UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA

**PAÔLA CAROLINE DA SILVA MIRA**

# COLONIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS ASSOCIADAS AO APARELHO ORTODÔNTICO FIXO, EM ADOLESCENTES

RIBEIRÃO PRETO
2020

**PAÔLA CAROLINE DA SILVA MIRA**

# COLONIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS ASSOCIADAS AO APARELHO ORTODÔNTICO FIXO, EM ADOLESCENTES

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de concentração:** Odontopediatria

**Orientadora:** Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Maria Bernadete Sasso Stuani

RIBEIRÃO PRETO

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Mira, Paôla Caroline da Silva

Colonização de bactérias periodontopatogênicas associadas ao aparelho ortodôntico fixo, em adolescentes. Ribeirão Preto, 2020.

86p.:il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Stuani, Maria Bernadete Sasso.

1. Microbiota bucal. 2. Tratamento ortodôntico. 3. Aparelho fixo ortodôntico. 4. Adolescentes. 5. Doença periodontal

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Mira, PCS. **Colonização de bactérias periodontopatogênicas associadas ao aparelho ortodôntico fixo, em adolescentes**. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa:__/___ / ____

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura:_____

# DADOS CURRICULARES

## PAÔLA CAROLINE DA SILVA MIRA

**Nascimento** 20 de agosto de 1995, Piracicaba, SP.

**Filiação** Maria Sueli da Silva Mira
Gilson Edivaldo de Mira

**2013-2017** Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Iniciação Científica: Avaliação do efeito quelante da quitosana solubilizada em diferentes ácidos. análise por meio da microdureza dentinária e colorimetria
Orientadora: Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho
Bolsa: FAPESP

**2019-2021** Curso de Especialização em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**2019-2021** Curso de Especialização em Acupuntura
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**2018-2020** Co-criadora do Projeto Dente de Leite, em parceria com a Pró-Reitoria de Cultura e Extensão e Banco Santander.
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

**2020-2020** Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível: Mestrado em Ciências
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Dissertação: Efeito inicial da terapia ortodôntica sobre a microbiota bucal de adolescentes em condição de saúde periodontal.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**DEDICO ESTE TRABALHO**

Aos meus pais, ***Maria Sueli*** e ***Gilson Mira***, que em meio a todas as dificuldades, jamais deixaram de me entregar amor e apoio para que eu seguisse minha caminhada e chegasse até aqui. Minha gratidão por vocês é imensurável. A força de vocês me inspira e o amor me fortalece. Vocês me ensinaram a lutar e, sobretudo, me ensinaram o valor da honestidade e a sabedoria da simplicidade. Que benção poder ser filha de vocês!

Aos meus avós *(in memoriam)* ***Luíza Balbina*** e ***Antônio Ezídio***, pois sei que se estivessem aqui estariam muito orgulhosos dos passos que tenho dado... Como eu gostaria de ter tido tempo de partilhar as vitórias com vocês! E, à minha querida ***Vó Dita***, que é a mulher na qual me espelho sempre: sua sabedoria, tranquilidade, força e suas lutas me inspiram.

A minha irmã ***Sara Vitória***, que cresceu com minha ausência física, mas está sempre em meu coração. Obrigada pela sua doçura e por me ceder sua cama a cada retorno meu à Piracicaba. Que você possa ir mais longe do que eu!

Aos meus ***familiares***, por me apoiarem, compreenderem a distância e momentos de ausência, e me acolherem com carinho sempre que a vida nos proporciona momentos de reencontros.

Às minhas grandes amizades de Piracicaba, ***Larissa Ferreira, Melissa Lima, Gabriela Negri, Érica Martins, Alana Lima e Moisés Baião***. Agradeço por, mesmo diante da distância física, me apoiarem e se alegrarem com cada passo dado. Não há como estar sozinha, sabendo que em algum lugar do globo estão vocês. Voando longe, mas com pousos em meu coração.

Aos meus professores da Escola Estadual Prof. Elias de Mello Ayres, em especial, ***Silvana Valentim, Geórgia Picelli e André Foca***, que se tornaram grandes amigos e me impulsionaram a iniciar essa jornada, quando há 9 anos me disseram que era possível. Vocês abriram as portas de um caminho que aquela garota não sabia ainda que existia. E do qual ela nunca mais quer sair.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto. Vocês tonaram a caminhada mais leve, com experiências que modificaram meu ser. Vocês me ajudam a ser uma pessoa melhor. ***Jaqueline Camargo, Karine Jurado, Pedro Ernesto, Christiano Oliveira, Carolina Aires, Julio Garbellini, Lais Lima, Valéria Pagnano, Amanda Castro, Ana Couto, Carol Motta, Zé Guerreiro, Tiago Juan, Sergio Alberto, Adriano Clarus, Zenon Valêncio, Ana Michelazzo.*** Não há palavras para agradecer a importância de vocês no processo de minha formação humana. Estar com vocês me faz reafirmar o que realmente importa na vida.

**AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha orientadora ***Bernadete***, por ter me ensinado tanto durante esse período. Os ensinamentos que me ofertou vão muito além de minha formação acadêmica. Obrigada por me incentivar e apoiar em tudo sempre! Obrigada por ter me permitido crescer. Obrigada por ter compreendido e me incentivado de forma tão bonita a assumir todas atividades paralelas que surgiram durante o mestrado. Sem seu apoio e sem a liberdade que me deu para caminhar, seria impossível. Ainda que eu tente, jamais conseguirei colocar em palavras a sua importância em meu caminho. Você me orientou na vida.

Ao "Time Berna": ***Patrícia, Paula, Maya, Elaine, Ciça***. Ainda que cada um esteja envolvido em seus projetos, é muito bom encontrar com vocês pelos corredores, clínicas, salas, laboratórios e saber que podemos contar uma com a outra.

À ***Danda***, por todos as atividades paralelas que desenvolvemos durante esse período, pela amizade, carinho, cuidado, apoio, trocas e, principalmente, pela parceria que fez nascer o Projeto Dente de Leite.

**AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor Prof. ***Dr. Paulo Nelson Filho*** e do Vice-Diretor ***Prof. Dr. Ricardo Gariba da Silva.***

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do ***Prof.ª Dr.ª Raquel Assed Bezerra Segato.***

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, ***Profa. Dra. Aldevina Campos Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia Paula e Silva, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Murilo Fernando Neuppmann Feres, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho e Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.***

Ao ***Prof. Cássio do Nascimento*** pelo apoio e por todo ensinamento. Sua contribuição foi imensamente importante para a conclusão desse estudo.

Aos demais ***pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria*** pela convivência enriquecedora.

À ***Michelli Cristina Leite Rovanholo, Matheus Morelli Zanella, Filomena Leli Placciti e Mary Possani Carmessano*** pela ajuda constante, paciência e orientação. Agradeço imensamente por vocês estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, ***Fátima Aparecida Jacinto Daniel***, ***Matheus Morelli Zanela, Nilza Letícia Magalhães, Marco Antônio dos Santos*** e ***Sr. Carmo Eurípedes Terra Barretto (in memoriam), Carolina Paes Torres Mantovani, Fátima Aparecida Rizoli*** por todo o trabalho realizado nos bastidores, mas imprescindível! Obrigada pela atenção e apoio sempre!

Aos ***funcionários do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de***

***Guarulhos***, por contribuirem em toda a parte laboratorial desse desta pesquisa.

Aos ***funcionários da Seção de Pós-Graduação*** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela orientação sempre gentil.

À ***Rosemary Alves de Sá***, por cada cafezinho, sorriso e ajuda! Parabéns por sua eficiência, dedicação e seu alto astral.

À ***Capes*** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte técnico, científico e financeiro fundamentais para a realização deste trabalho.

**RESUMO**

Mira, PCS. **Colonização de bactérias periodontopatogênicas associadas ao aparelho ortodôntico fixo, em adolescentes [Dissertação].** Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2020.

**Introdução:** O surgimento de alterações periodontais ainda é uma problemática, durante o tratamento ortodôntico e podem alterar a microbiota bucal qualitativa e quantitativamente. **Objetivo:** Avaliar as alterações nos níveis de diferentes microrganismos envolvidos, direta ou indiretamente, na doença periodontal, por meio da saliva de pacientes adolescentes sob tratamento ortodôntico. **Materiais e Método:** Amostras de saliva foram coletadas antes e quinze dias após a instalação de aparelho fixo em 21 pacientes sob tratamento ortodôntico. Foi avaliado nos níveis salivares de 40 espécies de microrganismos dos complexos roxo, verde, laranja, vermelho e "outras espécies", por meio da técnica de biologia molecular checkerboard DNA-DNA hybridization. Os resultados foram submetidos aos testes de Wald-Type Statistic (WTS) e ANOVA-Type Statistic (ATS), e as diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0,05$. **Resultados:** 37 das 40 espécies investigadas foram encontradas em quantidade significativamente após 15 dias da instalação do aparelho ortodôntico. **Conclusão:** O aparelho ortodôntico fixo aumentou, significativamente, os níveis salivares totais de microrganismos, após 15 dias da instalação, dentre eles bactérias envolvidas direta ou indiretamente com a doença periodontal.

**Palavras-chave:** Microbiota bucal, Tratamento ortodôntico, Aparelho fixo ortodôntico, Adolescentes, Doença periodontal

**ABSTRACT**

Mira PCS. **Periodontal pathogen bacterial colonization with fixed orthodhontic appliances, in adolescents** [dissertation]. Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto at University of São Paulo; 2020.

**Introduction:** The appearance of periodontal changes is still a problem, during orthodontic treatment and can change the oral microbiota qualitatively and quantitatively. **Objective:** To analyse the changes in the levels of different microorganisms involved, directly or indirectly, in periodontal disease, through the saliva of adolescent patients undergoing orthodontic treatment. **Materials and Method:** Saliva samples were collected before and fifteen days after the installation of a fixed appliance, in 21 patients undergoing orthodontic treatment. It was evaluated at the salivary levels of 40 species of microorganisms from the purple, green, orange, red and "other species" complexes, using the DNA-DNA hybridization checkerboard molecular biology technique. The results were submitted to Wald-Type Statistic (WTS) and ANOVA-Type Statistic (ATS) tests, and the differences were considered significant for p values $<0.05$. **Results:** 37 of the 40 species investigated were found in significant numbers 15 days after the installation of the orthodontic appliance. **Conclusion:** The fixed orthodontic appliance significantly increased the total salivary levels of microorganisms, 15 days after installation, including bacteria directly or indirectly involved with periodontal disease.

**Keywords:** Oral microbiota, Orthodontic treatment, Fixed orthodontic appliance, Adolescents, Periodontal disease

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO** ..... **21**

**2. PROPOSIÇÃO** ..... **27**

2.1 Objetivo geral ..... 29

2.2 Objetivo específico ..... 29

**3. MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **31**

3.1 Seleção da amostra ..... 33

3.2 Delineamento experimental ..... 34

3.3 Documentação ortodôntica ..... 35

3.4 Instalação do aparelho ..... 35

3.5 Alinhamento/nivelamento ..... 35

3.6 Coleta de saliva ..... 35

3.7 Preparo das amostras de saliva ..... 36

3.8 Cepas bacterianas e condições de crescimento ..... 37

3.9 Isolamento do DNA e preparo das sondas ..... 37

3.10 Hibridização do DNA ..... 39

3.11 Detecção das espécies ..... 41

3.12 Leitura dos filmes autorradiográficos ..... 42

3.13 Método estatístico ..... 43

**4. RESULTADOS** ..... **45**

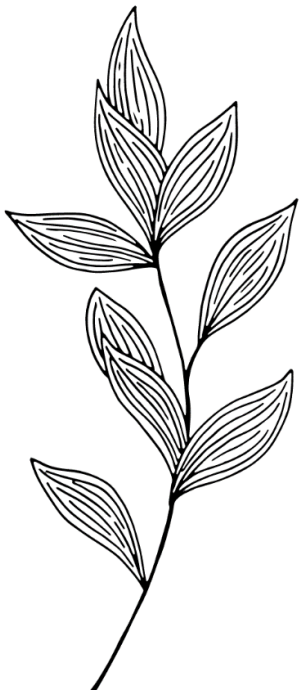
**5. DISCUSSÃO** ..... **53**

**6. CONCLUSÃO** ..... **65**

**REFERÊNCIAS** ..... **69**

**ANEXOS** ..... **81**

# 1. Introdução



# 1. INTRODUÇÃO

A ortodontia é uma especialidade odontológica que tem como princípio básico a movimentação dentária, oriunda da utilização de aparelhos ortodônticos, que liberam forças sobre componentes do sistema estomatognático: dentes, ligamento periodontal, ossos e músculos (Moyers,1991).

Sabe-se que, apesar de todos os benefícios que o tratamento ortodôntico pode proporcionar ao paciente, existem limitações que ainda são enfrentadas pela especialidade mesmo com os avanços técnico-científicos já alcançados. Dentre essas limitações está o maior risco a doença cárie e doença periodontal, proporcionado pela presença dos dispositivos ortodônticos (Lovrov et al., 2007; Gomes et al., 2007; Chapman et al., 2010; Kim et al., 2010; Akin et al., 2013; Ren et al., 2014; Cerroni et al., 2018; Mei et al., 2019; Voinea-Georgescu et al., 2020), especialmente no período da adolescência, no qual ocorrem diversas alterações fisiológicas, físicas e psicossociais (Martínez et al., 2000; Soares et al., 2009). Dentre elas, a diminuição de autocuidados relacionados à higiene, bem como à escovação dental, em especial em adolescentes insatisfeitos com sua autoimagem (Soares et al., 2009; Garbin et al., 2009; Barreto et al., 2016; Marín et al., 2016; Pedrosa et al., 2019).

As maloclusões afetam o indivíduo, não apenas devido às limitações funcionais, mas, principalmente, pelo impacto estético que o desequilíbrio dentário é capaz de gerar (Feu et al. 2008). Estudos mostram que, durante a adolescência, a frustração com o sorriso por maloclusões de diversas classes pode gerar impacto emocional e psicossocial maior até mesmo do que os impactos gerados pela obesidade, o que justifica a alta procura pelos especialistas durante esse período (Marque et al., 2006; Peres et al., 2008; Borges et al., 2010; De Lira e De Souza, 2020; Atik et al., 2020).

A resposta biológica apresentada após a aplicação de força ortodôntica sobre elementos dentários é caracterizada por uma reação inflamatória aguda não patológica, nos tecidos priodontais (Garlet et al., 2007). Desta forma, essa reposta expressa pela inflamação é capaz de gerar alterações vasculares e promover a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios que atuam sobre células mesenquimais indiferenciadas, diferenciando-as em osteoclastos e osteoblastos, os quais norteiam o

processo de reabsorção e aposição óssea, em áreas de compressão e de tração do ligamento periodontal (Hughes, 2000; Ehrlich e Lanyon, 2002).

