

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

CAROLINE GABRIELA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS ORAIS EM
BIOFILMES FORMADOS EM BRÁQUETES AUTOLIGADOS,
CONVENCIONAIS E CERÂMICOS.**

UBERABA-MG

2021

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

CAROLINE GABRIELA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS ORAIS EM
BIOFILMES FORMADOS EM BRÁQUETES AUTOLIGADOS,
CONVENCIONAIS E CERÂMICOS**

Dissertação de mestrado apresentada no programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade de Uberaba, como requisito para obtenção de título de mestre em Odontologia.

**UBERABA-MG
2021**

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Gonçalves, Caroline Gabriela.

G586a Avaliação da presença de micro-organismos orais em biofilmes formados em bráquetes autoligados, convencionais e cerâmicos / Caroline Gabriela Gonçalves. – Uberaba, 2021.
34 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins.

CAROLINE GABRIELA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS ORAIS EM
BIOFILMES FORMADOS EM BRÁQUETES AUTOLIGADOS,
CONVENCIONAIS E CERÂMICOS**

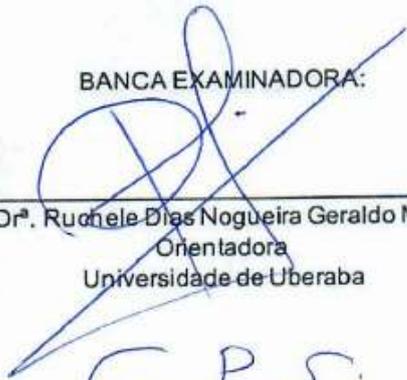
Dissertação apresentada à Universidade de Uberaba como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

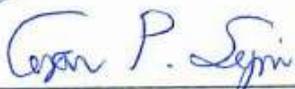
Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada

Orientador (a): Prof. Dr. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins

Aprovado (a) em: 10/03/2021

BANCA EXAMINADORA:


Prof.ª. Dr.ª. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins
Orientadora
Universidade de Uberaba


Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri
Universidade de Uberaba


Prof. Dr. Marcelo Souza Gomes
Centro Universitário Unieuro

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida e autor do meu destino, meu socorro e meu guia, aos meus pais Wilson P. Gonçalves e Simone D. Silveira por terem dado todo o apoio e sacrifício para a realização deste sonho, e principalmente in ‘’memoriam’’ a minha avó e amiga Aparecida Stefanini Gonçalves por sempre ter acreditado no meu potencial e que hoje nos faz muita falta.

.

AGRADECIMENTO

Ao Reitor e Professor **Mario Palmério**, pela oportunidade de estudar em uma faculdade de renome.

Aos docentes, colegas e funcionários do Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) da UNIUBE, em especial ao coordenador **Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri**, à secretária **Flávia Michele da Silva** pelo apoio e disposição a ajudar sempre que necessário.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins** pela paciência, dedicação, companheirismo e empenho na minha orientação.

Aos colaboradores da UNIUBE, **Camila Beatriz da Silva**, pelo exaustivo apoio e ajuda laboratorial para com este trabalho.

A **FAPEMIG** pela concessão do apoio financeiro através da bolsa de Mestrado.

Aos meus familiares, em especial ao meus pais, por terem acreditado que seria possível.

A minha avó que durante o período do curso foi morar com Deus e sempre acreditou na minha formação e me incentivava todos os dias.

Aos participantes da pesquisa pela confiança, que foi depositado no meu trabalho.

RESUMO

O acúmulo de biofilmes sobre as superfícies dentais pode levar a processos de desmineralização dentária, bem como o surgimento de doenças periodontais, por meio da formação de biofilmes. O uso do aparelho ortodôntico, por fornecer áreas retentivas, pode contribuir para um maior acúmulo de biofilmes. Vários modelos e materiais dos bráquetes vem sendo desenvolvidos para a redução deste acúmulo microbiano, no entanto, há necessidade de se investigar a diversidade microbiana associadas aos diferentes tipos de bráquetes. Os objetivos do presente estudo, foram o de comparar a formação de biofilme de *Streptococcus mutans in vitro* em bráquetes cerâmicos e metálicos (autoligados e convencionais), e também o de detectar e comparar a presença de *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em biofilmes coletados de usuários de aparelhos ortodônticos metálicos (autoligados e convencionais) com idades entre 18 e 45 anos, com boa saúde geral e sem uso de medicamentos. Para o estudo in vivo foram incluídos 26 voluntários, sendo 10 usuários de bráquetes metálicos convencionais e 16 com autoligados. Na avaliação *in vitro*, os diferentes tipos de bráquetes (n=10 de cada) foram esterilizados e imersos em culturas de *S. mutans* para proliferação de biofilmes e posterior contagem do número de unidades formados de colônias (UFC). Os voluntários foram examinados oralmente e em seguida, amostras de biofilmes, adjacentes aos bráquetes foram coletadas. Este material foi encaminhado para extração de DNA e em seguida submetidos ao PCR em tempo real com primers específicos para as espécies bacteriana testadas. Os resultados mostraram que os bráquetes cerâmicos permitiram uma maior adesão de *S. mutans*, visto pelo maior número de UFCs ($379,5 \pm 192,41$) quando comparados aos bráquetes metálicos ($8,7 \pm 9,3$ e $0,5 \pm 1,5$ UFC, respectivamente para autoligados e convencionais metálicos) ($p < 0,05$). A maioria das amostras de biofilme apresentou *S. mutans* e *P. intermedia*, enquanto *P. gingivalis* não foi frequentemente detectado. Não houve diferenças estatisticamente significantes na detecção e quantidade das bactérias testadas entre os indivíduos que usavam bráquetes autoligados ou convencionais ($p > 0,05$). Lesões de manchas brancas e gengivites foram mais frequentemente detectadas na interface dente/bráquete de pacientes com o autoligados ($p < 0,05$). Em conclusão, os bráquetes cerâmicos permitem uma maior adesão de *S. mutans* seguido pelos bráquetes metálicos autoligados. Não há diferenças na presença das bactérias testadas nos biofilmes coletados em bráquetes metálicos convencionais ou autoligados.

