração durante a análise estatística e, para isto, devem ter um número elevado de indivíduos. Este fato representa uma desvantagem em relação aos estudos experimentais, onde os fatores de confusão são aleatoriamente distribuídos entre os grupos (Kleinbaum et al., 1982).

Tendo em vista que o número de indivíduos no presente estudo era relativamente reduzido, os fatores de confusão não puderam ser controlados durante a análise estatística. No entanto, sabendo-se das limitações que os estudos observacionais apresentam, procuramos minimizar os fatores de confusão durante o delineamento experimental e a execução do estudo. Além disso, uma vez que existiam dados dependentes (conglomerados), pois em alguns pacientes foram removidos mais de um mini-implante, estes foram levados em consideração durante a análise estatística.

Como o tipo de material do mini-implante pode influenciar a técnica de instalação (Reynders et al., 2009) e seu desenho é importante para a estabilidade primária (Wilmes et al., 2008; Ruellas, 2013), procuramos minimizar os fatores de confusão relacionados selecionando mini-implantes da mesma marca comercial, fabricados com uma liga de titânio, de forma cônica, perfil transmucoso baixo ou médio, cabeça hexagonal para a chave de inserção e com orifício central para a passagem de fio de amarrilho (Neodent, Curitiba, PR, Brasil). Considerando que o diâmetro também é um dos fatores relacionados com a estabilidade primária (Ruellas, 2013), foram selecionados mini-implantes com o mesmo diâmetro (1,6mm). Embora os mini-implantes com diâmetros menores sejam de posicionamento mais fácil entre as raízes, diâmetros muito reduzidos aumentam o risco de

fratura (Reynders et al., 2009; Elias et al., 2011). Miyawaki et al. (2003) compararam mini-implantes com diâmetros de 1,0, 1,5 e 2,3 mm de diâmetro, recomendando a utilização de mini-implantes com mais de 1mm, por apresentarem maior estabilidade, sendo os de 1,5 mm preferíveis aos de 2,3 mm por terem maior facilidade de instalação nos espaços interradiculares.

O comprimento, outra variável relacionada ao mini-implante, que é determinado pela profundidade e qualidade do osso, angulação do parafuso, espessura da mucosa e estruturas adjacentes, foi correlacionado com o sucesso em alguns estudos e, quanto maior o comprimento, maior foi a taxa de sucesso (Tseng et al., 2006; Chen et al., 2006, Chen et al., 2009). Em contrapartida, maiores comprimentos foram relacionados com maiores torques de inserção (Pithon et al., 2013). Adicionalmente, a profundidade de inserção, em si, é extremamente importante para a estabilidade primária do mini-implante (Tseng et al., 2006; Pan et al., 2012), que deve ter um comprimento que permita uma profundidade de inserção adequada. De acordo com Tseng et al. (2006), o comprimento deve ser de 6 mm, no mínimo. No presente estudo, foram utilizados mini-implantes com 7,0 e 9,0 mm de comprimento, dependendo da localização do mesmo. Como regra geral, os mini-implantes menores foram utilizados nas regiões anteriores em ambos os arcos, devido à menor espessura entre as tábuas ósseas, e os maiores foram utilizados nas regiões posteriores, tanto na maxila quanto na mandíbula e também no palato.

Com relação aos fatores relacionados aos pacientes, nossos resultados estão de acordo com autores que não observaram relação entre sexo e taxa de sucesso (Motoyoshi et al., 2006; Park et al., 2006; Moon et al., 2008).

No presente estudo também não foi possível identificar diferença estatisticamente significativa com relação à idade entre os grupos, apesar da ampla faixa etária entre os pacientes. Apesar de alguns autores acreditarem que a taxa de sucesso é menor em adolescentes, em função do alto metabolismo ósseo, sugerindo aguardar um período de 3 meses previamente à aplicação de carga (Motoyoshi et al., 2007), outros não encontraram relação entre a idade e a aplicação de carga imediata com a taxa de sucesso destes dispositivos (Miyawaki et al., 2003), o que está de acordo com os resultados do presente estudo. Adicionalmente, de acordo com Türköz et al. (2011), mini-implantes autoperfurantes, semelhantes aos utilizados no presente estudo, apresentaram elevadas

taxas de sucesso em adolescentes, logo após a instalação e aplicação de força durante 1 mês.

Condições de saúde geral e dentária, como osteoporose, osteopenia, diabetes, hiperparatireoidismo e doenças periodontais também já foram relatadas na literatura como fatores que interferem no sucesso dos mini-implantes (Gapski et al., 2003; Mengel et al., 2007). No entanto, no presente estudo, de acordo com os critérios de inclusão, os pacientes deveriam ter bom estado de saúde geral e dentária e não deveriam ter feito uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos 3 meses anteriores à remoção do parafuso para serem incluídos no estudo.

Com relação aos fatores relacionados à localização dos mini-implantes, ou seja, às características do tecido ósseo e do tecido mole, Marquezan et al. (2012) confirmaram a importância da densidade da cortical óssea na estabilidade primária dos mini-implantes. Apesar de estudos prévios relatarem características anatômicas distintas entre a mandíbula e maxila, com relação à densidade óssea e à espessura da cortical (Miyawaki et al., 2003; Chen et al., 2007; Chen et al., 2008a), todos os mini-implantes apresentaram estabilidade primária adequada em nosso estudo. A quantidade de gengiva inserida, por sua vez, é importante tanto para a estabilidade primária, quanto para a estabilidade secundária (Cheng et al., 2004; Park et al., 2006; Chen et al., 2007; Chen et al., 2008a; Topouzelis e Tsaousoglou, 2012). A fim de minimizar os fatores de confusão, no presente estudo todos os mini-implantes foram localizados em gengiva inserida, independente do arco.

Considerando os fatores relacionados à cirurgia, apesar de estudos relatarem que os mini-implantes autoperfurantes, os mesmos por nós utilizados, necessitam de um maior torque de inserção (Tachibana et al., 2012), não existe na literatura evidência científica que determine níveis específicos de torque máximo de inserção (Reynders et al., 2012). Apesar de acreditar-se que valores ideais estejam entre 5 - 10 Ncm e que torques maiores que 10 Ncm possam aumentar o nível de stress, necrose e isquemia local, além de aumentar o risco de fraturas aumentando, consequentemente, o risco de falha (Motoyoshi et al., 2006; Motoyoshi et al., 2007; Chen et al., 2008a; Lee et al., 2010; Tachibana et al., 2012), Chaddad et al. (2008) encontraram maiores taxas de sucesso com torque maiores que 15 Ncm. No entanto, no presente estudo não foi efetuado o controle do torque de inserção, que deve ser considerado em futuros estudos, apesar de fatores como operador e técnica cirúrgica terem sido padronizados.

Os mini-implantes que utilizamos eram autoperfurantes. Concordamos com Ruellas (2013) que afirmou que pela facilidade da técnica de instalação, a tendência é dar preferência a este tipo de mini-implante. Adicionalmente, de acordo com Türköz et al. (2011), estes apresentam as maiores taxas de sucesso.