O sistema RANK-RANKL-OPG (Receptor do fator nuclear kappa B – RANK ligante – Osteoprotegerina) é um importante regulador do processo de osteoclastogênese e osteogênese. Quando RANKL se liga a RANK, há um estímulo que gera diferenciação de células hematopoiéticas em osteoclastos. Quando a OPG está presente, esse processo é inibido, configurando, assim, equilíbrio do sistema (Boyle et al., 2003). Ressalta-se que esses eventos, presentes no processo de remodelação óssea, não só ocorrem durante o tratamento ortodôntico. O desequilíbrio na tríade RANK/RANKL/OPG pode ser verificado em doenças como artrite, osteoporose, lesões fibro-ósseas e doença periodontal (Boyle et al., 2003; Amorim et al., 2008, Elias et al., 2010; Gibertoni et al., 2017).

Devido ao potencial de remodelação óssea, a terapia ortodôntica para pacientes com doença periodontal estabilizada pode ser uma grande aliada, pois com a deposição de osso alveolar em áreas de tração do ligamento periodontal, há maior possibilidade de reparo ósseo das bolsas provenientes de periodontites (Berglundh et al., 1991; Petti et al., 1997; Aimetti et al., 2020).

No entanto, em pacientes periodontalmente saudáveis, existe possibilidade do tratamento ortodôntico ocasionar surgimento de condições que oferecem maiores riscos à saúde periodontal, tais como alterações do tecido de proteção, inflamação patológica, sangramento gengival, aumento de volume e recessão gengival (Richter et al., 2011; Akin et al., 2013; Gomes et al., 2017; Mota e Morais, 2017; Maringolo, 2018; Binda, 2019; Dicu et al., 2020; Voinea-Georgescu et al., 2020). Ademais, a exacerbação de processos inflamatórios, na região sob forças mecânicas, pode comprometer o equilíbrio dos eventos celulares presentes nos tecidos periodontais, durante a movimentação dentária (Garlet et al., 2007).

Em razão disso, parece claro que a manutenção da saúde dos tecidos periodontais de pacientes ortodônticos é fundamental para o êxito do tratamento (Bardal et al., 2011; Talic et al., 2011). Apesar dessa premissa, esse é um desafio ainda enfrentado pela especialidade e, desde a década de 40, o controle de biofilme tem sido discutido como um ponto demasiadamente crítico a ser considerado pelo ortodontista (Gibbin, 1937; Box, 1940).

A relação da utilização de diferentes dispositivos como anéis, bráquetes e até mesmo o uso de resina composta para fixação dos acessórios ortodônticos constituem fatores de risco adicionais à doença periodontal, de forma diretamente proporcional a quantidade de acessórios utilizados. Tal fato acontece especialmente pelos dispositivos dificultarem a adequada higienização bucal, assim como suas superfícies serem mais propensas ao acúmulo de biofilme (Noyes, 1937; Uetanabaro et al., 1984; Rosenbloom e Tinanoff, 1991).

O biofilme é constituído de material orgânico e proteico, substratos de microrganismos, que, por meio de sua metabolização e sem adequado controle, corresponde a significativo fator etiológico para a manifestação de doenças (Löe, Theilade & Jensen, 1965; Bastos, Henriques e Olympio, 2006).

A aparelhagem fixa, principalmente, pode modificar a composição em relação à morfologia, composição e atividade metabólica do biofilme (Adams, 1967, Balenseifen e Madonia, 1970; Friedman, 1985; Diamanti-Kipioti et al., 1987; Paolantonio et al., 1997; Chang et al., 1999; Campbel, 2001; Sukontapatipark et al., 2001; Hagg, 2004; Chin et al., 2006). Desta forma, com o uso de aparelhos ortodônticos fixos pode ocorrer desequilíbrio na simbiose da microbiota bucal, elevação da quantidade de microrganismos patogênicos e interações microbianas supra e subgengival que comprometem a saúde periodontal do indivíduo, e, consequentemente as respostas dos tecidos periodontais a aplicação de forças ortodônticas (Löe et al., 1965; Zachrisson e Zachrisson, 1972; Gorelic et al.,1982; Rosenbloom e Tinanoff, 1991; Lascala et al., 1996; Paolantonio et al., 1997; Chang et al., 1999; Campbel, 2001; Rezende et al., 2001; Sukontapatipark et al., 2001; Hagg, 2004; Bretas et al., 2005; Kupietzky et al., 2005; Naranjo et al., 2006; Chin et al., 2006; Olympio et al., 2006, Thornberg et al., 2009; Ristic et al., 2007; Freitas , 2012; Andrucioli et al., 2018; Binda, 2019; Jing et al., 2019; Shirozaki et al, 2020).

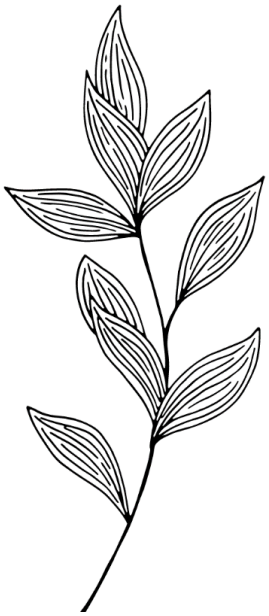
A biologia molecular trouxe grandes avanços em diversas áreas de pesquisas e na Odontologia não foi diferente. Dentro do campo microbiológico, a técnica de hibridização de DNA-DNA (checkerboard) possibilita a detecção e contagem de diferentes cepas bacterianas por meio da coleta de fluidos, como a saliva, constituindo-se em uma inovadora ferramenta que permite análises não invasivas, rápidas e mais adequadas do que o cultivo de células (do Nascimento, et al., 2010).

Nas últimas décadas, essa técnica de diagnóstico molecular com utilização de sondas de DNA para a detecção de espécies microbianas tem sido muito utilizada para avaliação microbiológica em pacientes que fazem uso de aparelhos ortodônticos e auxiliado na melhor compreensão da dinâmica de doenças que têm microrganismos como fatores etiológicos (Olmedo, 2009; Perdiza, 2009; Kim et al., 2010; Andrucioli, 2012; Morelli, 2016; Bergamo et al., 2019; Gujar et al., 2020). No entanto, os estudos que avaliaram espécies microbianas, relacionadas à doença periodontal em adolescentes sob tratamento ortodôntico, tiveram como tempo experimental períodos após a instalação de aparelhos fixos ou removíveis que variaram prioritariamente entre 30, 60, 90, 180 dias. (Pandis, 2010; Nelson-Filho, et al., 2011a; Nelson-Filho, et al., 2011b; Topaloglu-Ak et al., 2011; Nelson-Filho et al., 2012; Andrucioli et al., 2018; Bergamo et al., 2019; Binda, 2019; Cardoso et al., 2019; Jing et al., 2019; Shirozaki et al, 2020; Vincent-Bugnas et al., 2020; Zhao et al, 2020). Desse modo, não foi elucidada a dinâmica microbiológica do processo de desenvolvimento da doença periodontal nessas condições nos primeiros dias após a instalação de aparelhos ortodônticos.

É importante ressaltar que, de acordo com o Ministério da Saúde, a doença periodontal é um dos principais agravos bucais no Brasil (SB Brasil, 2010), constituindo-se em problema de saúde pública. Quando tem início durante a adolescência, sem corretos diagnóstico e tratamento, pode progredir ao longo da vida e tornar-se doença crônica (Loos e Van Dyke, 2020). Adicionalmente, apesar da importância de todos os estudos já realizados para a compreensão do impacto gerado pelos dispositivos utilizados durante e após o tratamento ortodôntico (Freitas et al., 2014) é imprescindível ressaltar que alterações podem ocorrer entre 10 a 20 dias após a instalação de aparelhos fixos, compatíveis com o estágio inicial da doença periodontal, como sangramento gengival, alteração de contorno e volume gengival (Bortoluzzi et al., 2013).

Desse modo, contribuir para melhor compreensão da dinâmica microbiológica da doença periodontal em adolescentes sob tratamento ortodôntico, previamente ao aparecimento de sinais clínicos, se faz importante dentro da perspectiva da prevenção, detecção precoce de alterações e estabelecimento de abordagens mais adequadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito inicial da terapia ortodôntica sobre a microbiota bucal de adolescentes, em condição de saúde periodontal, por meio da técnica de hibridização DNA-DNA (checkerboard).

# 2. Proposição



# 2. PROPOSIÇÃO

## 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações nos níveis de diferentes microrganismos envolvidos, direta ou indiretamente, na doença periodontal, por meio da saliva de pacientes adolescentes, após a montagem do aparelho ortodôntico.

## 2.2 Objetivo específico

Avaliar nos níveis salivares 40 espécies de microrganismos dos complexos roxo, verde, laranja, vermelho e "outras espécies", durante o período inicial de alinhamento dentário, por meio da técnica de biologia molecular checkerboard DNA-DNA hybridization.

# 3. Materiais e Métodos

# 3. MATERIAIS E MÉTODO

## 3.1 Seleção da amostra

Este estudo foi conduzido em parceria com o Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e Departamento de Clínica Infantil FORP-USP.

Os participantes do estudo foram informados sobre os propósitos e etapas da pesquisa, seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de coletas e tratamento. Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, respondendo a um questionário de saúde/anamnese e receberam o tratamento ortodôntico gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluçãon°466/2012). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto FORP-USP, sob número de protocolo CAAE 31442820.8.0000.5419.

A amostra desse estudo clínico prospectivo foi coletada de acordo com a matrícula dos indivíduos nas Clínicas de Ortodontia. O cálculo do tamanho da amostra (n) para a diferença de duas médias foi realizado considerando o poder do teste de 80% e o coeficiente de confiança de 95%. O resultado mostrou que eram necessários, no mínimo, 20 arcos. Porém, a amostra deste estudo prospectivo foi constituída de 21 pacientes que apresentavam dentição permanente completa, 11 a 16 anos de idade.

A seleção da amostra foi realizada por um único profissional treinado e foi composta por pacientes que necessitavam de tratamento ortodôntico corretivo. O diagnóstico e planejamento ortodôntico foram realizados de acordo com o preconizado pela Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Os critérios de inclusão para a seleção da amostra foram: pacientes entre 11 a 16 anos de idade, de ambos os sexos; com presença de todos os dentes permanentes já irrompidos, ausência de doença periodontal ou doença cárie ativa e que necessitavam de tratamento ortodôntico normalização da oclusão.

Os critérios de exclusão foram: história de doença sistêmica (diabetes, deficiências imunológicas, hipertensão, síndromes, etc.) que comprometesse a resposta

do hospedeiro ou uso de medicamentos como antibióticos, imunossupressores, anticoagulantes ou antinflamatórios nos últimos três meses; gravidez; histórico de uso contínuo de enxaguatórios bucais nos últimos três meses; história de tratamento ortodôntico corretivo prévio; presença de lesões periapicais.

Previamente ao início do tratamento, os pacientes com presença de gengivite e/ou cálculo supragengival receberam profilaxia e/ou raspagem e alisamento radicular, a fim de controlar os problemas periodontais presentes, e receberam instrução padronizadas de higienização bucal (escovação e uso de fio dental).

## 3.2 Delineamento experimental

No início deste estudo todos os indivíduos foram submetidos à anamnese e exame clínico e documentação ortodôntica inicial. A movimentação dentária ocorrerá até a normalização da oclusão e finalização do caso clínico, porém as coletas de saliva foram realizadas no tempo 0 (antes da instalação de bráquetes e arco) e ao final de 15 dias após instalação do arco de NiTi 0,016" (Morelli®), correspondendo ao período de alinhamento/nivelamento. O seguinte desenho experimental foi proposto neste estudo:

**A.** Seleção dos pacientes
**B.** Anamnese e exame clínico
**C.** Orientação de higiene oral
**D.** Solicitação da documentação ortodôntica inicial
**E.** Coleta de saliva
**F.** Profilaxia para a colagem de bráquetes no arco inferior e instalação do arco inicial de alinhamento /nivelamento
**G.** Coleta de saliva
**H.** Continuidade do tratamento
**I.** Remoção do aparelho após a movimentação dentária necessária
**J.** Exame ortodôntico final

| -15 dias | 0 | 15 | 15+ |
|---|---|---|---|
| A,B,C,D | E, F | G | H, I, J |

## 3.3 Documentação ortodôntica

A documentação ortodôntica foi solicitada incluindo as fotos extrabucais (frente, perfil e sorrindo) e intrabucais (frontal, oclusal superior, ocusal inferior, direita, esquerda), telerradiografia lateral, radiografia panorâmica, modelos (superior e inferior) e pasta de documentação.

## 3.4 Instalação do aparelho

Previamente à instalação dos dispositivos ortodônticos, os pacientes receberam instruções específicas para higienização bucal durante todo período de utilização do aparelho, bem como foi enfatizada a necessidade de retornos periódicos para monitoramento da saúde bucal e continuidade do tratamento ortodôntico.

Após coleta de saliva inicial, foi realizada profilaxia dental com pedra pomes e água, lavagem, secagem e isolamento relativo dos dentes (33, 32, 31, 41, 42, 43) sobre os quais os bráquetes de prescrição Roth, slot 0,022"x0,028" (Morelli®; Sorocaba, SP, Brasil) foram fixados. A superfície vestibular do esmalte dos dentes envolvidos foi condicionada com ácido fosfórico em gel a 37% (3M do Brasil Ltda Produtos Dentários, Sumaré, SP), seguido pela lavagem e secagem. Em seguida, foi aplicado o sistema adesivo (Single Bond; 3M do Brasil Ltda Produtos Dentários, Sumaré, SP) com fotopolimerização por 15 segundos. Após o adequado posicionamento do bráquete com resina fotopolimerizável (Bioplic; Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil), em superfície de contato com o dente e remoção cuidadosa de excessos de resina, a fotopolimerização foi realizada por 20 segundos em cada superfície do bráquete, de acordo com as instruções do fabricante.

## 3.5 Alinhamento/nivelamento

Após coleta inicial de saliva e colagem de bráquetes, foi instalado o arco com fio NiTi de 0,016" (Morelli®) fixado por alastics individuais (Morelli®) aos bráquetes, configurando ativação do processo de alinhamento e nivelamento inicial no arco dentário.

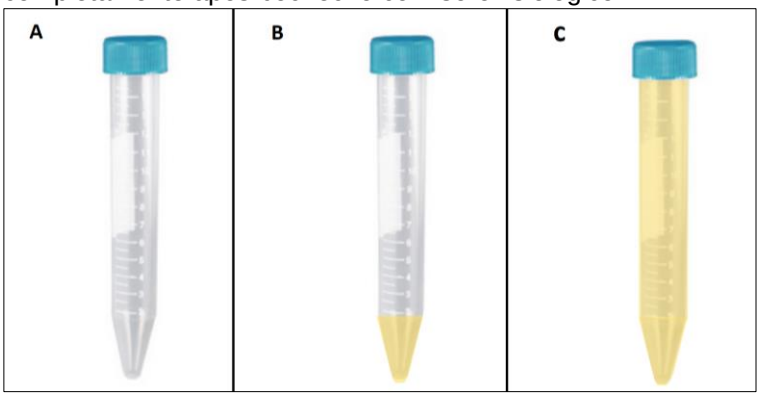
## 3.6 Coleta de saliva

Amostras de saliva total não estimulada foram coletadas de cada paciente, de

acordo com trabalhos anteriores (Navazesh, 1993; Taba et al, 2005) em tubos estéreis no início (dia 0) e ao final do período experimental (dia 15), constituindo desse modo dois tempos experimentais (T1 e T2). Os pacientes foram orientados a não ingerirem alimentos, beberem ou realizarem higiene oral por, pelo menos, 1 hora antes da coleta da saliva.