Descritores: Bráquetes autoligados, Convencionais, Ortodontia, Microorganismos

ABSTRACT

The accumulation of biofilms on dental surfaces can lead to dental demineralization processes, as well as the appearance of periodontal diseases, through the formation of biofilms. The use of the orthodontic appliance, by providing retentive areas, can contribute to a greater accumulation of biofilms. Several models and materials of brackets have been developed to reduce this microbial accumulation, however, there is a need to investigate the microbial diversity associated with different types of brackets. The objectives of the present study were to compare the biofilm formation of *Streptococcus mutans* *in vitro* in ceramic and metallic brackets (self-ligating and conventional), and also to detect and compare the presence of *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in biofilms collected from users of metallic orthodontic appliances (self-ligating and conventional) aged between 18 and 45 years, with good general health and without the use of medication. 26 volunteers were included, 10 users of conventional metal brackets and 16 with self-ligating brackets. In the *in vitro* evaluation, the different types of brackets (n = 10 of each) were sterilized and immersed in cultures of *S. mutans* for proliferation of biofilms and later counting the number of units formed by colonies (CFU). The volunteers were examined orally and then samples of biofilms, adjacent to the brackets were collected. This material was sent for DNA extraction and then submitted to real time PCR with specific primers for the bacterial species tested. The results showed that the ceramic brackets allowed a greater adhesion of *S. mutans*, seen by the greater number of UFCs (379.5 ± 192.41) when compared to the metallic brackets (8.7 ± 9.3 and 0.5 ± 1.5 UFC, respectively for self-ligating and conventional metallic) ($p < 0.05$). Most of the biofilm samples had *S. mutans* and *P. intermedia*, while *P. gingivalis* was not frequently detected. There were no statistically significant differences in the detection and quantity of the tested bacteria between individuals who used self-ligating or conventional brackets ($p > 0.05$). Lesions of white spots and gingivitis were most frequently detected at the tooth / bracket interface of patients with self-ligating ($p < 0.05$). In conclusion, the ceramic brackets allow a greater adhesion of *S. mutans* followed by the self-ligating metal brackets. There are no differences in the presence of the bacteria tested in biofilms collected in conventional or self-ligating metal brackets.

Descriptors: Self-ligating Brackets, Conventional brackets, Orthodontics, Microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coleta da amostra do biofilme com auxílio de um fio ortodôntico pré-contornado na região dos incisivos inferior com uso do aparelho autoligado.	16
Figura 2. Representação esquemática do processo de extração do DNA cromossomal.	17
Figura 3. Culturas contendo colônias de <i>S. mutans</i> crescida após o contato com bráquetes cerâmicos (CER), Autoligado (SLI) e Convencional (MAX).	19
Figura 4. Valores médios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>S. mutans</i> aderidos aos bráquetes cerâmicos, autoligados e convencionais.	20
Figura 5. Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>S. mutans</i> aderidos aos 10 bráquetes autoligados e convencionais.	20
Figura 6. Médias de intensidade de fluorescência emitidas pela detecção de <i>S. mutans</i> , <i>P. gingivalis</i> e <i>P. intermedia</i> em amostras de biofilmes obtidas de pacientes com aparelhos autoligado (n=16) e convencional (n=10).	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seleção da Cepa e Meios de Cultura	14
Tabela 2. Primers de oligonucleotídeos.....	18
Tabela 3. Detecção de <i>S. mutans</i> , <i>P. gingivalis</i> e <i>P. intermedia</i> em amostras de biofilmes coletadas de pacientes com bráquetes convencionais e autoligados	21
Tabela 4. Frequência de detecção de alterações orais detectadas em exame clínico de pacientes com bráquetes convencionais e autoligados.....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. HIPÓTESE	13
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. PARTE 1. ESTUDO <i>IN VITRO</i> DO ACUMULO DE <i>S.MUTANS</i> EM DIFERENTES TIPOS DE BRÁQUETES	14
4.1.1. SELEÇÃO DA CEPA MICROBIANA E MEIOS DE CULTURA	14
4.1.2. ENSAIOS DE FORMAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BIOFILME DE <i>S.MUTANS</i> NOS BRÁQUETES.....	14
4.1.2.1. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E CULTIVO MICROBIANO.....	14
4.1.2.2. FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	14
4.2. PARTE 2. DETECÇÃO DE <i>S. MUTANS</i> , <i>P. GINGIVALIS</i> E <i>P. INTERMEDIA</i> EM AMOSTRAS DE BIOFILMES ADERIDOS A BRÁQUETES METÁLICOS AUTOLIGADOS E CONVENCIONAIS POR PCR.....	15
4.2.1. SELEÇÃO E COLEÇÃO AMOSTRAL.....	15
4.2.2. DETECÇÃO DAS BACTÉRIAS NAS AMOSTRAS	17
5. ANÁLISE ESTÁTISTICA	17
6. RESULTADOS	19
7. DISCUSSÃO	23
8. CONCLUSÕES	25
9. REFERÊNCIAS	26
10. ANEXO	32

1. INTRODUÇÃO

O ambiente bucal é composto por inúmeros micro-organismos, componentes bioquímicos e imunológicos que estão em harmonia, determinado o estado saudável do hospedeiro. O tratamento ortodôntico é uma terapia largamente utilizada para correção da estética e da má oclusão, que traz várias alterações neste ambiente bucal sendo algumas benéficas, como por exemplo, na correção de um apinhamento severo, como também pode trazer problemas para o paciente, devido à dificuldade de higienização alterando o estado periodontal do paciente. (KIM *et al.*, 2012).

O desequilíbrio microbiológico do hospedeiro, devido ao aumento e modificação da colonização microbiana, está amplamente relacionado à etiologia das gengivites e periodontites (KIM *et al.*, 2012) e a cárie dentária. Como a composição microbiológica dos biofilmes sobre as superfícies dos dentes está intimamente ligada à saúde oral, os efeitos dos aparelhos ortodônticos fixos sobre a microflora supra/subgengival, o estado periodontal, dentário e imunológico precisam ser investigados e constantemente monitorados.

Biofilmes são derivados microbiológicos de comunidades sésseis caracterizados por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato ou uma interface ou uma à outra (ZIJNGE *et al.*, 2010) contendo uma ampla variedade de espécies que interagem entre si (SHIRTLIFF *et al.*, 2009; THEIN *et al.*, 2009) e são incorporados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (DONLAN; COSTERTON, 2002). A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies microbianas que se encontram organizadas em biofilmes (JAROSZ *et al.*, 2009).

O aparelho ortodôntico altera o ambiente microbiano subgengival aumentando o acúmulo de biofilme e aprofundando o sulco gengival (NARANJO *et al.*, 2006; PEREZ *et al.*, 2014). Isto por que a movimentação dentária ortodôntica, incluindo intrusão e inclinação, pode mover a placa supragengival para o sulco gengival e, assim, afetar a colonização microbiana desta região (GONG *et al.*, 2014).

Aparelhos ortodônticos geralmente aumentam os níveis de periodontopatógenos em biofilmes subgengivais (LU *et al.*, 2010; REGO *et al.*, 2010). Os periodontopatógenos mais comuns que estão altamente relacionados às doenças periodontais nos tratamentos ortodônticos são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum* (GUO *et al.*, 2017).

E a *Porphyromonas gingivalis* fimbriae (genótipos específicos fimA) foi intimamente relacionado com a gengivite ortodôntica (PAN *et al.*, 2017).