Com relação aos fatores relacionados à mecânica ortodôntica, fatores como o início de aplicação e a magnitude da força foram controlados no presente estudo, uma vez que todos os mini-implantes foram submetidos à aplicação de carga imediata leve. De acordo com Chen et al. (2009), em revisão sistemática da literatura, não é necessário esperar um período de tempo para a aplicação de carga nos mini-implantes. Acredita-se que a carga imediata não ocasione a formação de um tecido cicatricial ao redor do parafuso, permitindo um maior contato da superfície do implante com o osso, promovendo o aumento da estabilidade primária (Chen et al., 2008). Além disso, a aplicação de carga imediata com forças leves não afeta o padrão de cicatrização do osso (Luzi et al., 2009; Serra et al., 2008 e Serra et al., 2010). No entanto, no presente estudo, outros fatores como o tipo de força, duração, direção da força aplicada e a mecânica variaram de acordo com a necessidade do tratamento de cada paciente. Também devemos considerar que o operador (ortodontista) não foi o mesmo, já que os pacientes estavam em tratamento na clínica do Curso de Especialização em Ortodontia desta Faculdade, atendidos pelos alunos do referido Curso, o que certamente teve alguma influência nos dados obtidos.

Dentre os fatores relacionados à higiene dos mini-implantes está o controle da peri-implantite. Antibioticoterapia profilática, bochechos com antissépticos bucais, incluindo a clorexidina e reforço da higiene bucal são fatores considerados na literatura para a manutenção dos mini-implantes (Melsen, 2005; Antoszewska et al., 2009; Motoyoshi et al., 2009; Motoyoshi et al., 2010; Freitas et al., 2012; Tortamano et al., 2012; Ruellas, 2013). No presente estudo, no pós-cirúrgico os paciente receberam reforço de higiene bucal e foram orientados a fazer bochechos com o antisséptico bucal, uma vez ao dia, durante a utilização dos mini-implantes. Ressalta-se que o princípio ativo do antisséptico bucal empregado não foi padronizado, uma vez que foram incluídos no estudo indivíduos que haviam iniciado o tratamento com mini-implantes previamente ao delineamento do estudo. No entanto, em decorrência do tempo prolongado de tratamento e da dependência da colaboração por parte do paciente, que pode variar de acordo com a idade e o estímulo, este pode também ser considerado um fator de confusão para os resultados no presente estudo. Deve-se

ressaltar que, do ponto de vista clínico, não foram observadas alterações inflamatórias significativas no tecido gengival, ao redor dos mini-implantes de ambos os grupos, durante todo o período experimental.

Dos resultados da detecção molecular de micro-organismos

De acordo com Freitas et al. (2012), os cuidados com a higiene bucal são considerados fatores críticos para sucesso dos mini-implantes e a inflamação ao redor dos mesmos pode contribuir para a perda da sua estabilidade. Embora a inflamação crônica, causada pela retenção do biofilme bacteriano, venha sendo relatada na literatura como causadora da mobilidade e perda de mini-implantes (Miyawaki et al., 2003; Cheng et al., 2004; Park et al., 2006; Kuroda et al., 2007; Chen et al., 2008a; Apel et al., 2009), há poucos estudos na literatura específica que avaliaram a contaminação microbiana ao redor de mini-implantes utilizados como dispositivos de ancoragem temporária (Apel et al., 2009; Freitas et al., 2012; Tortamano et al., 2012).

Sabe-se que os micro-organismos podem produzir substâncias nocivas aos tecidos e promover inflamação e reabsorção óssea, sugerindo que possam ser uma das possíveis causas da perda dos mini-implantes. Após a instalação, forma-se um sulco gengival ao redor do perfil transmucoso, que fica em contato com a gengiva, constituindo um novo sítio para a colonização microbiana (Apel et al., 2009). Esta região está em contato com os tecidos adjacentes e é de difícil acesso, dificultando o controle mecânico do biofilme favorecendo, dessa forma, a colonização microbiana, que pode comprometer a longevidade desses dispositivos na cavidade bucal (Apel et al., 2009; Wu et al., 2009; Topouzelis e Tsaousoglou, 2012). Associado a isto, estudos na área da implantodontia, com implantes protéticos, mostraram que a microbiota relacionada à peri-implantite que pode levar ao insucesso é semelhante àquela encontrada na periodontite (Pye et al., 2009; Mombelli e Décaillot, 2011; Sato et al., 2011; Charalampakis et al., 2012; Sangeeta, 2013).

Estudos prévios em mini-implantes (Apel et al., 2009; Freitas et al., 2012; Tortamano et al., 2012) identificaram a presença de micro-organismos periodontopatogênicos no sulco ou na superfície desses dispositivos, por meio de técnicas de cultura microbiana, PCR e *Microarray*. Baseado nessas informações, o presente estudo

teve como objetivo avaliar a contaminação da superfície de mini-implantes por meio da técnica de biologia molecular *checkerboard DNA-DNA hybridization*, uma vez que esta técnica permite detectar, de uma só vez, a presença de 40 espécies de micro-organismos, incluindo espécies associadas ou não à doença periodontal. Em Ortodontia, esta técnica foi utilizada para avaliar a contaminação em bráquetes metálicos e cerâmicos (Anhoury et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2011a, Nelson-Filho et al., 2011b; Andrucioi et al., 2012; Nelson-Filho et al., 2012) e a microbiota subgengival em pacientes sob tratamento ortodôntico (Costa et al., 2010; Kim et al., 2010).

Observamos em nosso estudo que a grande maioria das espécies apresentou maior porcentagem de ocorrência no grupo de mini-implantes com estabilidade, com exceção de *A. naeslundii* I, pertencente ao complexo azul, não relacionada com doença específica, e *F. nucleatum* (*sp. vincentii*), pertencente ao complexo laranja, bactéria periodontopatogênica. Observamos também que no grupo de mini-implantes com estabilidade, os complexos mais frequentes foram o complexo laranja e o grupo de “outras bactérias”, seguido do amarelo, verde, vermelho, e os dois menos frequentes foram os azul e roxo, nesta ordem. No grupo de mini implantes sem estabilidade, os complexos mais frequentes também foram os complexos laranja e o grupo de “outras bactérias”, seguido dos complexos amarelo, vermelho, azul, roxo e verde. Não houve diferença na distribuição da frequência dos complexos entre os grupos.

De acordo com o estudo de Apel et al. (2009), que avaliaram a contaminação por 20 espécies de bactérias no sulco ao redor de 4 mini-implantes bem sucedidos e em 8 que falharam, por meio da técnica de PCR em associação com *Microarray*, *A. odontolyticus* e *V. parvula* (ambas do complexo roxo) e *S. gordonii* e *S. mitis* (ambas do complexo amarelo) foram encontrados em 100% das amostras para ambos os grupos. *S. constellatus* (complexo laranja), *P. gingivalis* (complexo vermelho) e *A. actinomycetenumcomytans* (complexo verde) não foram identificadas, também em ambos os grupos, diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, onde todas as 40 espécies de micro-organismos avaliadas foram detectadas em ambos os grupos (com e sem estabilidade). *E. nodatum* (complexo laranja) e *T. denticola* (complexo vermelho) foram as espécies que tiveram uma prevalência que mais se assemelharam entre os dois estudos. Apesar das diferenças de metodologia, Apel et al. (2009) também não observaram diferenças na quantidade total de micro-organismos e na composição microbiana entre os grupos (mini-implantes bem sucedidos e

que falharam) e não foram capazes de identificar uma microbiota agressiva específica nos mini-implantes que falharam.