Primeiramente, os pacientes foram orientados a depositarem no tubo 1,5 ml de saliva. Após isso, foi realizado bochecho com solução fisiológica, a qual foi expelida dentro do tubo até seu completo preenchimento, totalizando em 15 ml (Figura 1). As amostras de saliva foram imersas imediatamente no gelo e congeladas sob temperatura de -30ºC.

**Figura 1:** Representação gráfica da coleta salivar. **A:** Tubo de ensaio de 15 ml vazio. **B:** Tubo de ensaio preenchido inicialmente por saliva. **C:** Tubo de ensaio preenchido completamente após bochecho com soro fisiológico.




## 3.7 Preparo das amostras de saliva

Os tubos contendo as amostras de saliva nos dois tempos amostrais foram descongelados em temperatura ambiente. Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos e 30 µL foram transferidos para os microtubos (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburgo, Alemanha). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas por 4 minutos utilizando um agitador de tubos e os microtubos foram fervidos a 95°C por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA. Após isso, os microtubos foram resfriados em gelo por 5 minutos.

Em seguida, as amostras foram neutralizadas com a adição de 800 µL de acetato de amônio 5M e, concomitantemente, dois microtubos contendo a quantidade de 105 e 106 células de cada uma das 40 cepas bacterianas investigadas foram processados seguindo o mesmo protocolo, para serem utilizados como padrões após o

processo de hibridização e comparação entre amostras e sondas.

Todos os procedimento laboratoriais foram realizados no laboratório de microbiologia da Universidade de Guarulhos, São Paulo.

## 3.8 Cepas bacterianas e condições de crescimento

As cepas bacterianas foram adquiridas liofilizadas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) e do Forsyth Institute (Boston, MA, USA). O caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) foi utilizado para o processo de reidratação do conteúdo liofilizado, o qual foi cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35º C, em condição de anaerobiose (80% $N_2$, 10% $CO_2$, 10%$H_2$). Para o enriquecimento do ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, foi realizada a adição de 10 µg/ml de ácido Nacetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma), de acordo com as necessidades nutricionais de cada cepa bacteriana. No caso das bactérias T. denticola e T. socranskii, o caldo para crescimento utilizado para o cultivo foi o de Mycoplasma (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml 32 espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

## 3.9 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas dentro de uma cabine de anaerobiose em ágar-sangue contido em placas de Petri. Apenas duas espécies de espiroquetas foram cultivadas em caldo de cultura, durante 3 a 7 dias.

Após o cultivo, as colônias foram raspadas e alocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes, utilizando-se de centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 gp por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C12H25NaO4S) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de

lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). Após esses procedimentos, o DNA isolado e purificado foi obtido, como descrito por Smith et al. (1989).

Para cada uma das espécies a serem avaliadas, foram preparadas sondas multigenômicas (whole-genomic) pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do random primer digoxigenin labeling kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983).

As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Haffajee; Socransky, 1994). As espécies avaliadas constam na Tabela 1.

**Tabela 1:** Bactérias investigadas divididas em grupos e complexos (a: American Type Culture Collection; b: Forsyth Institute).

| Espécies | cepas | Espécies | cepas |
|---|---|---|---|
| ***Actinomyces sp*** | | **Complexo Laranja** | |
| *Actinomyces gerencseriae* | 23860a | *Campylobacter gracilis* | 33236a |
| *Actinomyces israelii* | 12102a | *Campylobacter rectus* | 33238a |
| *Actinomyces naeslundii I* | 12104a | *Campylobacter showae* | 51146a |
| *Actinomyces oris* | 43146a | *Eubacterium nodatum* | 33099a |
| | | *Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum* | 25586a |
| | | *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum* | 10953a |
| **Complexo Roxo** | | *Fusobacterium nucleatum ssp. Vicentii* | 49256a |
| | | *Fusobacterium periodonticum* | 33693a |
| *Actinomyces odontolyticus* | 17929a | *Parvimonas micra* | 33270a |
| *Veillonella parvula* | 10790a | *Prevotella intermedia* | 25611a |
| | | *Prevotella nigrescens* | 33563a |
| | | *Streptococcus constellatus* | 27823a |
| **Complexo amarelo** | | | |
| | | **Complexo vermelho** | |
| *Streptococcus gordonii* | 10558a | *Tannerella forsythia* | 43037a |
| *Streptococcus intermedius* | 27335a | *Porphyromonas gingivalis* | 33277a |
| *Streptococcus mitis* | 49456a | *Treponema denticola* | B1b |
| *Streptococcus oralis* | 35037a | | |
| *Streptococcus sanguinis* | 10556a | **Outras espécies** | |
| | | *Eubacterium saburreum* | 33271a |
| | | *Gemella morbillorum* | 27824a |
| **Complexo Verde** | | *Leptotrichia buccalis* | 14201a |
| | | *Neisseria mucosa* | 19696a |
| *Aggregactibacter* | 43718a | *Prevotella melaninogenica* | 25845a |
| *actinomycetemcomitans a+b* | 29523a | *Propionibacterium acnes I + II* | 11827a |
| *Capnocytophaga gingivalis* | 33624a | | 11828a |
| *Capnocytophaga ochracea* | 33596a | *Selenomonas noxia* | 43541a |
| *Capnocytophaga sputigena* | 33612a | *Streptococcus anginosus* | 33397a |
| *Eikenella corrodens* | 23834a | *Treponema socranskii* | S1b |

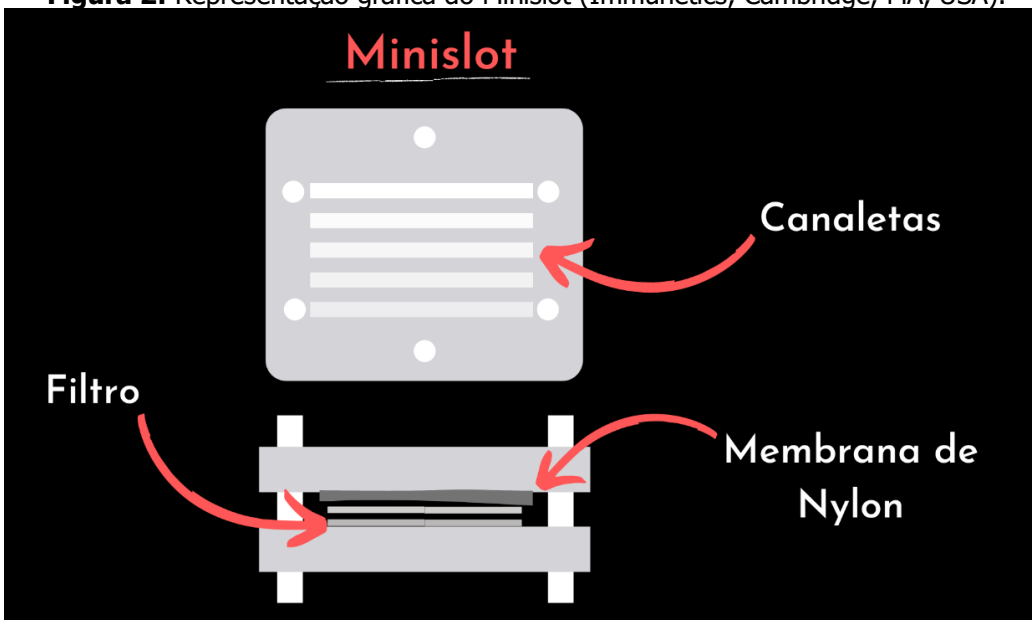
## 3.10 Hibridização do DNA

As suspensões de células bacterianas contidas nos tubos foram fervidas, em banho-maria, por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia. Cada suspensão contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do Minislot (Immunetics, Cambridge, MA, USA), desse modo, concentrando-se em uma membrana de nylon (15 x 15cm) com carga positiva (Boehringer

Mannheim).

Os controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas foram depositados nas duas últimas canaletas do Minislot (Immunetics), nas concentrações correspondentes a 105 e 106 células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky et al., 1994; Haffajee et al., 1997a, b). Após o preenchimento das canaletas, a membrana foi removida do Minislot (Immunetics) e aquecida em forno a 120º C por 20 minutos para a fixação do DNA.

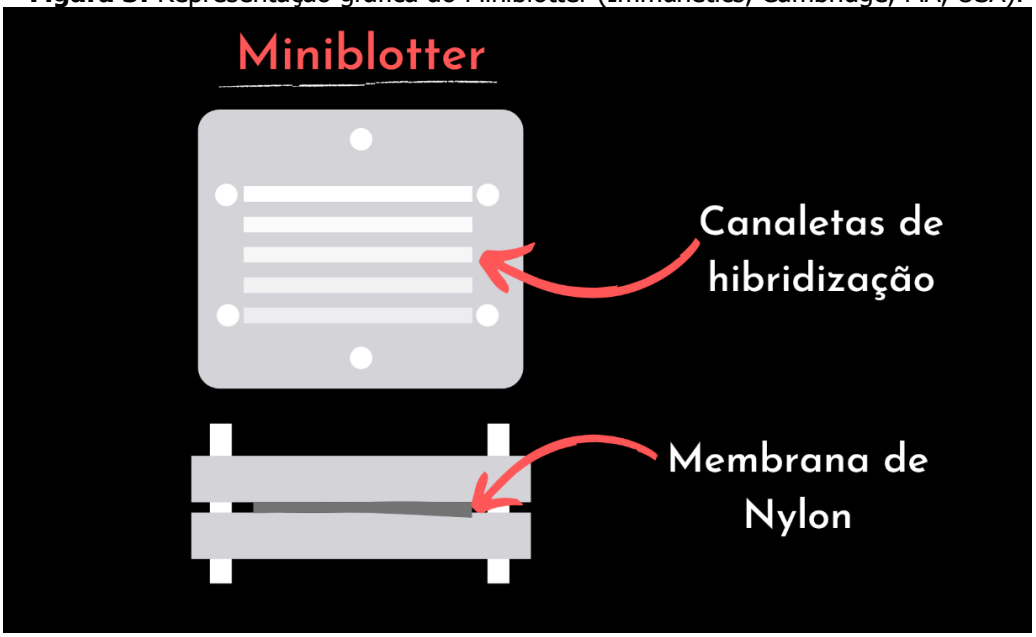
**Figura 2:** Representação gráfica do Minislot (Immunetics, Cambridge, MA, USA).




A pré-hibridização da membrana foi realizada a 42º C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5% standard saline citrate SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim).

Em seguida, a membrana foi posicionada no Miniblotter (Immunetics, Figura 3) com as linhas de DNA posicionadas perpendicularmente às canaletas. Em cada canaleta do Miniblotter (Immunetics) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período de 20 horas, a 42º C.

**Figura 3:** Representação gráfica do Miniblotter (Immunetics, Cambridge, MA, USA).



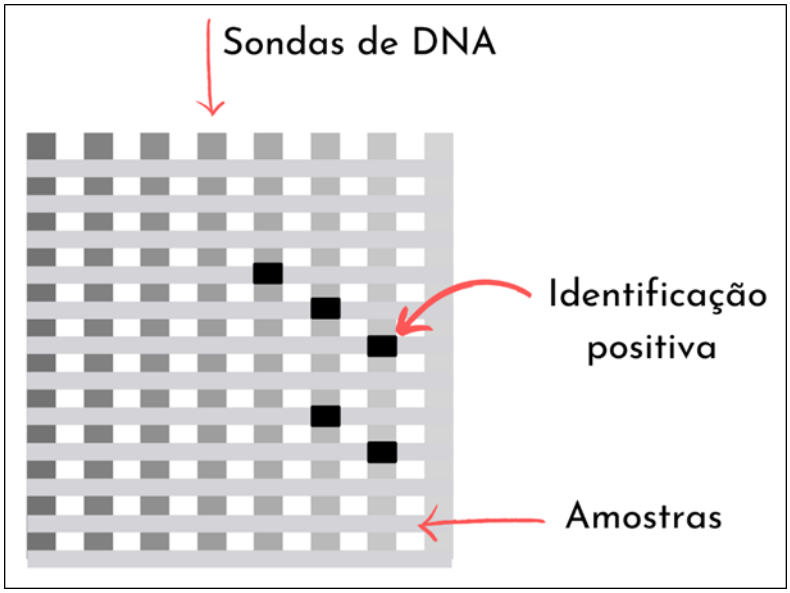

## 3.11 Detecção das espécies

Após a hibridização, a membrana foi removida do Miniblotter (Immunetics) e lavada por 40 minutos, a 65ºC numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na2HPO4, a fim de remover as sondas não hibridizadas completamente. Cada membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C4H4O4), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. Em seguida a membrana foi lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de MgCl2, pH 9,5.

Em seguida, as membranas foram incubadas por 45 minutos a 37ºC em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-StarTM Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England, UK). Após a incubação, cada membrana foi colocada em um chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca KodakX-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. Posteriormente, os filmes foram revelados manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas

foram da marca Kodak (São José dos Campos, São Paulo), sempre mantidas à temperatura de 20ºC.

**Figura 4:** Representação gráfica da hibridização entre as bactérias presentes nas amostras e as sondas de DNA de cada espécie bacteriana.

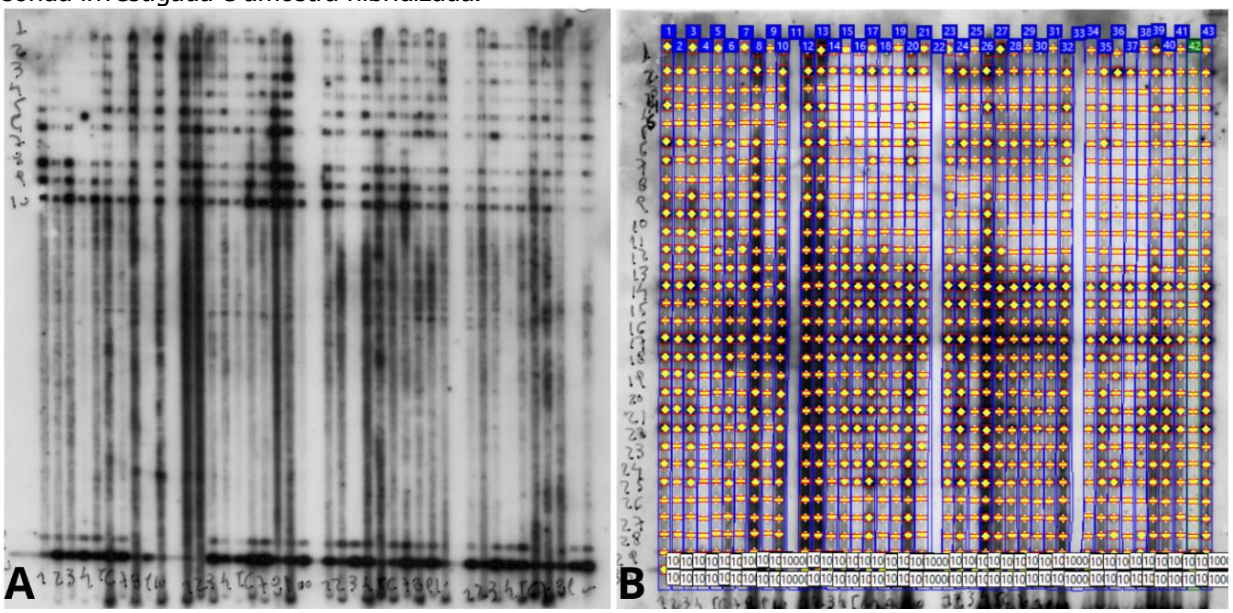



## 3.12 Leitura dos filmes autorradiográficos

A interpretação dos sinais de hibridização obtidos sobre os filmes autorradiográficos foi realizada após a fotografia desses filmes e análise das imagens por meio do software CLIQS 1D® (Totallab, Newcastle, Inglaterra) (Figura 5).