Embora seja indiscutível que os componentes do aparelho ortodôntico forneçam áreas retentivas para o acúmulo de micro-organismos; propiciando um ambiente adequado para o desenvolvimento de uma infecção oral (SUN *et al.*, 2018); o tratamento ortodôntico também pode beneficiar as condições periodontais a longo prazo, pois o alinhamento dos dentes pode facilitar a higiene oral e aliviar uma oclusão traumática (BOLLEN 2008; GUO *et al.*, 2017).

O tratamento ortodôntico, recomendado para pacientes com periodontite, pode restaurar a função estética e mastigatória não agravando a inflamação e a reabsorção óssea alveolar dos incisivos (SHEN *et al.*, 2017) e ainda, pode diminuir a gravidade da periodontite (SIM *et al.*, 2017). Outros relatos mostraram que o tratamento ortodôntico-periodontal combinado estabilizou ou diminuiu os parâmetros periodontais clínicos como a profundidade de sondagem, mobilidade dentária, índice de placa, nível de inserção clínica e índice de sangramento do sulco (ZHAN *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2018).

Existem claras evidências sobre a inter-relação entre o biofilme dentário e a doença periodontal, sendo possível entender que a inflamação gengival em pacientes que fazem tratamento ortodôntico, advém da dificuldade de higienização. Além disso, o uso de acessórios ortodônticos permite o acúmulo de resíduos alimentares, proporcionando aumento no crescimento bacteriano sobre a superfície dentária e conseqüente desenvolvimento de alterações nos tecidos gengivais. (DAVIS *et al.*, 2014).

Os dispositivos utilizados em aparelhos ortodônticos (bandas, fios, ligaduras ou bráquetes) também podem promover o aumento da adesão de bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* (FOSBERG *et al.*, 1991; AHN *et al.*, 2007; PELLEGRINI *et al.*, 2009; VANISHREE *et al.*, 2017) o que leva, dentro de 6 meses da colocação dos aparelhos (TUFECKIT *et al.*, 2011), o aumento do risco de desmineralização do esmalte (FALTERMEIR *et al.*, 2008) e desenvolvimento de lesões de mancha branca descalcificadas que podem progredir para cavitação (VAN DER VEEN *et al.*, 2010). As lesões de mancha branca normalmente são resultado do aumento do acúmulo de placa na superfície do dente, devido à higiene bucal inadequada em torno dos aparelhos ortodônticos (CHAPMAN *et al.*, 2010) e que pode também se associar com o desenvolvimento de gengivite (REGO *et al.*, 2010); o que vem sendo uma situação de confusão para a determinação das etiologias microbianas destas doenças (TANNER *et al.*, 2012). De acordo com Rosentritt (2008) e Lim. *et al.*, (2008) a desmineralização do esmalte decorrente da doença cárie, aparece em 50% dos pacientes que usam aparelho ortodôntico fixo,

demonstrando a suscetibilidade do surgimento de lesão de mancha branca em pacientes que fazem o tratamento ortodôntico.

Diante do reconhecimento do acúmulo microbiano e das doenças orais recorrentes ao uso de aparelhos ortodônticos fixos, os avanços científicos e tecnológicos da Ortodontia vêm focando para a construção de aparelhos mais precisos no controle da força, menos retentivos e removíveis, permitindo assim melhores condições para uma boa higiene bucal e uma menor agressividade ao periodonto. Os aparelhos ortodônticos fixos mais comuns se baseiam na instalação de bráquetes e acessórios na superfície dentária, a fim de que os dentes possam se movimentar e alcançar a posição correta e restabelecer a oclusão e as funções estomatognáticas ideais. Existem variados tipos de sistemas sendo que bráquetes mais comuns são os de aço inoxidável. Em decorrência da busca de tratamentos ortodônticos mais estéticos, surgiram os bráquetes construídos com materiais cerâmicos, que são à base de óxido de alumínio (Al_2O_3), também chamado de alumina, e esse material tem como principal vantagem a facilidade de ser moldados em bráquetes, porém esse processo pode gerar falhas e porosidade na sua composição. (SIFAKAKIS *et al.*, 2018; SWARTZ ML *et al.*, 1988).

Os bráquetes convencionais estão associados ao uso de ligaduras elastoméricas ou de aço inoxidável para manter o fio ortodôntico dentro do slot (FORSBERG *et al.*, 1991). O tratamento ortodôntico com este tipo de bráquetes geralmente apresenta alterações periodontais, como efeitos colaterais causados pela dificuldade na higiene periodontal e também pelo maior acúmulo e alteração qualitativa do biofilme (FORSBERG *et al.*, 1991). Já os bráquetes ortodônticos autoligáveis possuem um mecanismo próprio para abertura e fechamento do slot e não necessitam de ligadura metálica ou elastomérica como método de ligadura do fio (CACCIASFESTA *et al.*, 2003), apresentando vantagens em relação à retenção do biofilme, devido à ausência destas ligaduras e, também, a sua forma que permite uma melhor higienização (PELLEGRINI *et al.*, 2009).

No entanto, ainda há inúmeras controvérsias a respeito desta menor adesão microbiana nos autoligáveis, e a prescrição destes bráquetes ao invés dos convencionais, baseada na melhora o acúmulo de biofilme, ainda não pode ser aplicado, devido à falta de evidências científicas (PEJDA *et al.*, 2013; DO NASCIMENTO *et al.*, 2014). Também não há evidências de uma possível influência do desenho dos bráquetes (convencionais ou autoligáveis) sobre a formação de colônias e a adesão de *S. mutans* (PANDIS *et al.*, 2010; DO NASCIMENTO *et al.*, 2014).

De modo geral, mesmo com as mudanças nos tipos modernos de bráquetes e aparelhos, o problema do acúmulo de micro-organismos, associados ao tratamento

ortodôntico ainda é persistente na prática ortodôntica diária. Para tanto, o presente estudo analisa a adesão de *Streptococcus mutans*, através de um estudo *in vitro* em aparelhos fixos cerâmicos, autoligados e convencionais metálicos e observa a adesão de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em biofilmes formados em aparelhos ortodônticos fixos autoligados e convencionais metálicos de pacientes que fazem o uso aparelho há mais de seis meses através do PCR (reação em cadeia da polimerase) pois é um estudo preciso e seguro, que permite a visualização dos micro-organismos nos pares de base do DNA, através de primers específicos (OLIVEIRA *et. al.*, 2007).

2. HIPÓTESE

Os bráquetes autoligados metálicos permitem uma menor adesão de bactérias em comparação com os demais bráquetes testados, sendo o convencional e autoligados metálico e o cerâmico convencional, o que pode determinar uma menor coleção clínica de biofilmes aderidos.