Em 2012, Tortamano et al. avaliaram a presença de 3 bactérias periodontopatogênicas na superfície de 15 mini-implantes sem estabilidade e 16 com estabilidade, por meio da técnica de PCR. Relataram a presença de *P. intermedia* em 100% das amostras em ambos os grupos. As outras duas espécies avaliadas, *A. actinomycetencomytans* e *P. gingivalis* foram encontradas em maiores proporções no grupo de mini-implantes sem mobilidade (31,3% e 13,3% / 37,4% e 33,3%, respectivamente). No presente estudo, *P. intermedia* também estava presente em uma proporção elevada, em ambos os grupos (86,7% e 70%). A distribuição de *A. actinomycetencomytans* foi semelhante ao estudo anterior (40% e 10%) e *P. gingivalis* estava presente em maiores proporções no presente estudo, no entanto em porcentagens bem próximas nos dois grupos (86,7% e 80% nos grupos sem e com mobilidade). O estudo de Tortamano et al. (2012) apresenta grandes similaridades com os resultados do presente estudo, conduzindo à observação de maior porcentagem de micro-organismos no grupo de mini-implantes sem mobilidade, sem associação entre micro-organismos periodontopatogênicos e perda de estabilidade. Adicionalmente, concordamos com Tortamano et al. (2012) que afirmaram que a perda de estabilidade pode ocorrer a qualquer momento, durante o tratamento ortodôntico.

Cabe ressaltar que os estudos de Apel et al., (2009) e Tortamano et al. (2012) não efetuaram avaliações semi-quantitativas de cada um dos micro-organismos avaliados, dificultando a comparação com os resultados do presente estudo. A análise semi-quantitativa dos micro-organismos por nós efetuada mostrou diferença significativa apenas para *P. micra*, *T. denticola* e *E. saburreum* ($p < 0,05$), pertencentes aos complexos laranja, vermelho e “outras bactérias”, respectivamente, com maiores quantidades no grupo de mini-implantes com estabilidade.

De acordo com Lindhe e Meyle (2008), a inflamação ao redor de implantes protéticos, em decorrência da má higienização, que pode ser responsável pela peri-implantite, inicia-se no tecido mole e se estende lentamente através do implante, provocando a mobilidade e, conseqüentemente, a sua perda. Uma vez que a progressão da peri-implantite e da periodontite crônica geralmente é lenta e pode levar vários anos, a inflamação ao redor dos mini-implantes pode não ser um fator tão relevante na determinação do sucesso ou insucesso, considerando o curto período que estes dispositivos

são mantidos na cavidade bucal. Nossos resultados são concordantes com os de Apel et al. (2009) e de Tortamano et al. (2012) que não observaram diferenças na detecção de micro-organismos em mini-implantes com e sem estabilidade. Concordamos também com esses autores quando afirmaram que, uma vez que a falta de estabilidade primária pode ser responsável por falhas precoces para implantes protéticos, esta também pode ser a causa responsável pela perda precoce dos mini-implantes, não sendo a contaminação bacteriana determinante nesse processo.

Possivelmente estes resultados estejam relacionados com o maior tempo que os mini-implantes com estabilidade permaneceram na boca, comparado aos mini-implantes sem estabilidade. Mais estudos, do tipo experimento controlado, são necessários para avaliar como a microbiota é estabelecida nos dois casos.

Dos resultados da quantificação das citocinas pró-inflamatórias e de proteínas marcadoras da osteoclastogênese

A resposta imunológica no organismo é regulada por um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. Estes mediadores são também fatores reguladores chave da diferenciação e ativação de osteoclastos e osteoblastos, que modulam a osteoclastogênese e mantem a homeostase do tecido ósseo, principalmente quando este é ativado por agentes agressores (Güncü et al., 2012; Morra et al., 2012). A instalação de implantes protéticos promove a ativação deste sistema, estimulando o aparecimento de uma cascata de reações inflamatórias e dos mecanismos de cicatrização de feridas. Além disso, o implante estimula a produção de citocinas e quimiocinas, produzidas por células inflamatórias em contato com a superfície do implante, que contribuem para o estabelecimento de um ambiente bioquímico específico (Antoszewska et al., 2010; Morra et al., 2012). Com o aumento da colonização microbiana nos implantes protéticos, após instalação na cavidade bucal, há um aumento da resposta inflamatória e imune do hospedeiro nos tecidos periodontais ao redor destes implantes, resultando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Güncü et al., 2012). A expressão dessas citocinas pró-inflamatórias e fatores relacionados com a osteoclastogênese desempenham um papel importante no desenvolvimento e na severidade da peri-implantite (Duarte et al., 2009;

Maximo et al., 2009; Severino et al., 2011). Em função da escassez de trabalhos publicados não se sabe se, de forma análoga aos implantes protéticos, essas citocinas e mediadores poderiam conduzir ao desenvolvimento de peri-implantite também ao redor dos mini-implantes.

Considerando que apenas dois estudos avaliaram a expressão de algumas citocinas como a IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8 no fluido do sulco gengival ao redor de mini-implantes (Sari e Uçar, 2007; Hamamci et al., 2012) em resposta à movimentação ortodôntica e que não existem estudos na literatura que avaliaram citocinas pró-inflamatórias e mediadores da osteoclastogênese em mini-implantes com e sem estabilidade, no presente estudo quantificou-se a expressão das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-17, TNF- α e dos mediadores da osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG em amostras de gengiva obtidas da região ao redor de mini-implantes, a fim de avaliar se a inflamação nos tecidos gengivais e a reabsorção óssea poderiam ser fatores relevantes nos casos de falha.

A família da IL-1 (IL-1RN, IL-1 α e IL-1 β) é produzida principalmente por macrófagos e é, em grande parte, responsável por iniciar a cascata da resposta inflamatória. A IL-1 é um ativador primário de outras citocinas quimiotáticas, bem como da expressão de moléculas de adesão que facilitam a migração de leucócitos para os tecidos. É também um dos maiores estimuladores da reabsorção óssea, capaz de aumentar a destruição tecidual na periodontite (Hamdy et al., 2011). Estudos mostram que pacientes que tem no genótipo a combinação dos genes alelos para a IL-1 α e IL-1 β são mais suscetíveis a uma maior destruição tecidual nos casos de periodontite e peri-implantite (Hamdy et al., 2011), indicando que elas atuam de forma semelhante.

No presente estudo foi avaliada a expressão da IL-1 α no tecido gengival ao redor dos mini-implantes, não sendo possível observar diferença significativa entre os grupos com e sem estabilidade. Güncü et al. (2012) avaliaram a expressão de IL-1 β no fluido do sulco ao redor de implantes protéticos com e sem peri-implantite, por meio do teste imuno enzimático (ELISA) e encontraram níveis de IL-1 β significativamente maiores no grupo com peri-implantite. Apesar de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa para a IL-1 α nas amostras de gengiva dos dois grupos no presente estudo, o grupo de mini-implantes sem estabilidade apresentou valores numéricos maiores desta citocina, em relação ao grupo com estabilidade e ao grupo de gengiva sadia.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por monócitos, células endoteliais e fibroblastos. Juntamente com a IL-1 β e o TNF- α , tem a capacidade de potencializar a reabsorção óssea. Sua produção encontra-se aumentada em macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, em pacientes com periodontite (Venza et al., 2010) e com peri-implantite (Severino et al., 2011).