Esse software possibilitou a determinação do número aproximado de células microbianas presentes em cada amostra avaliada nos diferentes tempos amostrais. Essa detecção e quantificação foi realizada por meio da comparação da intensidade dos sinais obtidos em pontos de intersecção das amostras contra as sondas, tendo como base a intensidade de contraste apresentada pelos controles, os quais continham 105 e 106 células de cada uma das 40 espécies-alvo.

**Figura 5: A.** Fotografia de uma das membranas reveladas em filme radiográfico. **B.** Demarcação, por meio do programa CLIQ 1D® (Totallab, Newcastle, Inglaterra), dos pontos de intersecção entre cada sonda investigada e amostra hibridizada.




## 3.13 Método estatístico

Os dados microbiológicos obtidos por meio das amostras coletadas nos dois tempos experimentais propostos nesse projeto submetidos à análise estatística descritiva.

Para verificar a distribuição dos dados do estudo foi realizado o teste de significância de Shapiro-Wilk, o qual confirmou que a distribuição não correspondeu a um padrão de normalidade, com $p < 2{,}2x10^{-6}$.

A contagem total de espécies foi analisada por meio do teste não-paramétrico de Brunner and Langer (Non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments) para a análise de inferência dos tempos (T1 e T2) sobre a contagem dos microrganismos total, com intervalo de confiança de 95%.

Em função da ausência de padrão de normalidade, foram utilizados métodos não-paramétricos para as análises de inferência. Desta forma, os dados apresentados serão resumidos em medianas, intervalos interquartis (1º e 3º quartis), valores máximos e mínimos, e médias. As significâncias foram obtidas em torno dos valores das medianas.

Para testar a hipótese de ausência de interação do fator tempo entre o tempo inicial e final em relação à contagem dos microrganismos total, os testes Wald-Type Statistic (WTS) e ANOVA-Type Statistic (ATS) foram aplicados. Os mesmos testes

foram aplicados para avaliar a hipótese de ausência de interação dos fatores tempo e espécies.

Diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico R (R. software 3.1.0; R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

# 4. Resultados

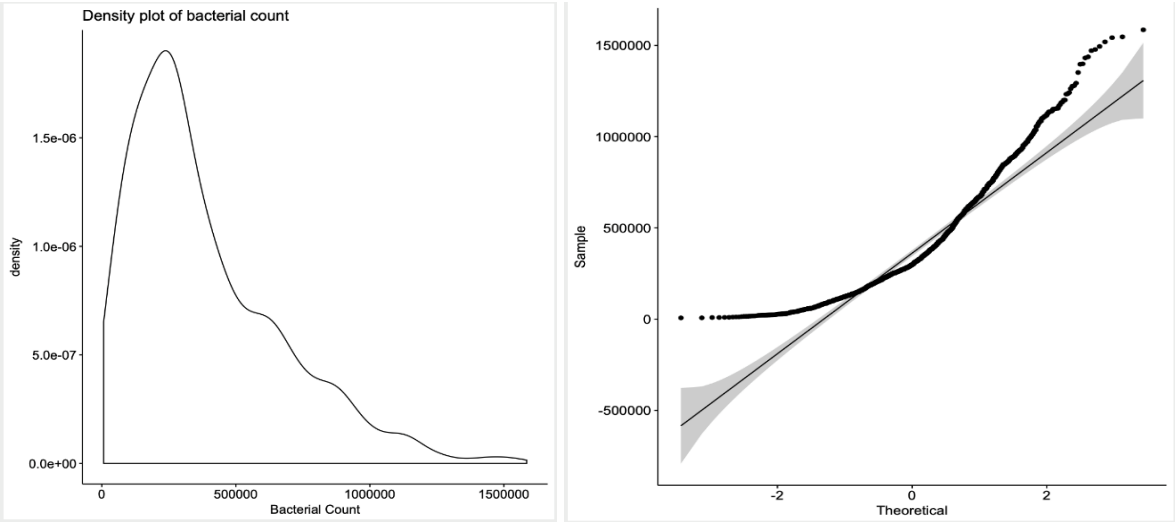
# 4. RESULTADOS

A amostra desse estudo foi constituída de 21 pacientes, sendo 10 do sexo feminino e 11 do sexo masculino, com idades variando entre 11 a 16 anos, com idade média de 13,1 anos.

Após o processamento laboratorial das coletas realizadas pela pesquisadora principal e análise das imagens radiográficas por meio de software pela mesma pesquisadora após treinamento e calibração, os dados foram submetidos para análise estatística.

Para verificar a distribuição dos dados do estudo, duas análises foram realizadas, por meio do teste de Shapiro-Wilk, e foi possível observar que a distribuição não correspondeu a um padrão de normalidade (Figura 6). Em razão da distribuição dos dados sem um padrão de normalidade, foram utilizados métodos não-paramétricos para as análises de inferência, com significâncias obtidas em torno da mediana.

**Figura 6: A.** Gráfico de densidade**. B.** Gráfico de linha. O teste de significância de Shapiro-Wilk confirmou que a distribuição foi não-normal, com $p < 2{,}2x10^{-6}$**.**




Em função da ausência de padrão de normalidade, os dados utilizados para avaliação estatística nao paramétrica e foram resumidos em medianas, intervalos interquartis (1º e 3º quartis). O T1 representou as amostras coletas previamente a instalação dos bráquetes ortodônticos, e, desse modo, o T2 representou as coletas realizadas após 15 dias (Tabela 2). A significância foi obtida em torno dos valores das medianas.

**Tabela 2:** Avaliação estatística não paramétria em torno dos valores das medianas (M: Mediana, Q1-Q3: intervalos interquartis).

| Contagem total das espécies | T 1 | T 2 | p |
|---|---|---|---|
| **M**<br>**(Q1-Q3)** | 280902<br>(155116 – 512823) | 319708<br>(1906556 – 562442) | <0,05 |

De acordo com o teste não-paramétrico de Brunner and Langer (Non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments), utilizado para a análise de inferência dos tratamentos sobre a contagem dos micro-organismos de uma forma total, sem discriminação entre as espécies investigadas, foi possível observar diferença estatisticamente significante entre T1 e T2 (Figura 7 e 8).

**Figura 7:** Gráfico do tipo Box Plot onde estão presentes os valores das medidas descritivas dos valores mínimo, 1o quartil, mediana, 3o quartil e valor máximo de contagem microbiana total para cada tempo.

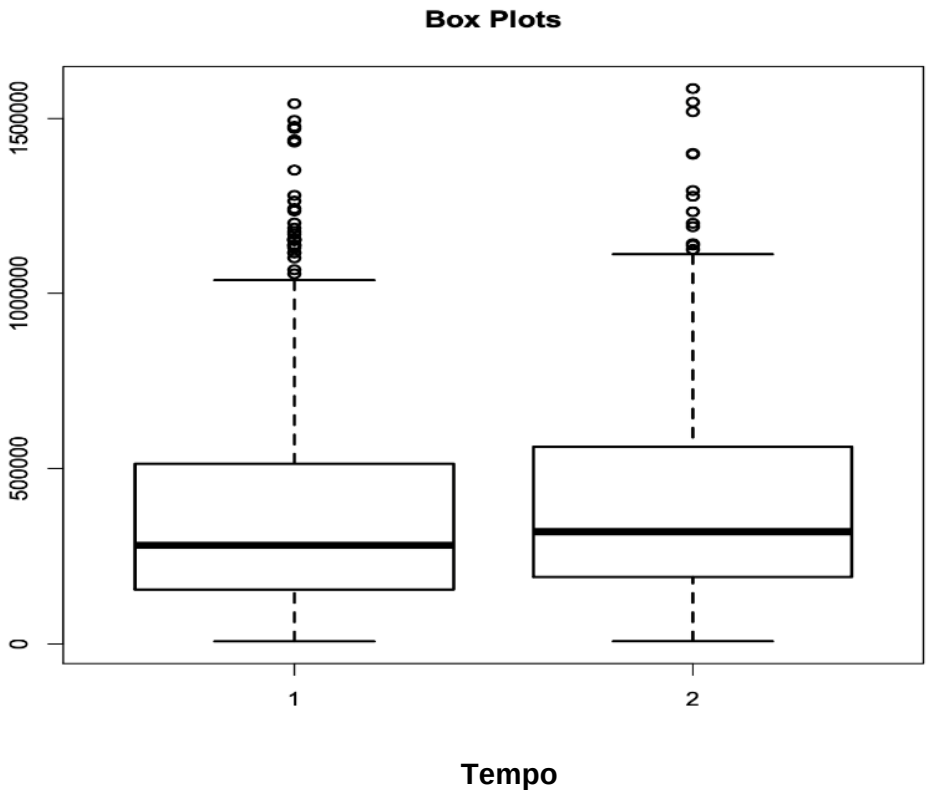
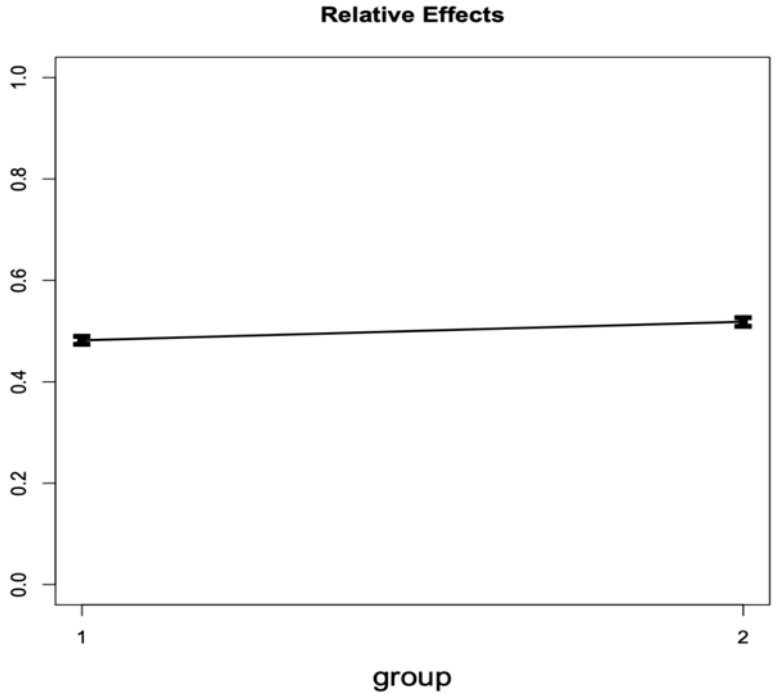


**Figura 8:** Intervalo de confiança de 95% para o efeito relativo do fator tempo sobre a contagem de contagem de micro-organismos (Figura 2), confirmando o resultado do Box Plot.




Para testar a hipótese de ausência de interação do fator tempo (T1 e T2), Wald-Type Statistic (WTS) e ANOVA-Type Statistic (ATS) foram aplicados, conforme a tabela abaixo. A hipótese de ausência de interação foi rejeitada, uma vez que tanto WTS quanto ATS resultaram em valores de $p < 0,05$ (1,02x10-5). Ou seja, o fator tempo foi significativo na contagem dos micro-organismos, que se apresentou aumentada no T2 (15 dias após a instalação do aparelho ortodôntico).

**Tabela 3:** Diferença estatística identificada por meio dos testes de Wald-Type Statistic (WTS) e ANOVA-Type Statistic (ATS), demonstrando que a contagem total de espécies no segundo tempo experimental foi significativamente maior.

| | Contagem total das espécies | WTS e ATS (valor de p) |
|---|---|---|
| **T 1** | 809.781 | 1,02E-05 |
| **T 2** | 871.219 | |

A análise multifatorial realizada por meio do teste GEE (Generalized Estimating Equations) entre tempo e espécies mostrou resultado bastante significativo, no qual 37 das 40 espécies investigadas foram encontradas em quantidade significativamente maior no T2, ou seja, após 15 dias da instalação do aparelho ortodôntico no arco inferior. Apenas as espécies *Eubacterium nodatum* (complexo laranja), *Veillonella parvula* (complexo roxo) *e Staphylococcus intermedius* (complexo amarelo) não se

apresentaram em maior quantidade após 15 dias de tratamento ortodôntico. Todas as demais espécies apresentaram-se mais predominantes sem alteração de significância entre si, exceto pelas espécies *Treponema socranskii* (outras espécies) *e Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum* (complexo laranja) (Figura 9 e Tabela 4).