3. OBJETIVO

Avaliar a presença de bactérias orais de acordo com o tipo de bráquetes fixos, sendo que os objetivos específicos incluem:

- Avaliar a adesão *in vitro* de *S. mutans* em diferentes bráquetes ortodônticos: autoligados, cerâmicos e convencionais;
- Detectar a presença de *S. mutans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em amostras de biofilme coletadas de pacientes que estão em tratamento ortodôntico com aparelhos fixos metálicos convencionais e autoligados.
- Comparar a presença de alterações bucais (mancha branca e gengivite) de acordo com o tipo de bráquete.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estudo *in vitro* do acúmulo de *S. mutans* em diferentes tipos de bráquetes

4.1.1. Seleção da Cepa Microbiana e Meios de Cultura

O quadro a seguir indica a cepa, seu registro de ATCC (American Type Culture Collection), e os meios de cultura utilizado para obtenção do inóculo para os testes realizados:

Tabela 1. Seleção da Cepa e Meios de Cultura

Micro-organismo	Número ATCC	Meio de cultura
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	BHI (Brian Heart Infusion) com 5% de sacarose

4.1.2. Ensaios de formação *in vitro* de biofilme de *S. mutans* nos bráquetes

4.1.2.1. Preparação do meio de cultura e Cultivo microbiano

Foi utilizado o meio de cultura Brian Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) diluído em água deionizada e posteriormente autoclavado em tubos de 25 mL. A cepa de *S. mutans* foi crescida em BHI durante 24 h em microaerofilia a 37° C. Após atingir uma absorbância de 1 após a mensuração a 600 nm em Espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader), a cultura microbiana foi utilizada para a formação de biofilme.

4.1.2.2. Formação de biofilme

Foram utilizadas dez repetições em placas estéreis de 24 poços de microtitulação com fundo plano de poliestireno (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Foram utilizados bráquetes Metálicos (aço inoxidável) convencionais (Max) e autoligados (SLI), cerâmico (policristalino alumina) da marca Morelli (Sorocaba - SP) do incisivo central inferior. Todos os bráquetes tinham um Slot de 0,022 polegadas. Dez bráquetes de cada tipo foram previamente autoclavados e colocados em poços individuais de uma placa de cultura (Costar) de 24 poços. Uma suspensão de 150 µL da cultura de *S. mutans* e 1 mL do meio BHI. Após 24 horas de incubação a 37° C em microaerofilia, os bráquetes foram removidos com pinças estéreis e lavados para remoção das bactérias não aderentes, em seguida foram imersos em uma solução de 2 mL de PBS estéril. Após a lavagem com PBS, os bráquetes com suas bactérias aderentes de cada poço foram tratados com 2 mL de 0,25% de tripsina EDTA por 45 minutos em condições aeróbicas a 37°C, para descolamento das bactérias aderentes. Cem microlitros deste diluído foi inoculado em meio BHI com sacarose e após 48 horas de incubação em jarra de

microaerofilia a 37°C, o número total de Unidades Formados de Colônia (UFC) foi determinado.

4.2. Estudo *in vivo* da detecção de *S. mutans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em amostras de biofilmes aderidos a bráquetes metálicos autoligados e convencionais por PCR.

4.2.1. Seleção e Coleção amostral

Vinte e seis pacientes atendidos na Clínica de Especialização da UNIUBE foram incluídos no presente estudo. Dentre os voluntários, 10 usavam aparelho fixo metálico convencional e 16, metálico autoligado (ambos da marca Morelli, modelos: Max e SLI, respectivamente). Estes voluntários foram elegíveis, pois faziam uso de aparelho há mais de 6 meses, não eram: fumantes, etilistas, usuários de antibióticos ou outros medicamentos nos últimos 30 dias e apresentavam uma boa saúde geral. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética de Universidade de Uberaba sob o protocolo número (16594919.2.0000.5145). Os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação no projeto. Aos voluntários foi garantido o sigilo dos seus dados e foram utilizados apenas para fins científicos.

Após assinatura do TCLE, os pacientes foram submetidos a um exame clínico oral realizado por um único cirurgião-dentista. Durante a inspeção clínica foi realizada a detecção de alterações dentárias como cárie, manchas brancas e doenças gengivais. E para a verificação de manchas brancas adjacentes aos bráquetes colados foi feito por visualização direta com aumento de 2 vezes e de fotografias intra-orais.

No exame da condição periodontal foram medidas: profundidade de sondagem de sulco/bolsa, recessão gengival e obtidos os valores de nível/perda de inserção clínica. Tais observações foram procedidas e registradas em seis diferentes locais (disto-vestibular, médio-vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, médio-lingual, mesio-lingual) para cada dente com exceção dos terceiros molares, com a sonda periodontal Carolina do Norte (PCP-UNC 15, Hu-Friedy Manufacturing Inc., Chicago, EUA). A gengivite foi considerada positiva quando havia presença de 25% ou mais de sítios com sangramento à sondagem e nenhum sítio com perda de inserção clínica > 2 mm (GOMES-FILHO *et al.*, 2007). Uma vez detectadas as doenças bucais, os pacientes foram encaminhados para tratamento na Clínica Getúlio Vargas da UNIUBE.

Em seguida, foram coletadas amostras de biofilmes com auxílio de um fio ortodôntico pré contornado e esterilizado conforme mostrado na Figura 1, da face vestibular dos incisivos

inferiores, pois é uma região que os pacientes apresentam maior dificuldade de higienização, devido ao bráquete ser grande para um dente pequeno.



Figura 1. Coleta da amostra do biofilme com auxílio de um fio ortodôntico pré-contornado na região dos incisivos inferior com uso do aparelho autoligado.

Os biofilmes foram depositados em solução de PBS 1X e encaminhados em gelo para o Laboratório de Biopatologia da UNIUBE para realização dos ensaios de PCR, como mostra na figura 1.1 e 1.2. No final dos exames laboratoriais, as amostras foram autoclavadas para descontaminação e posteriormente descartadas, conforme o comitê de ética preconiza.

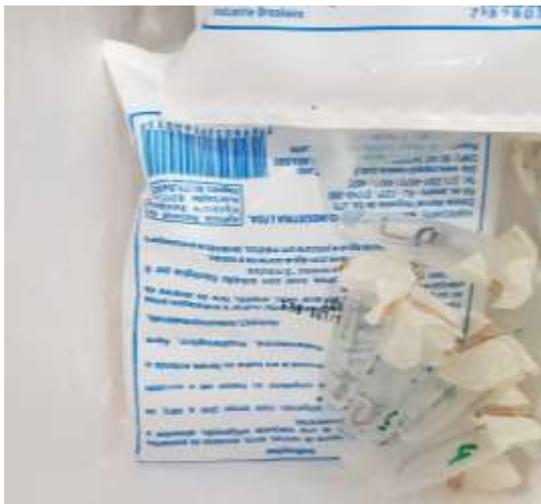


Figura 1.1 Amostra preservada no gelo.



Figura 1.2 Amostra estéril para descarte.

diluição do DNA em água ultrapura, obtendo-se ao final, uma concentração de 15ng/ul. Como controle positivo foram realizados PCR com as bactérias e negativo, com água.