No presente estudo foi possível observar diferença nos níveis de IL-6, após comparação dos dois grupos, com níveis estatisticamente superiores nos mini-implantes sem estabilidade, evidenciando que essa citocina pró-inflamatória pode exercer papel importante na perda da estabilidade de mini-implantes. Severino et al. (2011) avaliaram a expressão de citocinas no fluido crevicular em pacientes com peri-implantite e com implantes protéticos em condições de normalidade, por meio de ensaio imuno enzimático (ELISA) e também encontraram maiores concentrações de IL-6 no grupo de implantes com peri-implantite, apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa, o que sugere que esta citocina pode interferir no processo de inflamação e reabsorção óssea local. Estudo envolvendo biópsias de gengiva ao redor de implantes protéticos com peri-implantite também evidenciaram valores significativamente maiores desta citocina em pacientes diabéticos (Venza et al., 2010).

Recentemente, foi identificada uma linhagem distinta de células T, conhecida por Th 17, que desempenha funções importantes na ativação de neutrófilos e na imunidade contra bactérias. A IL-17, também conhecida por IL-17A, é a citocina produzida por estas células (Stockinger e Veldhoen, 2007) e também por células imunitárias do sistema imune inato (Cua et al., 2010). Sabe-se que está envolvida na resposta inflamatória e imune por meio da regulação de vários mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-6, IL-1 β e IL-8, quimiocinas e moléculas de adesão (Park e Lee, 2010; Toh et al., 2010) e induz a ativação de osteoclastos (Sato et al., 2006). Está envolvida na patogênese de várias doenças inflamatórias, inclusive na periodontite (Cardoso et al., 2009) e peri-implantite (Severino et al., 2011).

Severino et al. (2011) também avaliaram a expressão de IL-17 no fluido crevicular em pacientes com peri-implantite e com implantes protéticos em condições de normalidade, observando maiores quantidades no grupo de pacientes com peri-implantite. Por outro lado, no presente estudo, foram encontrados valores semelhantes para os dois grupos (mini-implantes com e sem estabilidade). De acordo com Sato et al. (2006), apesar de

atuar na ativação de osteoclastos, esta citocina também atua na regulação de neutrófilos, que exercem uma função bem caracterizada no controle da infecção periodontal (Yu et al., 2007) podendo justificar, dessa forma, as quantidades estatisticamente semelhantes desta citocina nos dois grupos de mini-implantes.

O TNF- α é uma citocina produzida por monócitos, macrófagos e células T e é induzida por patógenos e endotoxinas (Kitauro et al., 2013). Exerce um papel fundamental no metabolismo ósseo, atuando diretamente no aumento da expressão de RANK em macrófagos ou aumentando a formação de osteoclastos indiretamente, por meio do aumento da expressão de RANKL em células do estroma (Kitauro et al., 2013). De acordo com Duarte et al. (2009), é um marcador sensível da perda óssea alveolar observada nos casos de periodontite e na peri-implantite. Estudo semelhante ao nosso avaliou a expressão de TNF- α em locais com diferentes graus de inflamação no tecido gengival ao redor de implantes dentários (Duarte et al., 2009), por meio de PCR em tempo real. Foi evidenciada maior expressão de TNF- α nas amostras do grupo com peri-implantite severa, seguido dos grupos com peri-implantite inicial e mucosite, que não apresentaram diferença entre si. Os valores mais baixos foram encontrados no grupo de implantes em condições de normalidade. No entanto, não foi possível identificar diferença significativa entre os grupos para o TNF- α no presente estudo. Isto pode ter ocorrido porque no estudo de Duarte et al. (2009), os grupos eram bem definidos (implantes em condições de normalidade, com mucosite, com peri-implantite inicial e peri-implantite severa), diferentemente do nosso, onde muitas vezes pudemos observar clinicamente algum grau de inflamação, mesmo nos mini-implantes estáveis.

O RANK (ativador do receptor do fator nuclear kappa β), o RANKL (ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa β) e a OPG (osteoprotegerina), moléculas pertencentes à superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF), são proteínas que regulam a osteoclastogênese (Güncü et al., 2012). O RANK é expresso em macrófagos e células precursoras dos osteoclastos, osteoclastos maduros, células dendríticas, fibroblastos, células T e B, enquanto que o RANKL é expresso em osteoblastos e atua na formação e ativação de osteoclastos ligando-se ao RANK. A OPG, por sua vez, é uma glicoproteína produzida por osteoblastos e compete com o RANKL na ligação com o RANK, regulando a osteoclastogênese. Além de suprimir a ativação de osteoclastos, a OPG também atua inibindo os estágios finais da diferenciação e induz a apoptose destas células. Assim, a

atividade osteoclástica é dependente do equilíbrio entre RANK/RANKL/OPG (Duarte et al., 2009; Yamaguchi, 2009; Güncü et al., 2012).

Na área da Ortodontia, tem sido demonstrado que o sistema RANK/RANKL/OPG desempenha um papel importante durante a movimentação ortodôntica. Além disso, a concentração de RANKL aumenta durante esta movimentação e a razão da concentração de RANKL/OPG sofre maior aumento que nos locais controle (Yamaguchi, 2009). Os resultados do presente estudo mostraram que no tecido gengival circundante aos mini-implantes com e sem estabilidade a mediana dos valores de RANKL foi maior no grupo de mini-implantes sem estabilidade, onde ocorreu reabsorção óssea em algum momento (mediana de 0,0759), em comparação ao grupo de mini-implantes com estabilidade (mediana de 0,0564). Adicionalmente, a razão RANKL/OPG no tecido gengival do grupo de mini-implantes com (mediana de 0,2836) e sem (mediana de 0,2278) estabilidade foi inferior à observada na gengiva normal (mediana de 0,6319).

No entanto, estudos adicionais são necessários, a fim de verificar se há aumento dos marcadores da osteoclastogênese em outros locais, incluindo a interface entre os mini-implantes e o tecido ósseo, por meio de técnicas como a imunohistoquímica para a detecção e de imunolocalização das proteínas RANK, RANKL e OPG, como já realizado em outras áreas da Odontologia (Silva et al., 2012), uma vez que o PCR detecta apenas a expressão gênica e não a produção e localização das proteínas em si.

No presente estudo não foram observadas diferenças nas quantidades de RANK, RANKL e OPG para os dois grupos de mini-implantes. Com relação às concentrações de RANKL, nossos resultados estão de acordo com os de Güncü et al. (2012) que também não encontraram diferença significativa no fluido do sulco ao redor de implantes com e sem peri-implantite, no entanto estes autores encontraram maiores valores para o grupo com peri-implantite, o que não ocorreu no presente estudo. Duarte et al. (2009), que também avaliaram RANKL no tecido gengival ao redor de implantes protéticos, observaram aumento progressivo à medida que a severidade da peri-implantite aumentou, relatando, que a expressão de RANKL foi menor nos grupos de implantes em condições de normalidade.

Com relação à OPG, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os dois grupos, esta estava numericamente aumentada no grupo sem estabilidade, quando comparada ao grupo com estabilidade no presente estudo. Analogamente, no estudo de Duarte et al. (2009), foi observada maior quantidade de OPG no grupo com

inflamação mais severa (peri-implantite) em comparação aos casos de mucosite. Güncü et al. (2012) também encontraram valores maiores de OPG no fluido do sulco ao redor de implantes com peri-implantite. Valores menores eram esperados nestes grupos, uma vez que a OPG atua inibindo a osteoclastogênese, competindo com o RANKL na ligação com o RANK. No entanto, no presente estudo, os níveis numéricos de OPG possivelmente estavam aumentados no grupo de mini-implantes sem estabilidade como uma tentativa de controlar a reabsorção óssea ocorrida anteriormente.