**Figura 9:** Gráfico Box Plot da análise individual das espécies.

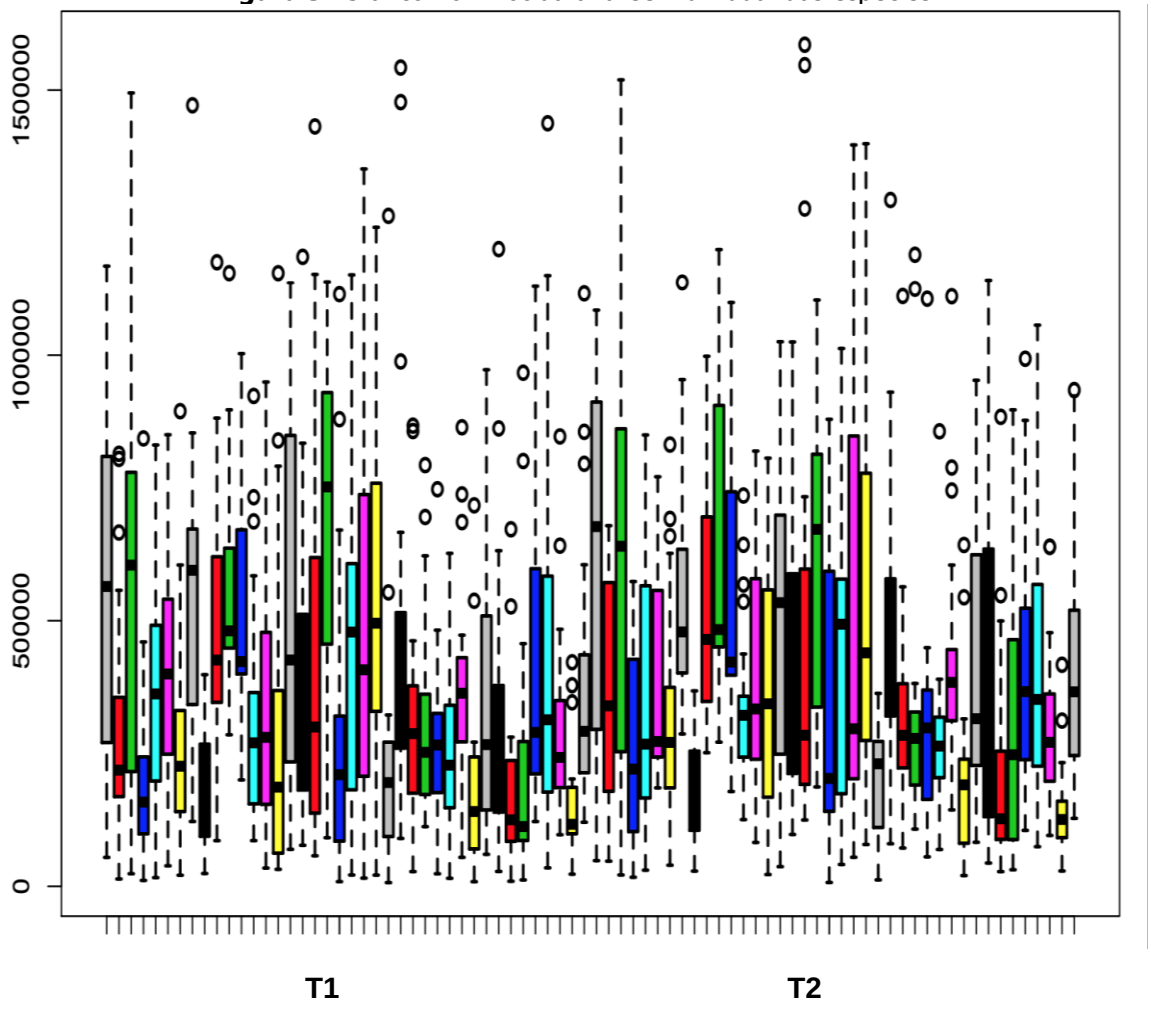
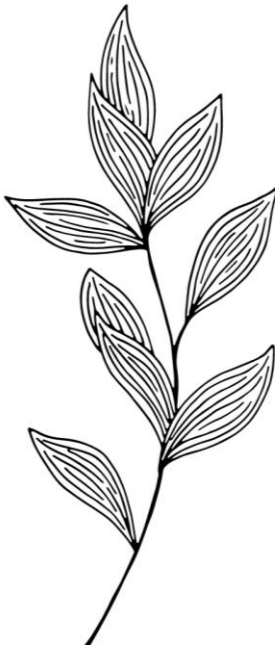


**Tabela 4:** Resultado da análise multifatorial para a comparação das espécies nos dois períodos, por meio do teste GEE (Generalized Estimating Equations). Códigos de significância: 0 '**** 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1.

| Microorganism | *p* value | |
|---|---|---|
| A. naeslundi | < 2e-16 | *** |
| S. costellatus | < 2e-16 | *** |
| E. notadum | 0.612961 | |
| P. gengivalis | < 2e-16 | *** |
| A. actinom | < 2e-16 | *** |
| sp.Vincentin | < 2e-16 | *** |
| C. rectus | < 2e-16 | *** |
| T. socranskei | 0.007060 | *** |
| E. saburreum | < 2e-16 | *** |
| P. micra | 3.10e-07 | ** |
| V. parvela | 0.874439 | |
| A. oris | 1.64e-05 | *** |
| S. anginous | < 2e-16 | *** |
| S. sanguinis | < 2e-16 | *** |
| A. gerencseriae | < 2e-16 | *** |
| S. oralis | 0.000102 | *** |
| C. ochracea | 2.22e-16 | *** |
| A. israelii | < 2e-16 | *** |
| S. intermedius | 0.117863 | |
| T. denticula | < 2e-16 | *** |
| P. nigrescens | < 2e-16 | *** |
| A. odontolyticus | 0.005308 | ** |
| ss. polymorphum | 0.001306 | ** |
| C. showae | < 2e-16 | *** |
| F. periodonticum | 4.89e-07 | *** |
| N. mucosa | < 2e-16 | *** |
| F. nucleatum | < 2e-16 | *** |
| C. gingivalis | < 2e-16 | *** |
| S. gordini | < 2e-16 | *** |
| T. forsythia | < 2e-16 | *** |
| S. noxia | < 2e-16 | *** |
| P. acnes | < 2e-16 | *** |
| P. melaninogenica | < 2e-16 | *** |
| S. mitis | < 2e-16 | *** |
| E. corrodens | < 2e-16 | *** |
| G. morbillorum | < 2e-16 | *** |
| S. sputigena | < 2e-16 | *** |
| L. bucallis | < 2e-16 | *** |
| C. gracillius | < 2e-16 | *** |
| P. intermedia | < 2e-16 | *** |

# 5. Discussão



# 5. DISCUSSÃO

Apesar de todos os esforços de pesquisadores para minimizar os riscos de desenvolvimento de doenças durante o tratamento ortodôntico corretivo com aparelhagem fixa (desenvolvimento de novas técnicas e dispositivos, otimização de materiais de colagem e cimentação de acessórios), o surgimento de alterações periodontais como inflamação e sangramento gengival, aumento de volume e recessão gengival, comumente encontradas em pacientes adolescentes ainda é uma problemática e diversos estudos demonstram que os diferentes dispositivos ortodônticos podem alterar a microbiota bucal qualitativa e quantitativamente (Lovrov et al., 2007; Gomes et al., 2007; Chapman et al., 2010; Kin et al., 2010; Ren et al., 2014; Cerroni et al., 2018; Mei et al., 2019; Voinea-Georgescu et al., 2020).

No entanto, com todos os estudos microbiológicos entorno da utilização de aparelhagem fixa em adolescentes após diferentes períodos, não parece estar elucidado quais são as alterações presentes na microbiota oral de pacientes adolescentes no início do tratamento ortodôntico, mesmo diante de adequadas orientações de higiene bucal.

Por essa razão, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito inicial da instalação de aparelhagem fixa sobre a microbiota oral de adolescentes em condição de saúde periodontal por meio da técnica de hibridização DNA-DNA (checkerboard), tendo dois tempos como período experimental para coleta salivar: previamente à instalação de bráquetes convencionais e após quinze dias do início do tratamento ortodôntico.

Foi confirmada hipótese de que a microbiota bucal seria modificada, visto que após quinze dias de utilização de aparelho ortodôntico fixo, a microbiota bucal dos adolescentes sob tratamento ortodôntico foi alterada e bactérias envolvidas na patogênese da doença periodontal se encontraram em maiores quantidades, o que corrobora com outros estudos que também verificaram essa alteração em períodos maiores de observação (Olmedo, 2009; Perdiza, 2009; Andrucioli, 2009; Kim et al., 2010; Morelli, 2016; Shirozaki et al, 2017; Andrucioli et al., 2018; Bergamo et al., 2018; Bergamo et al., 2019; Jing et al., 2019; Shirozaki et al, 2020; Gujar et al., 2020).

Desde a década de 40 já havia sido observado que após a utilização de bandas

ortodônticas, bactérias acidófilas tinham sua população aumentada no meio bucal em relação a demais bactérias, demonstrando alteração na composição do biofilme, sendo também observado o aumento de lactobacilos e estafilococos durante a utilização de dispositivos fixos, especialmente em adolescentes (Dikeman, 1962). Ainda, diversas outras alterações relacionadas ao biofilme foram observadas por pesquisadores ao longo dos anos: a utilização de aparelhos fixos inferindo no aumento da contagem total de lactobacilos presente na microbiota bucal; a diminuição de contagem total de microrganismos após a remoção desses aparelhos; a relação direta da quantidade de dispositivos ortodônticos empregados com a alteração da microbiota bucal; o aumento de bactérias envolvidas na patogênese da doença cárie e doença periodontal após diferentes períodos de utilização de aparelhos fixos (Adams, 1967, Balenseifen, 1970; Friedman, 1985; Diamanti-Kipioti et al., 1987; Paolantonio et al., 1997; Chang et al., 1999; Sukontapatipark et al., 2001; Hagg, 2004; Chin et al., 2006).

Recentemente, diversos estudos foram publicados e confirmaram a alteração microbiológica da microbiota bucal após a instalação de dispositivos ortodônticos fixos a curto e longo prazo, no entanto, os avanços científicos alcançados nas últimas décadas proporcionam que novas metodologias sejam empregadas para ampla investigação microbiológica de amostras e, com isso, essa linha de pesquisa passou a contar com a análise microbiológica por meio da técnica de hibridização de DNA-DNA Checkerboard, como realizado nesse estudo (Olmedo, 2009; Perdiza, 2009; Andrucioli, 2009; Kim et al., 2010; Lemos, 2014; Morelli, 2016; Shirozaki et al, 2017; Andrucioli et al., 2018; Bergamo et al., 2018; Bergamo et al., 2019; Binda, 2019; Jing et al., 2019; Shirozaki et al, 2020; Gujar et al., 2020).

A escolha dessa ferramenta de análise para a detecção das espécies bacterianas investigadas nesse trabalho se deu justamente pela tentativa de agregar um diferencial ao tema de acordo com o tempo experimental adotado nesse estudo, e porque sua utilização traz vantagens já destacadas por outros autores (Olmedo, 2009; Perdiza, 2009; Andrucioli, 2009; Kim et al., 2010; Nelson-Filho, 2011; Nelson-Filho, 2012; Nelson-filho, 2018), quando comparada ao método convencional de cultura de células, rt-PCR e r-RNA, utilizados por muitos autores para avaliações microbiológicas (Gastel et al., 2007; Gerzson et al., 2015; Shirozaki et al, 2017; Aithal et al., 2019; Bajracharya et al., 2019).

Dentre essas vantagens, ressalta-se a rapidez com a qual a técnica pode ser realizada, possibilidade de se trabalhar com maior quantidade de microrganismos sobre uma mesma amostra, facilidade para utilização e detecção de microrganismos de difícil cultivo, padronização celular dos controles e maior eficiência na quantificação dos dados por meio da utilização de software para a leitura dos filmes radiográficos (do Nascimento, et al., 2010).

É importante frisar que a saliva é uma amostra abundante e de fácil acesso dentro da prática ortodôntica e que o potencial de amostras retiradas da placa dental e saliva em refletir o meio bucal é 2 vezes maior quando comparado a remoção de dispositivos presentes na cavidade bucal, sendo a saliva uma matéria-prima de estudo que pode trazer importantes informações sobre a microbiota bucal (Yang et al., 2012; Zhang et al., 2016; Gao et al., 2016).

No entanto, a técnica de hibridização DNA-DNA Checkerboard também apresenta suas dificuldades, principalmente relacionadas ao custo elevado das sondas bacterianas e a necessidade de treinamento técnico para seu correto desenvolvimento e leitura dos resultados (do Nascimento, et al., 2010). Por essa razão, todo o processamento laboratorial das amostras coletadas até a revelação dos filmes com os resultados pós hibridização, foram realizadas por uma única profissional técnica com ampla experiência em hibridização DNA-DNA Checkerboard.

Atualmente, existe na literatura poucos estudos nos quais o atendimento clínico de todos os participantes foi realizado por um único profissional (Artun e Urbye, 1988; Lemos, 2015). Sabe-se que estudos clínicos prospectivos podem apresentar dificuldades em relação ao estabelecimento de protocolos de tratamento, visto que a participação de mais de um profissional para o atendimento de todos os participantes selecionados pode ser um fator de confusão importante (Boyd et al., 1989; Sallum et al., 2004; Speer et al., 2004; Naranjo et al., 2006; Gong et al., 2011; Baka et al., 2013). Nesse estudo, os participantes foram atendidos por seis alunos do segundo ano do curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, no entanto, sob supervisão de um único orientador e com padronização dos materiais utilizados, bem como a coleta de saliva, que foi realizada por um único profissional.

Também para a minimização de interferências no estudo, houve padronização

da instrução de higiene oral fornecida a todos os participantes, sendo realizada pela pesquisadora responsável previamente ao início do tratamento ortodôntico, visto que diversos estudos apontam para o fato de que a orientação em relação aos cuidados de higiene necessários para a manutenção de saúde bucal durante a utilização de aparelho fixo é extremamente importante para a redução do risco de desenvolvimento de doenças durante o tratamento, especialmente nas fases de pré-adolescência e adolescência, pois alguns autores identificaram que a puberdade é um crítico período para alterações gengivais e doença cárie (Bach, 1953; Bussadori et al., 2005; Chapman et al., 2010; Saiani et al., 2018) e que durante esse período os adolescentes podem apresentar menor interesse por autocuidado em saúde, principalmente quando a insatisfação com a aparência física está presente, como é o caso de muitos pacientes que buscam por tratamento ortodôntico corretivo nesse período (Souza, 1998; Marques et al., 2006; Peres et al., 2008; Borges, Peres, Peres, 2010; De Lira e De Souza, 2020; Atik et al., 2020).

Ações preventivas, educacionais e motivacionais durante o tratamento ortodôntico podem apresentar efeitos significativos de melhora na saúde oral de pacientes ortodônticos (Bardal et al., 2011; Talic et al., 2011). No entanto, nesse estudo as orientações realizadas em relação a higiene bucal necessária após a instalação do aparelho fixo não pareceu ser suficiente para o controle do biofilme, visto que 37 das 40 espécies investigadas apresentaram-se elevada após o período de 15 dias.

Atualmente, temos uma vasta literatura, com estudos antigos e recentes, que torna consistente a associação entre o uso de dispositivos ortodônticos, higienização precária e alteração quantitativa do biofilme dentário. Ainda, é bastante explorada que as alterações presentes no biofilme podem estar relacionadas a sua morfologia, composição e atividade metabólica (Adams, 1967, Balenseifen e Madonia, 1970; Friedman, 1985; Diamanti-Kipioti et al., 1987; Paolantonio et al., 1997; Chang et al., 1999; Campbel, 2001; Sukontapatipark et al., 2001; Hagg, 2004; Chin et al., 2006; Thornberg et al., 2009; Ristic et al., 2007; Freitas, 2012; Andrucioli et al., 2018; Binda, 2019; Jing et al., 2019; Shirozaki et al., 2020).