Em seguida, o DNA extraído foi submetido ao PCR em tempo real. Para os experimentos foram utilizados primers de oligonucleotídeos para amplificar pares de base de DNA da sequência listadas na tabela abaixo (Exxtend Biotecnologia Ltda). Os primers foram previamente dissolvidos em tampão TE 1X [10 mM tris-Hcl, EDTA 1mM (pH 7,5-8,0)].

Tabela 2. Primers de oligonucleotídeos

<i>Primer</i>	<i>Sequência F</i>	<i>Sequência R</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	TCGCGAAAAAGATAAACAAACA	CCCCTTCACAGTTGGTTAG
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TACCCATCGTCGCCTTGGT	CGGACTAAAACCGCATACTACTTG
<i>Prevotella intermedia</i>	AATACCGATGTTGTCCACA	AAGCTTATTCTGGCCGATT

O termociclador utilizado na realização da técnica foi programado para obter uma desnaturação do DNA a uma temperatura de 95°C por um período de 10 minutos, o anelamento a 62°C por 20 segundos e o processo de extensão a 68°C por 40 segundos. Todo o processo de termociclagem se deu em 40 ciclos consecutivos sendo que o ciclo final compreendeu em média o intervalo entre 75°C a 85°C. Foram obtidas curvas de MELT, bem como as concentrações de DNA de bactérias obtidos em cada amostra. Para primeira análise dos dados obtidos por meio dos testes de q-PCR, considerou-se o limiar do Ciclo do threshold (Ct), como sendo o ciclo em que a fluorescência emitida pelo 1X SYBR GREEN foi detectada sobrepondo-se ao *background*.

Os sinais de fluorescências, expressos em Unidades de Fluorescência, emitidos pelo Sybr Green a medida que o produto é amplificado, foram expressos graficamente (sinais de fluorescência *versus* número de ciclos), permitindo monitorar em tempo real através do Software StepOne®, a cinética e a amplificação, baseada na quantidade de material genético detectado de cada amostra.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando BioSTAT. Análise de variância unidirecional (ANOVA) e pós teste de Bonferroni foi utilizado para comparar a média do número de UFC de acordo tipo de bráquetes e a intensidade de fluorescência emitida. Os dados de frequência de detecção bacterianas e dados clínicos foram comparados entre os pacientes com bráquetes convencionais e autoligados pelo Teste Exato de Fisher e Qui-quadrado. Para todas as análises, considerou-se $p < 0.05$ estatisticamente significativa.

6. RESULTADOS

Os resultados do estudo *in vitro* mostraram que houve crescimento de colônias de *S. mutans* em diferentes quantidades de acordo com os tipos de bráquetes (Figura 3).



Figura 3. Culturas contendo colônias de *S. mutans* crescida após o contato com bráquetes cerâmicos (CER), Autoligado (SLI) e Convencional (MAX).

Um total médio de UFC $379,5 \pm 192,41$ para o cerâmicos; $8,7 \pm 9,3$ para os autoligados metálicos e $0,5 \pm 1,5$ para os convencionais metálicos (Figura 4). Foram encontradas diferenças significativas na adesão de *S. mutans* nos diferentes tipos de bráquetes (Figura 4), visto que o número de UFC foi estatisticamente maior e significantes nos bráquetes cerâmicos do que nos metálicos ($p < 0.0001$).

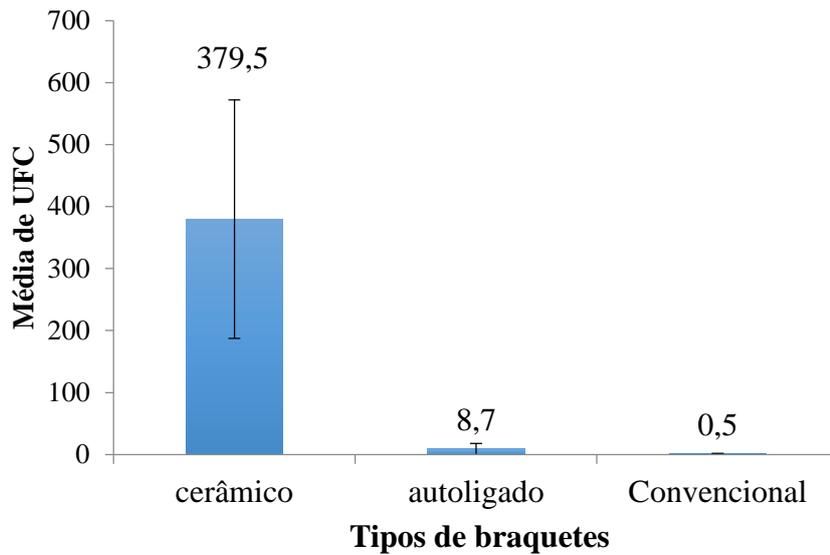


Figura 4, Valores médios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. mutans* aderidos aos braquetes cerâmicos, autoligados e convencionais (ANOVA $p < 0.05$).

Houve também uma diferença estatisticamente significativa entre os braquetes de aço inoxidável (Figura 5, $p = 0.016$), em que os autoligados aderiram mais micro-organismos que o convencional. Todos os braquetes autoligados apresentam pelo menos 1 UFC ($n = 2$), enquanto, apenas 1 convencional apresentou 5 UFCs.

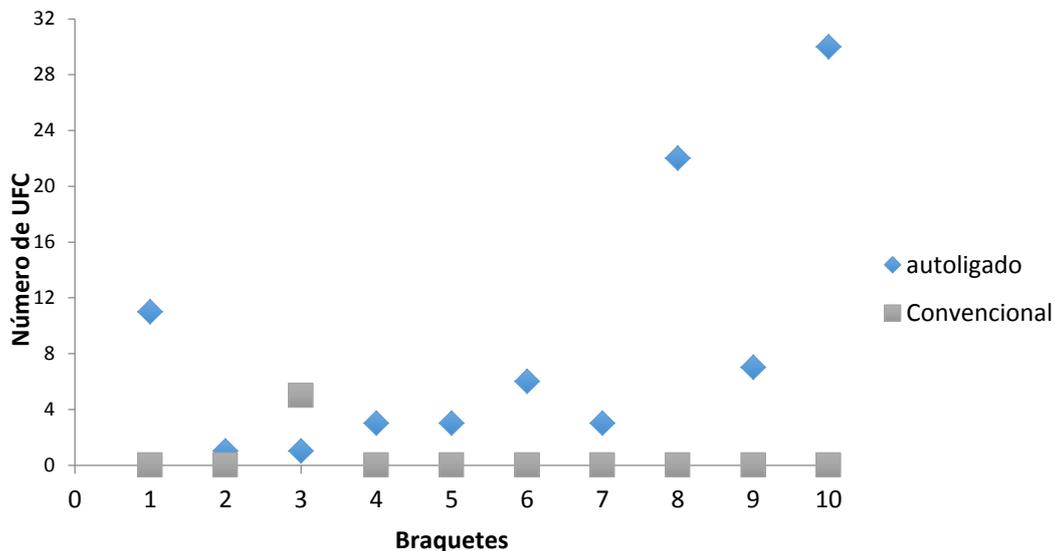


Figura 4. Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. mutans* aderidos aos 10 braquetes autoligados e convencionais. (ANOVA $p < 0.05$).