Apesar de vários autores sugerirem que a inflamação da mucosa adjacente aos mini-implantes, a peri-implantite e até a perda óssea mediada pela resposta do hospedeiro podem ser determinantes para a falha destes dispositivos (Reynders et al., 2009; Antoszewska et al., 2010; Freitas et al., 2012), não há outros estudos publicados que quantificaram citocinas pró-inflamatórias e mediadores da osteoclastogênese no tecido gengival ao redor de mini-implantes com ou sem perda da estabilidade, impossibilitando a comparação direta com os nossos resultados.

Dos resultados da quantificação de endotoxina bacteriana (LPS)

A endotoxina, presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, é liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana, exercendo uma série de efeitos biológicos importantes, como inflamação e reabsorção óssea (Rietschel e Brade, 1992; Nelson-Filho et al., 2002; Rogers et al., 2007; Silva et al., 2008; Sosroseno et al., 2009; Nelson-Filho et al., 2011b; Morra et al., 2012). Atua como um potente estímulo para uma grande variedade de células, amplificando a resposta imune do hospedeiro, que resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores da osteoclastogênese (Antal-Szalmas et al., 1997; Boyce e Xing, 2008; Harder et al., 2012; Morra et al., 2012).

De acordo com a literatura específica, a endotoxina apresenta alta afinidade para uma diversidade de materiais como metais, sílica, zircônio, polycarbonato, resinas, cerâmicas e, inclusive, afinidade pelo titânio e pelas ligas de titânio (Nelson et al., 1997; Cho et al., 2002; Harder et al., 2012; Lieder et al., 2013). Sabe-se que a endotoxina é responsável pela perda de implantes ortopédicos, inibe a osseointegração inicial e induz a produção de citocinas e a diferenciação de osteoclastos (Bi et al., 2001; Beidelschies et al., 2008;

Greenfield et al., 2010; Bonsignore et al., 2013). Também, exerce um papel importante no desenvolvimento da periodontite crônica, podendo interferir no processo de cicatrização, inflamação e redução da proliferação celular (Preshaw e Taylor, 2011; Lieder et al., 2013).

A presença de endotoxina também é relevante nas patologias envolvendo os implantes dentários, incluindo falhas na osteointegração e ocorrência de peri-implantite (Nouneh et al., 2001; Lieder et al., 2013; Morra et al., 2012). Adicionalmente, estudos recentes *in vitro* confirmaram o efeito da endotoxina na indução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (Messer et al., 2007; Morra et al., 2012) e na reabsorção óssea ao redor de implantes protéticos contaminados em modelo animal (Omar et al., 2011). A nosso ver, analogamente, pode-se inferir que o mesmo poderia ocorrer com os mini-implantes.

Como já salientado, estudos prévios já relataram a contaminação de mini-implantes por bactérias periodontopatogênicas Gram-negativas (Apel et al., 2009; Tortamano et al., 2012). No entanto, não há estudos publicados que avaliaram a contaminação por endotoxina nestes dispositivos, impossibilitando a comparação entre resultados. Sabendo-se da importância do papel da endotoxina em processos como inflamação e reabsorção óssea, no presente estudo quantificamos a endotoxina em mini-implantes com e sem estabilidade, para avaliar se esta poderia ser um fator importante para o sucesso clínico.

Em Ortodontia, dois estudos evidenciaram a presença de endotoxina em bráquetes, confirmando a afinidade desta substância por materiais metálicos, e atribuíram à endotoxina uma provável causa para a inflamação gengival comumente relatada em pacientes durante o tratamento ortodôntico, uma vez que os bráquetes são muitas vezes colocados próximos ao sulco gengival e podem interferir na concentração de endotoxina, predispondo os tecidos periodontais à inflamação (Knoernschild et al., 1999; Nelson-Filho et al., 2011b). De acordo com os resultados do presente estudo, verificamos que os mini-implantes de ambos os grupos estavam altamente contaminados com endotoxina justificando também, em parte, a ocorrência de inflamação nos tecidos circundantes aos mini-implantes clinicamente, já relatada em alguns estudos (Apel et al., 2009; Freitas et al., 2012; Tortamano et al., 2012), uma vez que os mini-implantes estão em íntimo contato com os tecidos periodontais. No entanto, não foi possível identificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos de mini-implantes com e sem estabilidade no presente estudo, embora tenha sido evidenciada uma quantidade ligeiramente maior no grupo com

estabilidade. Isto pode ser justificado pelo fato de que, neste grupo, também houve uma tendência de quantidades maiores de micro-organismos Gram-negativos.

Com relação ao controle adicional, envolvendo mini-implantes retirados da embalagem original, sem uso, observou-se que os mesmos encontravam-se livres de endotoxina ($<0,01$ UE). Como o nível aceitável de endotoxina para produtos médico-hospitalares é $<0,5$ UE (FDA, 2012), pode-se verificar que a endotoxina por nós detectada nos mini-implantes foi originária de bactérias oriundas da cavidade bucal dos pacientes, presentes na superfície destes dispositivos.

Como já salientado, não há estudos publicados quantificando endotoxina em mini-implantes. Por outro lado, Nelson-Filho et al. (2011b) detectaram a presença de quantidades variando de 0,09136 a $> 1,9000$ UE/mL (mediana de 0,6673 EU/mL) na superfície de bráquetes ortodônticos, após 30 dias de permanência na cavidade bucal. Assim, a comparação da quantidade de endotoxina presente na superfície de bráquetes com a quantidade de endotoxina presente na superfície de mini-implantes com (mediana de 65.750 EU/mL) e sem (mediana de 43.500 EU/mL) estabilidade, permite evidenciar quantidades muito maiores de endotoxina em mini-implantes em comparação a bráquetes. Esse fato apresenta relevância clínica, uma vez que a endotoxina em contato com os tecidos moles e mineralizados pode atuar como um potente indutor da inflamação e reabsorção óssea (Nelson-Filho et al., 2002; Rogers et al., 2007; Silva et al., 2008; Sosroseno et al., 2009; Nelson-Filho et al., 2011b), justificando a necessidade de um adequado controle da higienização nos pacientes com mini-implantes. No presente estudo não foram observadas, clinicamente, alterações inflamatórias gengivais significativas nos pacientes de ambos os grupos. Adicionalmente, os menores valores de mediana da quantidade de endotoxina detectadas nos mini-implantes sem estabilidade pode ser explicado pelo menor período de permanência na cavidade bucal (6,7 meses), em comparação aos mini-implantes com estabilidade (23,1 meses).