Estudos que também envolveram análise salivar, observaram que determinadas espécies de microorganismos se sobressaíram sobre outras após o

tratamento ortodôntico, especialmente, *S. mutans, S. sobrinus, L. casei and L. acidophilus*, *Prevotella nigrescens, Pseudomonas putida, Fusobacterium periodonticum, Pseudomonas aeruginosa, Peptostreptococcus anaerobius, Tanerella forsythia, Porphyromonas gingivalis* (Pandis, 2010; Nelson-Filho, 2011; Nelson-Filho 2012; Bergamo et al., 2019; Jing et al., 2019), o que corrobora com a revisão de literatura realizada por Freitas (2012), na qual conclui-se que a presença de aparelhos fixos e sua interferência na quantidade e qualidade da microbiota bucal é moderadamente evidenciada pela literatura.

Desse modo, a elevação na contagem microbiológica total observada neste estudo após 15 dias da instalação de aparelho ortodôntico fixo não surpreendeu, em relação ao conhecimento trazido pelos estudos previamente existentes. No entanto, esse estudo buscou não apenas avaliar a contagem total de microrganismos, mas quais, dentre as espécies investigadas sofreriam alterações nesse período inicial, visto que diversos autores sugerem a necessidade de maiores estudos acerca das alterações presentes na microbiota oral após a instalação de aparelhos fixos e que muitos dos estudos microbiológicos presentes na literatura não utilizaram a metodologia de hibridização DNA-DNA checkerboard para investigação (Gastel et al., 2007; Liu et al., 2011; Freitas et al, 2012; Gerzson et al., 2015; Shirozaki et al, 2017; Aithal et al., 2019; Bajracharya et al., 2019; Jing et al., 2019).

É importante ressaltar que mesmo os estudos recentes que utilizaram da técnica de hibridização DNA-DNA checkerboard para a análise microbiológica, utilizaram períodos experimentais bastante diferentes do adotado nesta pesquisa, na maioria das vezes, realizando coletas após 30, 60, 90 ou 180 dias (Olmedo, 2009; Perdiza, 2009; Andrucioli, 2009; Kim et al., 2010; Morelli, 2016; Shirozaki et al, 2017; Andrucioli et al., 2018; Bergamo et al., 2018; Bergamo et al., 2019; Jing et al., 2019; Shirozaki et al, 2020; Gujar et al., 2020). Desse modo, as alterações microbiológicas significantes observadas nesse estudo, mesmo dentro de um período curto de observação, podem representar um alerta para a prática clínica do ortodontista, pois ainda que manifestações clínicas não estejam presentes, a doença periodontal pode já estar se desenvolvendo.

Desta forma, os ortodontistas devem controlar a higiene do paciente desde o início do tratamento pois, o aparecimento de doenças periodontais pode iniciar assim

que o aparelho fixo for instalado, e devem compreender que essa é uma problemática que merece atenção constante, em todas as faixas etárias, não apenas durante tratamento de pacientes adultos. Principalmente, porque dentro da perspectiva da prevenção de doenças e promoção de saúde, não se deve esperar pelo estabelecimento de sinais clínicos evidentes, mas compreender que a dificuldade de higienização bucal após a instalação de dispositivos ortodônticos é capaz de alterar precocemente o nível de microrganismos patogênicos na microbiota bucal do hospedeiro, o que configura o início da doença que posteriormente é observada pelos sinais clínicos.

Em 2018 e 2019, Bergamo et al. utilizou a técnica de checkerboard para avaliar se a presença de bráquetes modifica a microbiota bucal aumentando o risco à doença cárie e doença periodontal e se o design dos bráquetes influenciava no acúmulo do biofilme, respectivamente. Em 2018, concluiu que pacientes adolescentes que não estavam sob o protocolo de prevenção estabelecido no estudo apresentaram aumento significativo de *Prevotella nigrescens, Pseudomonas putida, Fusobacterium periodonticum, Pseudomonas aeruginosa, Peptostreptococcus anaerobius*, e *Tanerella forsythia*. E que, sob o uso de bochechos com clorexidina, apenas a *Porphyromonas gingivalis* apresentou-se elevada após o período de 60 e 90 dias. Em 2019, concluiu também que o design do bráquete autoligado tornava a colonização por bactérias do complexo vermelho mais comum. Nesse trabalho, bactérias de todos os complexos encontraram-se elevadas, no entanto, todas as bactérias do complexo vermelho apresentaram aumento bastante significativo.

Estudos que demonstraram que o uso do sistema autoligado pode oferecer maiores riscos ao paciente em relação a doença periodontal (Gastel et al., 2007; Gastel et al., 2008; Bajracharya et al., 2019). Nesta pesquisa, o bráquete utilizado para o tratamento ortodôntico foi o convencional, especialmente por não haver na literatura indicação de um modelo fixo que não ofereça o risco de maior adesão microbiana e por esse ser o modelo ainda mais utilizado na ortodontia.

Apesar de alguns estudos utilizarem tempos experimentais maiores do que o proposto nesse projeto, em geral, realizando coletas após 30, 60, 90 ou 180 dias (Olmedo, 2009; Perdiza, 2009; Andrucioli, 2009; Kim et al., 2010; Morelli, 2016; Shirozaki et al, 2017; Andrucioli et al., 2018; Bergamo et al., 2018; Bergamo et al.,

2019; Jing et al., 2019; Shirozaki et al, 2020; Gujar et al., 2020). Estudos com parâmetros clínicos observaram alterações compatíveis com o estágio inicial de gengivite após 7, 10 e 20 dias da instalação de dispositivos ortodônticos (Bergamo et al., 2019; Gökçe et al., 2019; Shirozaki et al, 2020).

Ou seja, tomando como base que as bactérias são essenciais para o desenvolvimento da doença periodontal, ainda que fatores relacionados a características individuais, sistêmicas, sociais, comportamentais e fatores psicológicos exerçam uma influência na extenção e severidade da doença (Diamanti-kipioti et al., 1987; Soares et al., 2009; Ghijselings, et al., 2014), alterações microbiológicas devem ocorrer antes do período de 30 dias, como observado nesta pesquisa. Desta forma, os ortodontistas devem se atentar precocemente quanto ao aparecimento de doenças periodontais e compreender que essa é uma problemática que merece atenção constante, e não apenas durante tratamento de pacientes adultos.

Nesse estudo, 37 das 40 espécies investigadas apresentaram-se aumentadas após o período de 15 dias de tratamento ortodôntico com bráquetes convencionais, e dentre essas espécies, bactérias pertencentes ao complexo vermelho e laranja. É importante enfatizar que, apesar das instruções de higiene oral, os participantes do estudo não estavam sob uso de clorexidina e que, de acordo com a literatura, essa utilização poderia impactar nos resultados encontrados por meio da redução de microrganismos (Perdiza, 2009; Olmedo, 2009).

Alguns estudos recentes que tiveram a mesma temática abordada em suas buscas, também encontraram algumas espécies bacterianas elevadas após a utilização de aparelho fixo, como S. mutans, *S. sanguinis, S. orallis e S. gordinii, P. nigrescens, P. putida, F. periodonticum, P. aeruginosa, P.anaerobius*, e *T. forsythia* (Bergamo et al., 2018; Bergamo et al., 2019). No entanto, a diferença em relação a quantidade de espécies que se encontraram elevadas pode estar associado aos diferentes métodos de análises utilizados e até mesmo à limitação em relação a quantidade de espécies utilizadas, visto que o grande diferencial que a técnica de hibridização DNA-DNA Checkerboard oferece é a possibilidade de investigação de um maior número de microrganismos sobre uma mesma amostra.

Em 2009, um estudo realizado por Perdiza et al. utilizou o mesmo período experimental proposto nesse trabalho e, do mesmo modo, por meio da técnica de

checkerboard identificou que a maioria das sondas utilizadas estavam presentes em aparelhos removíveis que não estavam sob o protocolo de desinfecção com clorexidina. Mas, além da diferença entre o tipo de aparelho utilizado, os participantes desse estudo eram crianças e mesmo com o protocolo de desinfecção estabelecido, *S. sanguinis, S. orallis e S. gordinii* se apresentaram elevadas em todas as amostras coletadas, o que pode indicar aumento na quantidade de biofilme, mas não necessariamente ao risco de doenças periodontais.

A dificuldade em discutir os resultados encontrados com estudos que tiveram participantes crianças e adultos, mesmo com a utilização da técnica de checkerboard, é justamente porque alguns autores observaram que adolescentes em tratamento ortodôntico apresentaram maior risco de desenvolver essas alterações quando comparados aos pacientes que iniciaram o tratamento mais tardiamente (Bach, 1953; Chapman et al., 2010).

Estudos investigaram alterações microbiológica e parâmetros clínicos precocemente, com tempos experimentais de 3 e 7 dias, e demonstraram que após a instalação de aparelhos fixos em adultos jovens, a formação de colônias de bactérias anaeróbias e aeróbias esteve presente em ambos tempos, e em maior quantidade após 7 dias, bem como a presença de sangramento gengival (Gastel et al., 2007; Gökçe e Kaya, 2019). Mas é válido ressaltar que a técnica de hibridização DNA-DNA não foi realizada e que os microrganismos presentes não foram especificados. Portanto, torna-se difícil o embasamento dos resultados encontrados aqui com base em modelos de estudo tão diferentes.

No último ano, alguns estudos foram publicados sobre essa temática e verificaram aumento de espécies bacterianas após o início do tratamento ortodôntico com aparelhagem fixa, no entanto, novamente as diferenças entre número amostral, metodologia de análise e tempo experimental estão presentes (Reichardt et al., 2019; Gujar et al., 2020; Voinea-Georgescu et al., 2020; Adams et al., 2020)

A decisão de explorar o período inicial da terapia ortodôntica com aparelho fixo foi tomada justamente porque estudos envolvendo parâmetros clínicos apontam para o fato de que as alterações iniciais podem ser observadas após 3, 7, 10 e 20 dias do uso do aparelho fixo ortodôntico (Gastel et al., 2007; Bortoluzzi et al., 2013; Gökçe e Kaya, 2019), ou seja, o período de 30 dias adotado em muitos estudos para a

primeira coleta salivar engloba um período em que a doença, ainda que aguda, já se encontra instalada e o interesse deste estudo foi justamente poder contribuir com a avaliação previamente ao estabelecimento clínico da gengivite.

No entanto, apesar dos resultados serem claros ao apontar o aumento significativo de bactérias após 15 dias de tratamento ortodôntico, não é possível afirmar, com bases nos dados, que o risco para o desenvolvimento de doença periodontal foi, também, aumentado. Isso porque as bactérias selecionadas para a investigação nesse estudo englobaram todos os complexos bacterianos e espécies comumente encontradas no meio bucal. O aumento detectado pela maioria das sondas envolveu espécies distribuídas em todos os complexos. Desse modo, bactérias associadas a doença periodontal como *Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Campylobacter rectus, Prevotella nigrescens, Tannerella forsythia e Treponema denticola* (Page et al., 1987; Socransky et al., 2005; Marsh et al., 2011; Meyle et al., 2015) se encontrarem elevadas no segundo tempo experimental, bem como bactérias dos complexos amarelo, verde, roxo e também se elevaram e pouca diferença estatística entre as espécies foi evidenciada.

Apenas as bactérias *Eubacterium nodatum* (complexo laranja), *Veillonella parvula* (complexo roxo) *e Staphylococcus intermedius* (complexo amarelo) não se apresentaram elevadas no segundo tempo de coleta e entre as bactérias que apresentaram aumento significante, apenas *Treponema socranskii* (outras espécies) *e Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum* (complexo laranja) apresentaram significância menor quando comparadas as demais.

Sobre esses resultados, é importante ressaltar que, apesar de *Veillonella parvula* ser observada em condição de gengivite e periodontite crônica, essa espécie também se encontra presente em condição de saúde periodontal (Abusleme et al., 2013; Hong et al., 2015; Curtis et al., 2020), bem como as espécies *Eubacterium nodatum* e *Staphylococcus intermedius*, que também não apresentaram aumento significante nesse estudo. Esses achados podem apontar para um desequilíbrio na homeostase da microbiota bucal, visto que, corroborando outros estudos, bactérias associadas a gengivite (Abusleme et al., 2013; Hong et al., 2015; Curtis et al., 2020) apresentaram aumento significativo como *Fusobacterium nucleatum ss. polymorphum*,

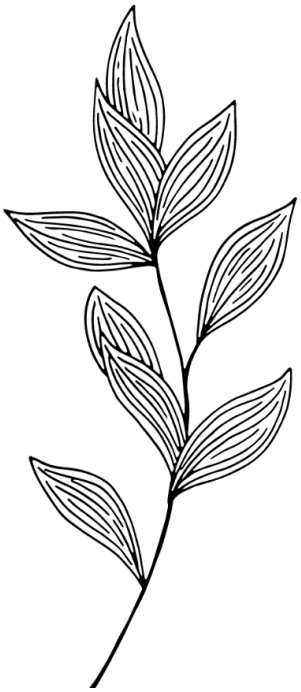
Aggregatibacter actinomyces, sp. *Fusobacterium nucleatum ss* vincentii, *Streptococcus sanguinis*, F. periodonticum, *Capnocytophaga gengivalis*; bem como bactérias associadas a doença periodontal (Abusleme et al., 2013; Hong et al., 2015; Curtis et al., 2020), como *Prevotella nigrescens, Prevotella melaninogenica, Porphyromonas gengivalis, Treponema denticula, Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum ss Vincentii.*

Essas observações corroboram com outros estudos já realizados, que identificaram a presença de bactérias não patogênicas presentes após a instalação de aparelhos fixos (Lemos, 2014; Gerzson et al., 2015; Gujal et al., 2020). Mas, levando-se em conta que a doença surge da quebra da ruptura na homeostase microbiana da cavidade oral (Bergamo et al., 2019) é possível inferir o risco aumentado para a doença periodontal diante da perspectiva qualitativa e quantitativa do biofilme, visto que todos os complexos apresentaram-se aumentados no T2.

Ainda que autores (Boyd et al., 1989; Ristic et al., 2007) afirmem que em algum momento do tratamento ortodôntico pacientes tendam a vivenciar alguma patologia gengival, a literatura presente até esse momento parece apontar para uma lacuna de conhecimento em relação as alterações iniciais na microbiota bucal após o início do tratamento ortodôntico, o que poderia trazer importantes informações para o estabelecimento de protocolo de prevenção em relação ao momento mais oportuno para sua aplicação, visto que o início do tratamento também pode representar o período de adaptação do paciente quanto a higienização bucal com a presença de novos dispositivos em seu meio e que a prevenção, detecção precoce e controle precoce pode resultar em uma população adulta mais saudável do ponto de vista da saúde oral (Soares et al.; 2009).

Portanto, por meio desse estudo clínico prospectivo é possível destacar a importância de mais investigações acerca da temática abordada, com desenhos de estudos que possam explorar de forma mais profunda as alterações qualitativas da microbiota bucal e como elas se relacionam com o aparecimento de sinais clínicos iniciais de alterações periodontais.

# 6. Conclusão



## 6. CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos no presente estudo em adolescentes, pôde-se concluir que a montagem do aparelho ortodôntico fixo foi capaz de aumentar, significativamente, os níveis salivares totais de microrganismos após 15 dias da instalação deste aparelho, dentre eles bactérias envolvidas direta ou indiretamente com a doença periodontal.