A frequência de detecção de *S. mutans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* nos biofilmes dos pacientes com diferentes tipos de braquetes está representado na Tabela 3. *S. mutans* e *P. intermedia* foram detectados na maioria dos aparelhos autoligados, sendo que, oito pacientes

apresentaram as duas bactérias ao mesmo tempo. Embora os aparelhos autoligados apresentem uma maior detecção bacteriana, não houve diferenças estatisticamente significantes na frequência de detecção dos aparelhos convencionais (Tabela 3, $p>0.05$).

Tabela 3. Detecção de *S. mutans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em amostras de biofilmes coletadas de pacientes com bráquetes convencionais e autoligados de pacientes. (QUI-QUADRADO, $p>0.05$)

Tipos de bráquetes				
Detecção das bactérias:		Autoligados n=16	Convencional n=10	P
<i>S. mutans</i>				
	Sim	10 (62.5%)	5 (50%)	0.44
	Não	6 (37.5%)	5 (50%)	
<i>P. gingivalis</i>				
	Sim	6 (37.5%)	3 (30%)	1.00
	Não	10 (62.5%)	7 (70%)	
<i>P. intermedia</i>				
	Sim	10 (62.5%)	5 (50%)	0.44
	Não	6 (37.5%)	5 (50%)	

As médias de intensidade de fluorescência emitidas pelo PCR, para cada bactéria e tipo de aparelho estão representadas na Figura 6. De modo geral, as fluorescências encontradas para *S. mutans* e *P. intermedia* foram superiores das encontradas para *P. gingivalis* (Figura 6). Também não houve diferenças estatisticamente significantes nos níveis fluorescências entre os diferentes tipos de bráquetes (Figura 6, $p>0.05$).

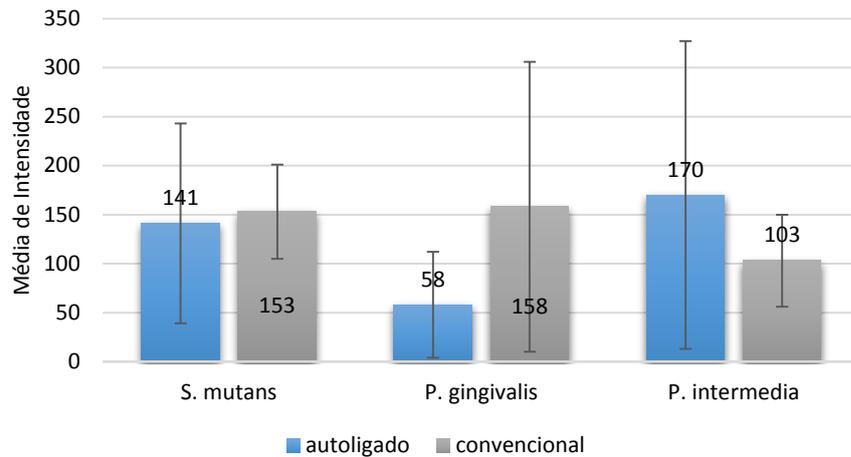


Figura 5. Médias de intensidade de fluorescência emitidas pela detecção de *S. mutans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em amostras de biofilmes obtidas de pacientes com aparelhos autoligado (n=16) e convencional (n=10). (ANOVA, $p>0.05$)

Os dados dos exames clínicos intra-orais mostraram que as lesões de manchas brancas foram mais frequentemente detectadas na interface dente/bráquete de pacientes com o autoligados, embora não tenha sido diferente estatisticamente dos pacientes com aparelho convencional ($p=0.05$). As gengivites também foram detectadas em muitos pacientes, especialmente nos pacientes com autoligados, já que todos apresentavam a doença e foram significativamente mais frequentes do que nos pacientes com aparelho convencional ($p<0.05$).

Tabela 4. Frequência de detecção de alterações orais detectadas em exame clínico de pacientes com bráquetes convencionais e autoligados. (QUI-QUADRADO, $p>0.05$)

Tipos de bráquetes			
Exame Clínico	Autoligados n=16	Convencional n=10	<i>P</i>
<i>Manchas brancas</i>			
Sim	11 (68.8%)	3 (30%)	0.05
Não	5 (31.2%)	7 (70%)	
<i>Gengivite</i>			
Sim	16 (100 %)	7 (70%)	0.04
Não	0 (0 %)	3 (30%)	

6.DISCUSSÃO

O presente estudo permitiu observar a adesão de *S. mutans in vitro* e a presença de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *S. mutans* em biofilmes coletados de voluntários de acordo com diferentes tipos de bráquetes. A obtenção da média das contagens do número de colônia nos meios de cultura permitiu dimensionar a quantidade de bactérias aderidas em biofilmes nos bráquetes. A formação de biofilmes ocasionado pelo próprio ambiente bucal, rico em bactérias e substratos para o seu desenvolvimento, é um processo comum sobre as superfícies dentárias e partes moles da cavidade bucal, e que deve ser removido com as técnicas de higiene oral.

É esperado que, em presença de mais áreas retentivas e não descamativas, ocasionadas pelo uso do aparelho ortodôntico, haja uma maior adesão e acúmulo de biofilmes sobre os dentes, especialmente devido as dificuldades de se ter medidas eficazes de higiene dental. A permanência e formação de biofilme dentário causam, desde manifestações inflamatórias periodontais, até a desmineralização do esmalte dentário. Aparelhos ortodônticos fixos em geral, apresentam rugosidade na superfície, o que facilita o acúmulo de biofilme e conseqüentemente ocasiona mudanças patológicas nos tecidos gengivais e/ou na microbiologia oral, portanto a hiperplasia gengival e a doença periodontal são respostas destas alterações (GONG *et al.*, 2011). Além das características do desenho dos bráquetes ortodônticos, há relatos de que pode haver uma irritação química durante a cimentação de bandas, criando assim espaços subgengivais propícios para o acúmulo de biofilmes (KLOEHN *et al.*, 2014).

Embora existam várias medidas preventivas de controle da formação deste biofilme durante o tratamento ortodôntico, não há ainda uma solução concreta para se evitar o seu desenvolvimento (OAAGARD, 2008). Uma destas medidas está relacionada ao desenho do bráquete, numa tentativa de se evitar a ancoragem microbiana. O marketing dos bráquetes autoligados anunciam uma melhor eficácia no controle da acumulação bacteriana em sua superfície, devido a eliminação das ligaduras de aço inoxidável ou elásticas. Isto por que estudos que comparam a influência de autoligados e bráquetes convencionais na saúde periodontal associam a formação de biofilme ao uso da ligadura elastomérica (PELLEGRINI *et al.*, 2009), embora tenha sido demonstrado que estas ligaduras representem um material bio-hostil para a sobrevivência microbiana (GAMEIRO *et al.*, 2009, PELLEGRINI *et al.*, 2009).