Pelo exposto pode-se inferir que, na população estudada, a contaminação bacteriana associada à quantidade de endotoxina nos mini-implantes e a quantidade de IL-1 α , IL-17 e TNF- α e de marcadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) nos tecidos gengivais possivelmente não tenham atuado como fatores determinantes para a perda da estabilidade dos mini-implantes. Sugere-se que a presença da citocina pró-inflamatória IL-6 em maiores quantidades no tecido gengival ao redor dos mini-implantes sem estabilidade,

juntamente com fatores relacionados à mecânica ortodôntica, à localização do mini-implante e à técnica cirúrgica possivelmente sejam fatores mais diretamente relacionados à perda da estabilidade, justificando a realização de estudos adicionais, *in vivo*, focalizando esses parâmetros.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos, pudemos concluir que:

- A contaminação microbiana e a quantidade de endotoxina nos mini-implantes, assim como a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-17 e TNF- α e dos marcadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) no tecido gengival não atuaram como fatores determinantes para a perda da estabilidade dos mini-implantes.
- A maior expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 pode estar diretamente relacionada à perda da estabilidade dos mini-implantes.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol 2000* 2002;29:207-22.
2. Andruccioli MCD, Nelson-Filho P, Matsumoto MAN, Saraiva MCP, Feres M, 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;141:24-9.
3. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod* 2002;72:338-43.
4. Antal-Szalmas P, Strijp JA, Weersink AJ, Verhoef J, Van Kessel KP. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 1997;61:721-8.
5. Antoszewska J, Papadopoulos MA, Park HS, Ludwig B. Five-year experience with orthodontic miniscrew implants: a retrospective investigation of factors influencing success rates. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136:158.e1-10.
6. Antoszewska J, Raftowicz-Wójcik K, Kawala B, Matthews-Brzozowska T. Biological factors involved in implant-anchored orthodontics and in prosthetic-implant therapy: a literature review. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010;58:379-83.
7. Apel S, Apel C, Morea C, Tortamano A, Dominguez G C, Conrads G. Microflora associated with successful and failed orthodontic mini-implants. *Clin Oral Impl Res* 2009;20:1186-90.
8. Atack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. *J Periodontol* 1996;67:78-85.
9. Ayon Haro ER, Ukai T, Yokoyama M, Kishimoto T, Yoshinaga Y, Hara Y. Locally administered interferon- γ accelerates lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis independent of immunohistological RANKL upregulation. *J Periodontal Res* 2011;46:361-73.
10. 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.
11. Beidelschies MA, Huang H, McMullen MR, Smith MV, Islam AS, Goldberg VM, Chen X, Nagy LE, Greenfield EM. Stimulation of macrophage TNF α production by orthopaedic wear particles requires activation of the ERK1/2/Egr-1 and NF-kappaB pathways but is independent of p38 and JNK. *J Cell Physiol* 2008;217:652-66.

12. Bi Y, Seabold JM, Kaar SG, Ragab AA, Goldberg VM, Anderson JM, Greenfield EM. Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 2001;16:2082-91.
13. Bonsignore LA, Anderson JR, Lee Z, Goldberg VM, Greenfield EM. Adherent lipopolysaccharide inhibits the osseointegration of orthopedic implants by impairing osteoblast differentiation. *Bone* 2013;52:93-101.
14. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol* 2007;34:370-6.
15. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139-46.
16. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
17. Brêtas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MAN. Effect of 0,4% stannous fluoride gel on mutans streptococci in relation to elastomeric rings and steel ligatures in ortjodontic patients. *J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;127:428-33.
18. Canullo L, Quaranta A, Teles RP. The microbiota associated with implants restored with platform switching: a preliminary report. *J Periodontol* 2010;81:403-11.
19. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:1-6.
20. Chaddad K, Ferreira AF, Geurs N, Reddy MS. Influence of surface characteristics on survival rates of mini-implants. *Angle Orthod* 2008;78:107-13.
21. Charalampakis G, Leonhardt Å, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:1045-54.
22. Chen CH, Chang CS, Hsieh CH, Tseng YC, Shen YS, Huang IY, et al. The use of microimplants in orthodontic anchorage. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:1209-13.
23. Chen YJ, Chang HH, Huang CY, Hung HC, Lai EHH, Yao CCJ. A retrospective analysis of the failure rate of three different orthodontic skeletal anchorage systems. *Clin Oral Impl Res* 2007;18:768-775.
24. Chen YJ, Chang HH, Lin HY, Lai EH, Hung HC & Yao CC. Stability of miniplates and miniscrews used for orthodontic anchorage: experience with 492 temporary anchorage devices. *Clinical Oral Implants Research* 2008a;19:1188-96.

25. Chen Y, Kyung HM, Zhao WT, Yud WJ. Critical factors for the success of orthodontic mini-implants: A systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:284-91.
26. Chen Y, Shin HI, Kyung HM. Biomechanical and histological comparison of self-tapping and self-drilling microimplants in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133:44-50.
27. Cheng SJ, Tseng IY, Lee JJ, Kok SH. A prospective study of the risk factors associated with failure of mini-implants used for orthodontic anchorage. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:100-6.
28. Cho DR, Shanbhag AS, Hong CY, Baran GR, Goldring SR. The role of adsorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release. *J Orthop Res* 2002;20:704-13.
29. Costa A, Raffaini M, Melsen B: Miniscrews as orthodontic anchorage: A preliminary report. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 1998;13:201-9.
30. Costa MR, da Silva VC, Miqui MN, Colombo AP, Cirelli JA. Effects of ultrasonic, electric, and manual toothbrushes on subgingival plaque composition in orthodontically banded molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:229-35.
31. Creekmore TD, Eklund MK. The possibility of skeletal anchorage. *J Clin Orthod* 1983;17:266-9.
32. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:479-89.
33. Deguchi T, Nasu M, Murakami K, Yabuuchi T, Kamioka H, Takano-Yamamoto T. Quantitative evaluation of cortical bone thickness with computed tomographic scanning for orthodontic implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:721.e7-12.
34. Duarte PM, de Mendonca AC, Maximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH Jr. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:514-20.
35. Elias CN; Marins EC ; Ruellas ACO . Resistência mecânica e aplicações clínicas de mini-implantes ortodônticos. *Rev Bras Odont* 2011;68:95-100.
36. FDA. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services, 2012. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/default.htm>>. Acesso em 05/07/2013.

37. Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;54:27-36.
38. Freitas AO, Alviano CS, Alviano DS, Siqueira JF Jr, Nojima LI, Nojima Mda C. Microbial colonization in orthodontic mini-implants. *Braz Dent J* 2012;23:422-7.
39. Freitas MM, da Silva CH, Groisman M, Vidigal GM Jr. Comparative analysis of microorganism species succession on three implant surfaces with different roughness: an in vivo study. *Implant Dent* 2011;20:e14-23.
40. Gapski R, Wang HL, Mascarenhas P, Lang NP. Critical review of immediate implant loading. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:515-27.
41. Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, Kavvadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int J Paediatr Dent* 2009;19:193-200.
42. Graber TM; Vanarsdall RL. *Orthodontics: current principles and techniques*. Philadelphia: Mosby Year Book; 1994.
43. Greenfield EM, Beidelschies MA, Tatro JM, Goldberg VM, Hise AG. Bacterial pathogen-associated molecular patterns stimulate biological activity of orthopaedic wear particles by activating cognate Toll-like receptors. *J Biol Chem* 2010;285:32378-84.
44. Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, Goldberg VM, Nalepka JL, Seabold JM. Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;72:179-85.
45. Güncü GN, Akman AC, Günday S, Yamalık N, Berker E. Effect of inflammation on cytokine levels and bone remodelling markers in peri-implant sulcus fluid: a preliminary report. *Cytokine* 2012;59:313-6.
46. Guray E, Orhan M. "En masse" retraction of maxillary anterior teeth with anterior headgear. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;112:473-9.
47. Hamamci N, Acun Kaya F, Uysal E, Yokuş B. Identification of interleukin 2, 6, and 8 levels around miniscrews during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 2012;34:357-61.
48. Hamdy AA, Ebrahim MA. 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;37:325-34.
49. Harder S, Quabius ES, Ossenkop L, Mehl C, Kern M. Surface contamination of dental implants assessed by gene expression analysis in a whole-blood in vitro assay: a preliminary study. *J Clin Periodontol* 2012;39:987-94.