# Referências

## REFERÊNCIAS

Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, Diaz PI. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. The ISME journal. 2013; 7(5): 1016-1025.

Adams RJ. The effects of fixed orthodontic appliances on the carogenicity, quantity and microscopic morphology of oral lactobacilli. Journal of oral medicine. 1967; 22(3): 88-99.

Aimetti M, Garbo D, Ercoli E, Grigorie MM, Citterio F, Romano F. Long-Term Prognosis of Severely Compromised Teeth Following Combined Periodontal and Orthodontic Treatment: A Retrospective Study. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry. 2020; 40(1): 94-102.

Akin M, Tazcan M, Ileri Z, Ayhan F. Incidence of white spot lesion during fixed orthodontic treatment. Turkish J Orthod Vol. 2013; 26(2): 98-102.

Amorim FPLG, Ornellas SS, Diniz SF, Batista AC, Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetics rats. J Mol Hist. 2008; 39(4):401-408.

Andrucioli MCD, Matsumoto MAN, Saraiva MCP, Feres M, Figueiredo LCD, Sorgi CA et al. Successful and failed mini-implants: microbiological evaluation and quantification of bacterial endotoxin. Journal of Applied Oral Science. 2018; 26:e20170631:1-9.

Andrucioli MCD, Nelson-Filho P, Matsumoto MAN, Saraiva MCP, Feres M, De Figueiredo LC et al. Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2012;141(1): 24–29.

Araújo MG, Sukekava F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. Periodontia. 2007; 17(2): 7-13.

Artun, J, Urbye Ks. The effect of orthodontic treatment on periodontal bone support in patients with advanced loss of marginal periodontium. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1988; 93(2):143-8.

Atik E, Önde MM, Domnori S, Tutar S, Yiğit OC. A comparison of self-esteem and social appearance anxiety levels of individuals with different types of malocclusions. Acta Odontologica Scandinavica. 2020; 1-7.

Bach EN. Incidence of caries during orthodontic treatment. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 1953; 39(10): 756-778.

Bajracharya M, Gorkhali RS, Khanal A, Shrestha N, Parajuli U. Periodontal Parameters Alterations with Use of Conventional Bracket and Self-ligating Brackets. Orthodontic Journal of Nepal. 2019; 9(2): 6-12.

Baka ZM, Basciftci FA, Arslan U. Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: a quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2013; 144(2): 260-267.

Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. Journal of dental research. 1970; 49(2): 320-324.

Bardal PAP, Olympio KPK, Bastos JRDM, Henriques JFC, Buzalaf MAR. Education and motivation in oral health: preventing disease and promoting health in patients undergoing orthodontic treatment. Dental Press Journal of Orthodontics. 2011; 16(3): 95-102.

Barreto RM, Cavalcante ASP, Mira QLM, Vasconcelos MIO, Brito MDCC. Ações educativas em saúde para o público adolescente: uma revisão integrativa. Revista de APS. 2016; 19(2): 277-285.

Bergamo AZN, de Oliveira KMH, Matsumoto MAN, Nascimento CD, Romano FL, da Silva RAB et al. Orthodontic appliances did not increase risk of dental caries and periodontal disease under preventive protocol. The Angle Orthodontist. 2019; 89(1): 25-32.

Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Thilander B, Liljenberg B. Periodontal tissue reactions to orthodontic extrusion. An experimental study in the dog. J Clin Periodontol. 1991; 18: 330-336.

Binda CL. Avaliação da condição periodontal e da microbiota subgengival em Adolescentes tratados ortodonticamente com aparelho fixo. Dissertação [Mestrado em Clínica Odontológica] - Universidade Federal do Espírito Santo; 2019.

Borges CM, Peres MA, Peres KG. Associação entre presença de oclusopatias e insatisfação com a aparência dos dentes e gengivas: estudo com adolescentes brasileiros. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2010; 13: 713-723.

Bortoluzzi GS, Ortiz JS, Lazzaretti DN, Silva CPC. Mecânica Ortodôntica para Pacientes Comprometidos Periodontalmente. J Oral Invest. 2013; 2(1): 17-25.

Box HK. Twelve periodontal studies. The University of Toronto Press, 1940.

Boyd RL, Leggott PJ, Quinn RS, Eakle WS, Chambers D. Periodontal implications of orthodontic treatment in adults with reduced or normal periodontal tissues versus those of adolescents. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 1989; 96(3): 191-198.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003; 15:337-42.

BRASIL. SB Brasil 2010: Pesquisa nacional de saúde bucal: resultados principais; 2012.

Brêtas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MAN. Effect of 0.4% stannous fluoride gel on Streptococci mutans in relation to elastomeric rings and steel ligatures in orthodontic patients. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics.

2005; 127(4): 428-433.

Bussadori SK, Masuda MS. Manual de odontohebiatria. São Paulo: Santos, 2005. 171p.

Campbel CHCT. Alterações da microflora bucal em pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo. Ortodontia Gaúcha-Revista da Sogaor. 2009; 7(2): 98-109.

Cardoso RM, Cardoso RM, Benevides MPS, Vajgel BCF, Souza CA, de Souza PRE, Cimões R. A presença de aparelhos ortodônticos fixos altera a microbiota gengival em nossos pacientes? Revista Clínica de Ortodontia Dental Press. 2019; 18(1): 124-131.

Cerroni S, Pasquantonio G, Condò R, Cerroni L. Orthodontic fixed appliance and periodontal status: an updated systematic review, Open Dental J. 2018; 12:614–622.

Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. Enamel demineralization during orthodontic treatment. Aetiology and prevention. Australian Dental Journal. 1997; 42(5): 322-327.

Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, González-Cabezas CJA. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2010; 138(2): 188-194.

Chin MY, Busscher HJ, Evans R, Noar J, Pratten J. Early biofilm formation and the effects of antimicrobial agents on orthodontic bonding materials in a parallel plate flow chamber. The European Journal of Orthodontics. 2006; 28(1): 1-7.

Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. Periodontology 2000. 2020; 83(1): 14-25.

De Lira ALS, De Sousa FDC. Evaluation of the influence of malocclusion in interpersonal relations among adolescents. Brazilian Dental Science. 2020; 23(1): 9.

Diamanti-Kipioti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. Journal of Clinical Periodontology. 1987; 14(6): 326-333.

Dicu DR; Lazăr AP, Lazăr L. Incidence of Periodontal Disease among Adolescents. Journal of Interdisciplinary Medicine. 2020; 5(2): 71-75.

Dikeman, TL. A study of acidogenic and aciduric microorganisms in orthodontic and non-orthodontic patients. Am J Orthod. 1962; 48(8): 627-629.

Do Nascimento C, De Albuquerque RF, Monesi N, Candido-Silva JA. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. Journal of clinical microbiology. 2010; 48(8): 3039-3040.

Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. Osteoporos Int. 2002; 13:688-700.

Elias LS, Costa RF, Carvalho MA, Batista AC, Silva TA, Leles CR, Mendonça EF. Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. Oral Surg Oral Med Patol Oral Rad Endo. 2010; 110(5):624-31.

Feu D, Oliveira BHD, Sales HX, Miguel JAM. Más-oclusões e seu impacto na qualidade de vida de adolescentes que buscam tratamento ortodôntico. Ortodontia. 2008; 41(4): 355-365.

Freitas AOAD, Marquezan M, Nojima MDCG, Alviano DS, Maia LC. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: a systematic review. Dental press journal of orthodontics. 2014; 19(2): 46-55.

Friedman M, Harari D, Raz H, Golomb G, Brayer L. Plaque inhibition by sustained release of chlorhexidine from removable appliances. Journal of dental research. 1985; 64(11): 1319-1321.

Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS. Salivary biomarkers for dental caries. Periodontology 2000. 2016; 70(1): 128-141.

Garbin CAS, Garbin AJI, Moimaz SAS, Gonçalves PE. A saúde na percepção do adolescente. Physis: revista de saúde coletiva. 2009; 19:227-238.

Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. Eur J Oral Sci. 2007; 115:355-362.

Gerzson DRS, Simon D, dos Anjos AL, Freitas MPM. In vitro evaluation of microbial contamination of orthodontic brackets as received from the manufacturer using microbiological and molecular tests. The Angle Orthodontist. 2015; 85(6): 992-996.

Ghijselings E, Coucke W, Verdonck A, Teughels W, Quirynen M, Pauwels M et al. Long-term changes in microbiology and clinical periodontal variables after completion of fixed orthodontic appliances. Orthodontics & craniofacial research, 2014; 17(1): 49-59.

Gibbin FE. Control of caries during orthodontic treatment. International Journal of Orthodontia and Oral Surgery. 1937; 23(12): 1205-1211.

Gibertoni F, Sommer MEL, Esquisatto MAM, Amaral MECD, Oliveira CAD, Andrade TAMD, Felonato M et al. Evolution of periodontal disease: immune response and RANK/RANKL/OPG system. Brazilian Dental Journal. 2017; 28(6): 679-687.

Gökçe B, Kaya B. Periodontal effects and survival rates of different mandibular retainers: comparison of bonding technique and wire thickness. European Journal of Orthodontics. 2019; 41(6): 591-600.

Gomes SC, Varela CC, Da Veiga SL, Rösing CK, Oppermann RV, Periodontal conditions in subjects following orthodontic therapy. A preliminary study, Eur. J. Orthod. 2007; 29(5): 477–481.

Gomes ZMR, da Silva Felipe L, Coura LR, Morais AMD, Honda R, Tiago CM. Inter-relação ortodontia e periodontia: revisão de literatura. Journal of Orofacial Investigation. 2017; 4(1): 30-40.

Gong Y, Lu J, Ding X. Clinical, microbiologic, and immunologic factors of orthodontic

treatment-induced gingival enlargement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011; 140(1):58-64.

Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. American journal of orthodontics. 1982; 81(2): 93-98.

Gujar AN, Al-Hazmi A, Raj AT, Patil S. Microbial profile in different orthodontic appliances by checkerboard DNA-DNA hybridization: An in-vivo study. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2020; 157(1): 49-58.

Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of Candida species and Enterobacteriaceae. The European Journal of Orthodontics. 2004; 26(6): 623-629.

Hong BY, Araujo MVF, Strausbaugh LD, Terzi E, Ioannidou E, Diaz PI. Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. PloS one. 2015; 10(5), e0127077.

Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. Peridontol. 2000; 41:48-72.

Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Lei L, Zhao Z. Effect of fixed orthodontic treatment on oral microbiota and salivary proteins. Experimental and therapeutic medicine. 2019; 17(5): 4237-4243.

Kim K, Heimisdottir K, Gebauer U, Persson GR. Clinical and microbiological findings at sites treated with orthodontic fixed appliances in adolescents. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2010; 137(2): 223-228.

Kupietzky A, Majumdar AK, Shey Z, Binder R, Matheson PB. Colony forming unit levels of salivary Lactobacilli and Streptococcus mutans in orthodontic patients. J Clin Pediatr Dent. 2005; 30:51-53.

Lascala CE, Belluzzo RHL, Lascala Jr NT. Procedimentos de motivação e higiene bucal em pacientes sob tratamento ortodôntico objetivando a saúde periodontal. Revista Periodontia, Fortaleza. 1996; 5(4): 324-327.

Lemos MM. Influência da terapia ortodôntica sobre o periodonto de indivíduos periodontalmente saudáveis ou em fase de terapia de manutenção periodontal. avaliação clínica, microbiológica e radiográfica. Tese [Doutorado em Odontologia] – Universidade Guarulhos; 2015.

Liu H, Sun J, Dong Y, Lu H, Zhou H, Hansen BF et al. Periodontal health and relative quantity of subgingival Porphyromonas gingivalis during orthodontic treatment. The Angle Orthodontist. 2011; 81(4): 609-615.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. Journal of Periodontology, Indianápolis. 1965; 36:177-187.

Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal

disease. Periodontology 2000. 2020; 83(1): 26-39.

Lovrov S, Hertrich K, Hirschfelder U. Enamel demineralization during fixed orthodontic treatment–incidence and correlation to various oral-hygiene parameters. Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie. 2007; 68(5): 353-363.

Marín C, Papadopol PM, Bottan ER, Orcina BF. Percepção e informação sobre saúde bucal: estudo com adolescentes de uma escola pública. Saúde e Pesquisa. 2016; 9(3): 499-506.

Maringolo ACR. Tratamento ortodôntico com aparelhos fixos como fator de risco para recessão gengival: uma revisão sistemática. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Odontologia] - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde; 2018.

Marques LS, Ramos-Jorge ML, Paiva SM, Pordeus IA. Malocclusion: esthetic impact and quality of life among Brazilian schoolchildren. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2006; 129(3): 424-427.

Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. Periodontology 2000. 2011; 55(1): 16-35.

Martínez JC, González MC, Rodríguez HGH, Ibarra JZ. Estudio epidemiológico de las enfermedades periodontales en pacientes que acuden a la facultad de estomatología de la UASLP. Revista de la Asociación Dental Mexicana. 2000; 57(6): 205-213.

Mei L, Chieng J, Wong C, Benic G, Farella M. Factors affecting dental biofilm in patients wearing fixed orthodontic appliances. Progress in Orthodontic. 2017; 18 (4): 1-6.

Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000. 2015; 69(1): 7-17.

Morelli RFB. Avaliação microbiana de ligaduras elastoméricas estéticas por meio da técnica checkerboard DNA-DNA hybridization: estudo in vivo. Dissertação [Mestrado em Odontopediatria] - Universidade de São Paulo; 2016.

Mota IR, Morais RAD. A influência do tratamento ortodôntico na doença periodontal. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Odontologia] - Centro Universitário São Lucas, Porto Velho; 2017.

Moyers RE. Ortodontia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. 483p.

Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2006; 130(3):17-22.

Nelson-Filho P, Carpio-Horta KO, Andrucioli MCD, Feres M, da Silva RAB, Paula-Silva FWG, Romano FL. Molecular detection of Aggregatibacter actinomycetemcomitans on metallic brackets by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2012;142:481–486.

Nelson-Filho P, Olmedo LY, Andrucioli MC, Saraiva MDCP, Matsumoto MAN, De Queiroz AM et al. Use of the checkerboard DNA-DNA hybridisation technique for in vivo detection of cariogenic microorganisms on metallic brackets, with or without use of an antimicrobial agent. J Dent. 2011; 39:513–517.

Nelson-Filho P, Valdez RMA, Andrucioli MCD, Saraiva MCP, Feres M, Sorgi CA et al. Gramnegative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without an antimicrobial agent: an in-vivo study. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011;140:e281–e287.

Noyes HJ. Dental caries and the orthodontic patient. The Journal of the American Dental Association and The Dental Cosmos. 1937; 24(8): 1243-1254.

Ogaard B. Marginal bone support and tooth lengths in 19-year-olds following orthodontic treatment. Eur J Orthod. 1988; 10(3):180-186.

Olmedo LYG. Detecção de microrganismos cariogênicos em bráquetes metálicos, com ou sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica checkerboard DNA-DNA hybridization-Estudo in vivo. Tese [Doutorado em Odontopediatria] – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2009.