No entanto, nossos achados permitiram observar uma pequena diferença no número de colônias obtidas nas culturas provenientes de biofilmes obtidos de bráquetes metálicos

convencionais e autoligados. Os autoligados tiveram um maior número de colônias, enquanto apenas uma amostra do convencional teve *S. mutans* detectável, corroborando com os dados revisados por NASCIMENTO e colaboradores (2014), em que concluiu que não há evidências de uma possível influência do desenho de bráquetes (convencionais ou autoligáveis) sobre a formação de colônias e a adesão de *Streptococcus mutans*.

Os resultados mostraram grandes diferenças na contagem de *S. mutans* nos bráquetes cerâmicos em comparação com os metálicos, o que foi encontrado também por FOUMIER *et al.*, (1998); PAPAIOANNOU *et al.*, (2007); CAMEIRO *et al.*, (2018), discordando de AHN *et al.*, (2002) que constatou que o aço inoxidável teve a maior adesão microbiana. Por outro lado, a avaliação da adesão do *S. mutans* em amostras de bráquetes estéticos convencionais e autoligados por microscopia eletrônica de varredura não há diferença na adesão do *S. mutans* entre os aparelhos (DO NASCIMENTO *et al.*, 2014). A composição molecular e elementar da superfície do biomaterial é considerada como fator determinante da resposta precoce do ambiente biológico. A natureza polar ou não polar, a ligação de hidrogênio capacidade, e do potencial doador ou aceitador de elétrons, parecem controlar o caráter hidrofílico ou hidrofóbico e o estado energético das superfícies (PAPAIOANNOU *et al.*, 2007).

As coletas de biofilmes foram realizadas em pacientes de um único ortodontista em que os bráquetes foram colados por pelo menos 0,5 mm da gengiva livre, na face vestibular dos incisivos inferiores, sem excesso de resina na interface e que recebiam as mesmas instruções de higiene bucal, escova dental e dentifrício. A maioria das amostras de biofilme analisadas apresentaram *S. mutans* em níveis detectáveis ratificando a sua participação na formação de biofilmes supragengivais. Não foram encontradas diferenças na detecção e quantificação de *S. mutans* entre os bráquetes autoligados e convencionais. A literatura é muito controversa a respeito das diferenças de colonização microbiana nos diversos tipos de bráquetes metálicos disponíveis no mercado. Alguns estudos relatam que os bráquetes autoligados são menos suscetíveis à colonização bacteriana devido à sua forma, além da falta de ligaduras metálicas ou elastoméricas (PELLEGRINI *et al.*, 2009; PADUANO *et al.*, 2008; YU; QIAN, 2007; FERNANDES; ALMEIDA, 2008, TURKKAHRAMAN *et al.*, 2005). Outros estudos não foram unânimes em relatar uma possível influência do desenho de bráquetes (convencional ou autoligante) sobre a adesão e formação de colônias de *S. mutans* (PHITON *et al.*, 2011; PEDJA *et al.*, 2013, PANDIS *et al.*, 2010). A análise quantitativa de *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* e *Lactobacillus acidophilus*, através do PCR também não encontrou diferenças estatisticamente entre os bráquetes autoligados e convencionais (BAKA *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos apontam para variações dos níveis de periodontopatógenos nos biofilmes de pacientes em tratamento ortodôntico, tais alterações nos biofilmes subgingivais podem ser transitórias (revisado por GUO *et al.*, 2017). Há evidências de que *Prevotella intermedia* aumentam no início do tratamento, mas retornam aos níveis de pré-tratamento vários meses depois da remoção do aparelho (RISTIC *et al.*, 2008; THOMBERG *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2017). *P. intermedia* foi frequentemente detectada das amostras analisadas, enquanto *P. gingivalis* foi encontrado em uma minoria. Não houve diferenças na detecção destes periodontopatógenos entre os tipos de bráquetes analisados. PEDJA *et al.* (2013) também não encontraram diferenças na detecção periodontopatógenos em diferentes tipos de bráquetes de aço inoxidável (convencional e autoligado). Por um lado, GARCEZ *et al.*, (2011) e PITHON *et al.*, (2011) mostraram uma menor formação de biofilmes de periodontopatógenos nos bráquetes de aço inoxidável convencionais ligados com ligadura do que em autoligados. Ademais, através de estudo *in vivo* PELLEGRINI *et al.*, (2009) sugerem maior retenção de bactérias nos bráquetes convencionais ligados com ligadura elastomérica do que em autoligados.

Os estudos mostram que a maior adesão de micro-organismos nos aparelhos convencionais pode estar relacionada com a necessidade de uso de ligaduras elásticas (SOUZA *et al.*, 2008; GARCEZ, *et al.*, 2011) e os bráquetes autoligados, que não necessita de ligaduras, possui um complexo mecanismo de abertura e fechamento através de um clipe metálico que também pode favorecer o acúmulo de biofilme e a aderência bacteriana (JUNG *et al.*, 2016). Diante do exposto, os bráquetes metálicos permitiram uma menor adesão de *S. mutans* do que os cerâmicos. A presença de mais área retentiva dos desenhos dos bráquetes autoligados poderia compensar a adesão microbiana das ligaduras nos bráquetes convencionais *in vivo*.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados podemos concluir que:

- Os bráquetes cerâmicos permitem uma maior adesão de *S. mutans*, seguido pelos bráquetes metálicos autoligados;
- *S. mutans* e *P. intermedia* foram frequentemente detectados nas amostras de biofilme;
- Não houve diferenças na presença e quantidade de bactérias testadas entre bráquetes autoligados e convencionais metálicos.

REFERÊNCIAS

AHN, S. J. *et al.*, Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. **American Journal Orthodontics Dentofacial Orthopedics**, v. 131, n. 6, p. 736-41, Jun 2007.

BAKA, Z.M. *et al.*, Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: A quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, St. Louis, v.144, n. 2, p. 260-267, ago. 2013.

BOLLEN, A. M. *et al.*, Effects of malocclusions and orthodontics on periodontal health: evidence from a systematic review. **Journal of Dental Education**, v. 72, n. 8, p. 912-8, Aug 2008.

CACCIAFESTA, V. *et al.*, Evaluation of friction of stainless steel and esthetic self-ligating brackets in various bracket-archwire combinations. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 124, n. 4, p. 395-402, Oct 2003.

CARVALHO, C. V. *et al.*, Orthodontic treatment in patients with aggressive periodontitis. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 153, n. 4, p. 550-557, Apr 2018.

CHAPMAN, J. A. *et al.*, Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 138, n. 2, p. 188-94, Aug 2010.