-
50. Ioannou I, Dimitriadis N, Papadimitriou K, Sakellari D, Vouros I, Konstantinidis A. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. *J Clin Periodontol* 2009;36:132-41.
 51. Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent* 2011;21:353-60.
 52. Janssen KI, Raghoobar GM, Vissink A, Sandham A. A skeletal anchorage in orthodontics – a review of various systems in animal and human studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:75-88.
 53. Javed F, Al-Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* 2011;53:8-12.
 54. Jenkins WM, Papapanou PN. Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents. *Periodontol 2000* 2001;26:16-32.
 55. Kanomi R. Mini-implant for orthodontic anchorage. *J Clin Orthod* 1997;31:763-7.
 56. Kaya B, Arman A, Uçkan S, Yazici AC. Comparison of the zygoma anchorage system with cervical headgear in buccal segment distalization. *Eur J Orthod* 2009;31:417-24.
 57. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstern H. Epidemiologic research: principles and quantitative methods. Toronto: Ed. John Wiley Professional; 1982.
 58. 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;137:223-8.
 59. Kitaura H, 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.
 60. Knoernschild KL, Rogers HM, Lefebvre CA, Fortson WM, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;115:634-9.
 61. Kuroda S, Sugawara Y, Deguchi T, Kyung HM, Takano-Yamamoto T. Clinical use of miniscrew implants as orthodontic anchorage: success rates and postoperative discomfort. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:9-15.
 62. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:244-52.

63. Lee A, Ghaname CB, Braun TM, Sugai JV, Teles RP, Loesche WJ, Kornman KS, Giannobile WV, Kinney JS. Bacterial and Salivary Biomarkers Predict the Gingival Inflammatory Profile. *J Periodontol* 2012;83:79-89.
64. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1995;22:885-90.
65. Lee NK, Baek SH. Effects of the diameter and shape of orthodontic mini-implants on microdamage to the cortical bone. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:e1-8.
66. Leonardo MR, Leonardo RT, Nelson-Filho P, Ferrari PHP. A endotoxina e sua importância na infecção endodôntica. In: Ferrari PHP, Bombana AC. *A infecção endodôntica e sua resolução*. 1 ed. São Paulo: Editora Santos; 2010. 47-62.
67. Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci* 2004;12:93-8.
68. Lessa FC, 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;131:705.e11-7.
69. Leung MT, Rabie AB, Wong RW. Stability of connected mini-implants and miniplates for skeletal anchorage in orthodontics. *Eur J Orthod* 2008;30:483-9.
70. Lieder R, Petersen PH, Sigurjónsson OE. Endotoxins-the Invisible Companion in Biomaterials Research. *Tissue Eng Part B Rev* 2013 Mar 1. [Epub ahead of print]
71. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008;35:282-5.
72. Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC. Characterization of inhibitory effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis in vitro. *Infect Immun* 1995;63:3287-96.
73. Lu Y, Yeh W, Ohashi P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42:145-51.
74. Luzi C, Verna C, Melsen B. Immediate loading of orthodontic mini-implants: a histomorphometric evaluation of tissue reaction. *Eur J Orthod* 2009;31:21-9.
75. Magno AF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Faria G, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133(4 Suppl):S104-9.
76. Marquezan M, Lau TC, Mattos CT, Cunha AC, Nojima LI, Sant'Anna EF, Souza MM, Araújo MT. Bone mineral density. *Angle Orthod* 2012;82:62-6.

77. Marquezan M, Souza MM, Araújo MT, Nojima LI, Nojima Mda C. Is miniscrew primary stability influenced by bone density? *Braz Oral Res* 2011;25:427-32.
78. Maximo MB, de Mendonça AC, Renata Santos V, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:99-108.
79. McDevitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol* 2000;71:156-63.
80. Melsen B. Mini-implants: where are we? *J Clin Orthod* 2005;39:539-47.
81. Mengel R, Behle M, Flores-de-Jacoby L. Osseointegrated implants in subjects treated for generalized aggressive periodontitis: 10-year results of a prospective, long-term cohort study. *J Periodontol* 2007;78:2229-37.
82. Messer RL, Lewis JB, Wataha JC, Adams Y, Tseng WY. Cytokine secretion from monocytes persists differentially after activator removal-One mechanism of long-term biological response to implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;83:58-63.
83. Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T, Takano-Yamamoto T. Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:373-8.
84. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential Expression of RANKL and Osteoprotegerin in Gingival Crevicular Fluid of Patients with Periodontitis. *J Dent Res* 2004;83:166-9.
85. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol* 2011;11:203-13.
86. Moon CH, Lee DG, Lee HS, Im JS, Baek SH. Factors associated with the success rate of orthodontic miniscrews placed in the upper and lower posterior buccal region. *Angle Orthod* 2008;78:101-6.
87. Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Bollati D, Bellanda M. Adherent endotoxin on dental implant surfaces: a reappraisal. *J Oral Implantol* 2012 Nov 12. [Epub ahead of print]
88. Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immuno* 1977;118:362-8.
89. Motoyoshi M, Hirabayashi M, Uemura M, Shimizu N. Recommended placement torque when tightening an orthodontic mini-implant. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:109-14.

90. Motoyoshi M, Inaba M, Ono A, Ueno S, Shimizu N. The effect of cortical bone thickness on the stability of orthodontic mini-implants and on the stress distribution in surrounding bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009;38:13-8.
91. Motoyoshi M, Matsuoka M, Shimizu N. Application of orthodontic mini-implants in adolescents. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:695-9.
92. Motoyoshi M, Uemura M, Ono A, Okazaki K, Shigeeda T, Shimizu N. Factors affecting the long-term stability of orthodontic mini-implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:588.e1-588.e5.
93. Motoyoshi M, Yano S, Tsuruoka T, Shimizu N. Biomechanical effect of abutment on stability of orthodontic mini-implant. A finite element analysis. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:480-5.
94. Nascimento LE, Pithon MM, dos Santos RL, Freitas AO, Alviano DS, Nojima LI, Nojima MC, Ruellas AC. Colonization of *Streptococcus mutans* on esthetic brackets: self-ligating vs conventional. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;143:S72-7.
95. Nelson SK, Knoernschild KL, Robinson FG, Schuster GS. Lipopolysaccharide affinity for titanium implant biomaterials. *J Prosthet Dent* 1997;77:76-82.
96. Nelson-Filho P, Carpio-Horta KO, Andrucioli MC, Feres M, Bezerra da Silva RA, Garcia Paula-Silva FW, Romano FL. Molecular detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* on metallic brackets by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;142:481-6.
97. Nelson-Filho P, Leonardo ML, Silva LAB, Assed S. Radiografic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calciuim hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28:694-6.
98. Nelson-Filho P, Olmedo LY, Andrucioli MCD, Saraiva MCP, Matsumoto MAN, de Queiroz AM, da Silva RA, da Silva LA. 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. *J Dent* 2011a;39:513-7.
99. 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 use of an antimicrobial agent: an in vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011b; 140:e281-e287.
100. Nelun Barfod M, Magnusson K, Lexner MO, Blomqvist S, Dahlén G, Twetman S. Oral microflora in infants delivered vaginally and by caesarean section. *Int J Paediatr Dent* 2011;21:401-6.