Olympio KPK, Bardal PAP, Henriques JFC, Bastos JRDM. Prevenção de cárie dentária e doença periodontal em Ortodontia: uma necessidade imprescindível. Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial. 2006; 11(2): 110-119.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontology 2000. 1997; 14(1): 216-248.

Pandis N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and selfligating brackets. Eur J Orthod. 2010; 32:94–9.

Paolantonio M, Pedrazzoli V, di Murro C, di Placido G, Picciani C, Catamo G, Piccolomini R. Clinical significance of Actinobacillus actinomycetemcomitans in young individuals during orthodontic treatment: A 3-year longitudinal study. Journal of clinical periodontology. 1997; 24(9): 610-617.

Pedrosa BRV, Deama NS, Goés PSA, Filgueiras LV. Factors associated with gingival bleeding in adolescents. RGO-Revista Gaúcha de Odontologia. 2019; 67:e20190034: 1-7.

Perdiza M. Avaliação da contaminação microbiana de aparelhos ortodônticos removíveis, com e sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization-Estudo Clínico Randomizado. Tese [Doutorado em Odontopediatria] – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2009.

Peres KG, Peres MA, Araujo CLP, Menezes AMB, Hallal PC. Social and dental status

along the life course and oral health impacts in adolescents: a population-based birth cohort. Health and Quality of Life Outcomes. 2009; 7(95): 1-10.

Petti S, Barbato E, Simonetti D'Arca A. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. New Microbiol. 1997;20:55–62.

Reichardt E, Geraci J, Sachse S, Rödel J, Pfister W, Löffler B, Wolf M. Qualitative and quantitative changes in the oral bacterial flora occur shortly after implementation of fixed orthodontic appliances. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2019; 156(6): 735-744.

Ren Y, Jongsma MA, Mei L, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation—a potential public health threat? Clinical oral investigations. 2014; 18(7): 1711-1718.

Richter AE, Arruda AO, Peters MC, Sohn W. Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2011; 139(5): 657-664.

Ristic M, Svabic MV, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. Orthod & Craniofac Res Oxford. 2007; 10(4): 187-195.

Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary Streptococcus mutans levels in patients before, during and after orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1991; 100:35–7.

Saiani RAS, de Queiroz AM, Raffaini MSGG, Bagatin-Rossi CR. Odontohebiatria: uma nova especialidade na odontologia. Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo. 2018; 20(1): 60-65.

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

Shirozaki MU, da Silva RAB, Romano FL, da Silva LAB, De Rossi A, Lucisano MP, Júnior ABN. Clinical, microbiological, and immunological evaluation of patients in corrective orthodontic treatment. Progress in Orthodontics. 2020; 21(1): 1-8.

Soares D, Andrade C, Pinto AR, Seabra M, Macho V. Doenças da gengiva e periodonto em crianças e adolescentes. Acta Pediatr Port. 2009; 40(1): 23-29.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000. 2005; 38(1): 135-187.

Speer C, Pelz K, Hopfenmuller W, Holtgrave E-A. Investigation on the influencing of the Subgingival Microflora in chronic periodontitis. A study in adult patients during fixed appliance therapy. J Orofac Orthop. 2004; 65:34-47.

Sukontapatipark W, El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. The European Journal of Orthodontics. 2001; 23(5): 475-484.

Talic NF. Adverse effects of orthodontic treatment: a clinical perspective. The Saudi dental journal. 2011; 23(2): 55-59.

Thornberg MJ, Riolo CS, Bayirli B, Riolo ML, Van Tubergen EA, Kulbersh R. Periodontal pathogen levels in adolescents before, during, and after fixed orthodontic appliance therapy. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics. 2009; 135(1): 95-98.

Topaloglu-Ak A, Ertugrul F, Eden E, Ates M, Bulut H. Effect of orthodontic appliances on oral microbiota 6-month followup. J Clin Pediatr Dent. 2011;35:433–436.

Uetanabaro T, Martins JES, Andrade JLF. Acúmulo de placa bacteriana em pacientes portadores de colagem e anéis convencionais. Revista Gaúcha de Odontologia, Porto Alegre. 1984; 32(2): 161-166.

Vincent-Bugnas S, Borsa L, Gruss A, Laurence LUPI. Prioritization of risk factors of gingival hyperplasia during orthodontic treatment: the role of biofilm. BMC Oral Health. 2020; 2:1-15.

Voinea-Georgescu R, Cumpătă CN, Răescu M, Tuculina MJ, Dascălu IT, Gheorghiță LM, Gheorghe AR et al. Orthodontic treatment and periodontal disease–between advantages and disadvantages. Romanian Journal of Military Medicine. 2020; 123(2): 129-132.

Yang F, Zeng X, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. The ISME jornal. 2012; 6(1): 1-10.

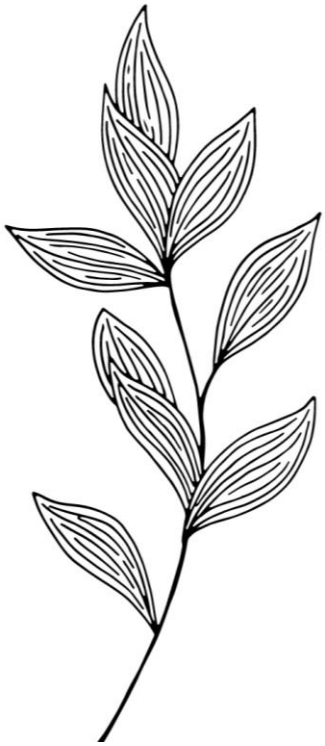
Zachrisson BU, Zachrisson S. Gingival condition associated with partial orthodontic treatment. Acta odontologica Scandinavica. 1972; 30 (1): 127-136.

Zhang Y, Sun J, Lin CC, Abemayor E, Wang MB, Wong DT. The emerging landscape of salivary diagnostics. Periodontology 2000. 2016; 70(1): 38-52.

Zhao R, Huang R, Long H, Li Y, Gao M, Lai W.The dynamics of the oral microbiome and oral health among patients receiving clear aligner orthodontic treatment. Oral diseases. 2020; 26(2): 473-483.

.

# Anexos



# ANEXOS

## PARECER - CONSUBSTANCIADO

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Efeito inicial da terapia ortodôntica sobre a microbiota bucal de adolescentes em condição de saúde periodontal

**Pesquisador:** maria bernadete sasso stuani

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 31442820.8.0000.5419

**Instituição Proponente:** Universidade de Sao Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.179.455

**Apresentação do Projeto:**

O início do tratamento ortodôntico em muitos casos coincide com um crítico período para alterações gengivais e doença cárie: a adolescência.

Nessa fase, o indivíduo sob tratamento ortodôntico apresenta maior risco de desenvolver alterações periodontais quando comparados aos pacientes que iniciaram o tratamento mais tardiamente. A literatura é muito clara em apontar dispositivos ortodônticos e aparelhos fixos como dificultadores da higiene bucal e consequentemente fatores de risco para doença periodontal, principalmente dos tecidos de proteção. No entanto, para além do risco

aumentado em função da dificuldade de higienização apresentada pelos pacientes e proporcionada pelos dispositivos ortodônticos, alguns autores observaram que esses dispositivos promovem alterações na microbiota bucal de caráter quantitativo, mas também qualitativo, especialmente a aparelhagem fixa.

Apesar, de diversos estudos terem sido desenvolvidos nesse sentido, ainda não está clara as alterações qualitativas presente na microbiota bucal de pacientes em tratamento ortodôntico, tampouco seu início. Por essa razão, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito inicial da terapia ortodôntica sobre a microbiota oral de adolescentes em

condição de saúde periodontal, por meio da técnica de Checkerboard DNA-DNA Hybridization.

**Endereço:** Avenida do Café s/nº
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
**Telefone:** (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito inicial da terapia ortodôntica sobre a microbiota oral de adolescentes em condição prévia de saúde periodontal.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a microbiota oral de adolescentes em condição de saúde periodontal previamente à instalação de aparelhagem fixa ortodôntica, por meio de 40 espécies relacionadas com a patogênese de diferentes alterações periodontais.
2. Avaliar o efeito inicial da terapia ortodôntica sobre a microbiota oral de adolescentes periodonticamente saudáveis, por meio de 40 espécies relacionadas com a patogênese de diferentes alterações periodontais.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos oferecidos pelos procedimentos envolvidos nesse trabalho são mínimos, mas envolvem o risco de desconforto e dor durante a utilização do aparelho fixo, lesões em lábio ou "bochecha" durante o período de adaptação com o aparelho, maior retenção de alimento e bactérias no aparelho e consequentemente a necessidade de melhor higienização para minimizar o risco de doença cárie. No entanto, o participante terá acompanhamento especializado e planejado para a diminuição desses riscos, tal como receberá todas as orientações necessárias e suporte para um tratamento sem complicações.

Ainda dentro dos riscos da participação nesse projeto, o paciente será exposto à uma radiação ionizante de raio x convencional para a documentação ortodôntica necessária para o planejamento e acompanhamento do tratamento. Os profissionais envolvidos nessa pesquisa se comprometem em tornar essa exposição à radiação o menor possível em apenas dois momentos: ao início e ao final do tratamento.

Benefícios:

1- A instalação do aparelho fixo e tratamento ortodôntico para alinhamento dos dentes será realizada gratuitamente.

2- Melhora funcional e estética da oclusão.

3- O participante será acompanhado durante todo o estudo receberá todas as orientações

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 4.179.455

necessárias de higiene bucal.

4- Os resultados dessa pesquisa possibilitarão uma melhor compreensão dos efeitos desse tipo de tratamento sobre as bactérias que existem no meio bucal e que podem estar envolvidas com doenças periodontais (que podem envolver gengiva e osso onde o dente se encontra).

Os pesquisadores envolvidos se comprometem a prestar assistência durante toda a pesquisa caso algum dano venha a ocorrer.

5- Os pesquisadores manterão sigilo sobre a participação na pesquisa.

6- Como a participação é voluntária, há o direito a interrompê-la em qualquer momento, sem sofrer penalizações.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bem escrito e fundamentado, justificando assim sua condução.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador atendeu todas as recomendações elencadas no parecer anterior.

Adequou o TCLE e o TALE;

Anexou a Autorização de infraestrutura do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP;

Adicionou o nome da pós-graduanda Paôla Caroline da Silva Mira na Plataforma Brasil.

**Recomendações:**

Projeto aprovado

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto aprovado conforme deliberado na 238ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 27/07/2020.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|---|---|---|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1542007.pdf | 09/07/2020 15:08:26 | | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | aut_infra_revisada_03_07_2020.pdf | 09/07/2020 15:07:54 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de | Termo_Assentimento_03_07_2020.docx | 09/07/2020 15:06:57 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |

**Endereço:** Avenida do Café s/nº
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
**Telefone:** (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 4.179.455

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ausência | Termo_Assentimento_03_07_2020.docx | 09/07/2020 15:06:57 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_03_07_2020.docx | 09/07/2020 15:06:39 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| Outros | CARTA_DE_RESPOSTA_AOS_REVISORES.pdf | 09/07/2020 15:06:16 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| Cronograma | cronograma.docx | 23/04/2020 23:16:09 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projeto_detalhado.docx | 23/04/2020 23:15:38 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| Outros | Curriculo.pdf | 23/04/2020 23:15:04 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | infraestrutura.pdf | 23/04/2020 23:13:51 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_Rosto_CEP_Bernadete.pdf | 23/04/2020 23:11:26 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| Outros | dec_part_pesq_18_02_2020.doc | 20/04/2020 19:14:17 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_Assentimento.docx | 20/04/2020 19:13:00 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_10_02_2020.docx | 20/04/2020 19:12:48 | maria bernadete sasso stuani | Aceito |

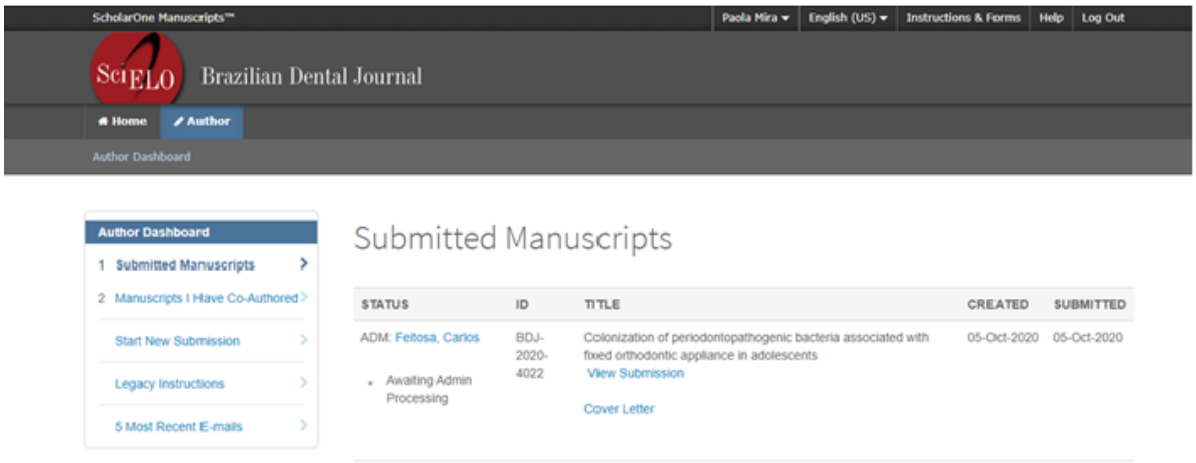
**Situação do Parecer:**
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**
Não

RIBEIRAO PRETO, 29 de Julho de 2020

**Assinado por:**
**Simone Cecilio Hallak Regalo**
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida do Café s/nº
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
**Telefone:** (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br




05-Oct-2020

Dear Ms. Mira:

Thank you for submitting your manuscript entitled Colonization of periodontopathogenic bacteria associated with fixed orthodontic appliance in adolescents" to the Brazilian Dental Journal. Your manuscript ID is BDJ-2020-4022.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo.

In accordance with the Brazilian Dental Journal's policies referring to the review process that precedes publication, all manuscripts accepted for publication undergo a Technical Review, which includes revision of language and scientific writing style, formatting corrections and technical editing to fit the manuscript into Journal's standards, and preparation of galley proofs.

The Technical Review Fee ranges from R$450,00 to R$ 550,00 Reais Brasileiros (for Brazilian authors) or U$200 to 300 American dollars (for foreign authors) and will be charged to the corresponding author, even if only minor corrections to the manuscript are needed.

For foreign authors, the Technical Review Fee should be paid upon acceptance of the manuscript for publication, using the PAYPAL ONLINE MONEY TRANSFER SYSTEM (www.paypal.com). For both Brazilian and foreign authors, more detailed explanation will be provided if the manuscript is accepted.

If you DO NOT agree with these conditions, please inform your decision to withdraw the manuscript from the review process immediately.

Sincerely,
Brazilian Dental Journal Editorial Office