101. Nouneh RA, Wataha JC, Hanes PJ, Lockwood PE. Effect of lipopolysaccharide contamination on the attachment of osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy in vitro. *J Oral Implantol* 2001;27:174-9.
102. Novaes AB Jr, Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci* 2012;27:389-95.
103. Omar OM, Granéli C, Ekström K, Karlsson C, Johansson A, Lausmaa J, Wexell CL, Thomsen P. The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation. *Biomaterials* 2011;32:8190-204.
104. Pan CY, Chou ST, Tseng YC, Yang YH, Wu CY, Lan TH, Liu PH, Chang HP. Influence of different implant materials on the primary stability of orthodontic mini-implants. *Kaohsiung J Med Sci* 2012;28:673-8.
105. Park HS, Jeong SH, Kwon OW. Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:18–25.
106. Park SJ, Lee YC. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respir Res* 2010;11:78.
107. Peixoto IT, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, 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;140:51-7.
108. Pithon MM, Figueiredo DS, Oliveira DD. Mechanical evaluation of orthodontic mini-implants of different lengths. *J Oral Maxillofac Surg* 2013;71:479-86.
109. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* 2011;38:60-84.
110. Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect* 2009;72:104–10.
111. Ren L, Leung WK, Darveau RP, Jin L. The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:1950-9.
112. Reynders R, Ronchi L, Bipat S. Mini-implants in orthodontics: A systematic review of the literature. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:564.e1-564.e19.

113. Reynders RA, Ronchi L, Ladu L, van Etten-Jamaludin F, Bipat S. Insertion torque and success of orthodontic mini-implants: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;142:596-614.e5.
114. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992;267:26-33.
115. Rôças IN, Alves FR, Santos AL, Rosado AS, Siqueira JF Jr. Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:1617-21.
116. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2007;78:550-8.
117. Rosner B, Glynn RJ, Lee ML. Incorporation of clustering effects for the Wilcoxon rank sum test: a large-sample approach. *Biometrics* 2003;59:1089-98.
118. Roux S, Orcel P. Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res* 2000;2:451-6.
119. Ruellas ACO. *Biomecânica aplicada à clínica*. Maringá: Ed. Dental Press; 2013. cap. 9, p. 231-72.
120. Ruvieri DB, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child* 2007;74:118-23.
121. Sangeeta D. Biofilm and dental implant: The microbial link. *J Indian Soc Periodontol* 2013;17:5-11.
122. Sari E, Uçar C. Interleukin 1beta levels around microscrew implants during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 2007;77:1073-8.
123. Sato J, Gomi K, Makino T, Kawasaki F, Yashima A, Ozawa T, Maeda N, Arai T. The evaluation of bacterial flora in progress of peri-implant disease. *Aust Dent J* 2011;56:201-6.
124. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673-82.
125. Schätzle M, Männchen R, Zwahlen M, Lang NP. Survival and failure rates of orthodontic temporary anchorage devices: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1351-9.

126. Serra G, Morais LS, Elias CN, Meyers MA, Andrade L, Muller C, Muller M. Sequential bone healing of immediately loaded mini-implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;134:44-52.
127. Serra G, Morais LS, Elias CN, Meyers MA, Andrade L, Müller CA, Müller M. Sequential bone healing of immediately loaded mini-implants: histomorphometric and fluorescence analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:80-90.
128. Severino VO, Napimoga MH, de Lima Pereira SA. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 2011;56:823-8.
129. Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:758-62.
130. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:975-82.
131. Silva LA, Silva RAB, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2008;19:296-300.
132. Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2011;38:828-37.
133. Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LA. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod* 2012;38:803-13.
134. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res* 2009;88:61-5.
135. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-44.
136. Socransky SS, Smith CL, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin A E. "checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-90.
137. Sosroseno W, Bird PS, Seymour GJ. Nitric oxide production by a human osteoblast cell line stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:50-5.

138. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281-6.
139. Tachibana R, Motoyoshi M, Shinohara A, Shigeeda T, Shimizu N. Safe placement techniques for self-drilling orthodontic mini-implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41:1439-44.
140. Takahashi A, Yamamoto N, Murakami A. Cardamonin suppresses nitric oxide production via blocking the IFN- γ /STAT pathway in endotoxin-challenged peritoneal macrophages of ICR mice. *Life Sci* 2011;89:337-42.
141. Takahashi N, Kobayashi M, Takaki T, Takano K, Miyata M, Okamatsu Y, Hasegawa K, Nishihara T, Yamamoto M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:259-64.
142. Takaki T, Tamura N, Yamamoto M, Takano N, Shibahara T, Yasumura T, Nishii Y, Sueishi K. Clinical study of temporary anchorage devices for orthodontic treatment--stability of micro/mini-screws and mini-plates: experience with 455 cases. *Bull Tokyo Dent Coll* 2010;51:151-63.
143. Toh ML, Kawashima M, Hot A, Miossec P, Miossec P. Role of IL-17 in the Th1 systemic defects in rheumatoid arthritis through selective IL-12R β 2 inhibition. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1562-7.
144. Topouzelis N, Tsaousoglou P. Clinical factors correlated with the success rate of miniscrews in orthodontic treatment. *Int J Oral Sci* 2012;4:38-44.
145. Tortamano A, Dominguez GC, Haddad AC, Nunes FD, Nacao M, Morea C. Periodontopathogens around the surface of mini-implants removed from orthodontic patients. *Angle Orthod* 2012;82:591-5.
146. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66:852-9.
147. Tseng YC, Hsieh CH, Chen CH, Shen YS, Huang IY, Chen CM. The application of mini-implants for orthodontic anchorage. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:704-7.
148. Türköz C, Ataç MS, Tuncer C, Balos Tuncer B, Kaan E. The effect of drill-free and drilling methods on the stability of mini-implants under early orthodontic loading in adolescent patients. *Eur J Orthod* 2011;33:533-6.
149. Uemura M, Motoyoshi M, Yano S, Sakaguchi M, Igarashi Y, Shimizu N. Orthodontic mini-implant stability and the ratio of pilot hole implant diameter. *Eur J Orthod* 2012;34:52-6.

150. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol* 2010;81:99-108.
151. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:282-90.
152. Wiechmann D, Meyer U, Büchter A. Success rate of mini- and micro-implants used for orthodontic anchorage: a prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:263-7.
153. Wilmes B, Ottenstreuer S, Su YY, Drescher D. Impact of implant design on primary stability of orthodontic mini-implants. *J Orofasc Orthop* 2008;69:42-50.
154. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009;2:56-64.
155. Wu TY, Kuang SH, Wu CH. Factors associated with the stability of mini-implants for orthodontic anchorage: a study of 414 samples in Taiwan. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:1595-99.
156. Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 2009;12:113-9.
157. Yao CC, Lai EH, Chang JZ, Chen I, Chen YJ. Comparison of treatment outcomes between skeletal anchorage and extraoral anchorage in adults with maxillary dentoalveolar protrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;134:615-24.
158. Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT, Gaffen SL. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 2007;109:3794-802.