Coughlan A, *et al.*, Antibacterial coatings for medical devices based on glass polyalkenoate cement chemistry. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.19, p. 3555–3560, 2008.

DAVIS, S.M. *et al.*, Consequences of orthodontic treatment of periodontal health: clinical and microbial effects. **Semin Orthodontics**, v.20, p.139-149, 2014.

DO NASCIMENTO, L. E. *et al.*, Are self-ligating brackets related to less formation of *Streptococcus mutans* colonies? A systematic review. **Dental Press Journal Orthodontics**, v. 19, n. 1, p. 60-8, Jan-Feb 2014.

DONLAN, R. M. *et al.*, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews** [S.I.], v. 15, n. 2, p. 167- 93, Apr 2002.

FALTERMEIER, A. *et al.*, Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 133, n. 4 Suppl, p. S99-103, Apr 2008.

FERNANDES C, *et al.*, self-ligating appliances: evolution or revolution?., **Journal Australian Orthodontic**, v. 24,n.1, p. 97-106, 2008.

FERNANDES, D. *et al.*, A estética no sistema de braquetes autoligáveis, **Revista Dental Press Ortodontics Orthopedics Facial** vol.13 no.3 Maringá May/June 2008.

FORSBERG, C. M. *et al.*, Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. **Europe Journal Orthodontics**, v. 13, n. 5, p. 416-20, Oct 1991.

FOURNIER, A. *et al.*, Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic brackets. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.114,p.414-417, 1998.

GARCEZ, A.S. *et al.*, Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics**, St. Louis, v. 140, n. 4, p. 193-198, out. 2011

GAMEIRO, G. H. *et al.*, The influence of drugs and systemic factors on orthodontic tooth movement. **Journal of Clinical Orthodontics** : JCO,v.41, n.2,p.73–78, out. 2007.

GAMEIRO GH, *et al.*, Enamel demineralization with two forms of archwire ligation investigated using an in situ caries model—a pilot study. **Europe Journal Orthodontics**, v.31, p.542–546,2009.

GOLDSTEIN A.N *et al.*, Melting in Semiconductor Nanocrystals. **Revista Science** ,v. 256, p. 1425-1427, jun 1992.

GONG, Y. *et al.*, Clinical, microbiologic, and immunologic factors of orthodontic treatment-induced gingival enlargement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.40, n.1, p.5864, 2011.

GUO, R. *et al.*, The microbial changes in subgingival plaques of orthodontic patients: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 90, Jun 2 2017.

HENRIQUE R.S., *et al.*, Influence of conventional or self-ligated brackets on periodontal parameters- literature review. **Journal of periodontal**, v.28,n.1, marc 2018.

JAROSZ, L. M. *et al.*, *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. **Eukaryotic Cell** [S.I.], v. 8, n. 11, p. 1658-64, Nov 2009.

JUNG W,*et al.*, Adhesion of periodontal pathogens to self-ligating orthodontic brackets: An in-vivo prospective study. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 150, p. 467-75, 2016.

KIM, S. H. *et al.*, Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment. **Angle Orthodontics**, v. 82, n. 2, p. 254-60, Mar 2012.

KLOEHN, J.S. *et al.*, The effect of orthodontic treatment on the periodontium. **Angle Orthodontics**, v.44, p.127-134, 2012.

Lim B.S. *et al.*, Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.133,p.882-888, 2008.

LIN, M. *et al.*, Different engagement of TLR2 and TLR4 in Porphyromonas gingivalis vs. ligature-induced periodontal bone loss. **Braz Oral Rewie**, v. 31, 2018.

LU, H. *et al.*, Quantitative study of porphyromonas gingivalis in subgingival plaques of orthodontic adults. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 28, n. 2, p. 166-9, Apr 2010.

MUMMOLO, S. *et al.*, Inoffice bacteria test for a microbial monitoring during the conventional and selfligating orthodontic treatment. **Head & Face Medicine, Londres**, v. 1, n. 9, fev. 2013.

NARANJO, A. A. *et al.*, Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 130, n. 3, p. 275 e17-22, Sep 2006

OAGARD B. White spot lesions during orthodontic treatment: mechanisms and fluoride preventive aspects. **Semin Orthodontics**, v.14,p.183–193, 2008.

OLIVEIRA M. *et al.*, Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polymerase. Embrapa Pecuária de São Paulo, 2007.

PADUANO S, *et al.*, Time efficiency of self-ligating vs conventional brackets in orthodontics: effect of appliances and ligating systems. **Progama Orthodontics**, v.9, n.2, p.74-80, 2008.

PANDIS N, *et al.*, Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and self-ligating brackets. **Europe Journal Orthodontics**. v.32,p.94-916, 2010.

PAN, S. *et al.*, Prevalence of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis in adolescent orthodontic patients. **Plos One**, v. 12, n. 11, p. 188-420, 2017.

PAPAIOANNOU, W. *et al*, Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets, **European Journal of Orthodontics**, v. 32, Issue 1, p. 94–99, Feb 2007.

PELLEGRINI, P. *et al.*, Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 135, n. 4, p. 426 e1-9; discussion 426-7, Apr 2009.

PEJDA, S. *et al.*, Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. **Angle Orthodontics**, v. 83, n. 1, p. 133-9, Jan 2013.

PELLEGRINI P. *et al.*, Plaque retention by self-ligation vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison or oral bacteria detection with adenosine triphosphate-driven

bioluminescence. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**; v.135, n. 4, p.426.e1-9, 2009.

PEREZ-CHAPARRO, P. J. *et al.*, Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. **Journal Dentistry Review**, v. 93, n. 9, p. 846-58, Sep 2014.

PHITON MM, *et al.*, Do self-ligating brackets favor greater bacterial aggregation? **Brazil Journal Oral Science**. v.10, n.3, p.208-12, 2011.

REGO, R. O. *et al.*, Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 23, n. 6, p. 317-23, Dec 2010.

RISTIC, M. *et al.*, Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora, v.6, n.2, p.129-136, April 2008.

SIM, H. Y. *et al.*, Association between orthodontic treatment and periodontal diseases: Results from a national survey. **Angle Orthodontics**, v. 87, n. 5, p. 651-657, Sep 2017.

SIFAKAKIS, I. *et al.*, Salivary levels of cariogenic bacterial species during orthodontic treatment with thermoplastic aligners or fixed appliances: a prospective cohort study. **Progress in Orthodontics**, v.19. Augst 2018.

SHEN, X. *et al.*, Clinical evaluation of periodontal-orthodontic treatment in patients with aggressive periodontitis and malocclusion. **Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 49, n. 1, p. 60-66, Feb 18 2017.

SHIRTLIFF, M. E. *et al.*, Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **Microbiology Letters [S.I.]**, v. 299, n. 1, p. 1-8, Oct 2009.

SOUZA RA, *et al.*, Periodontal and microbiologic evaluation of 2 methods of archwire ligation: Ligature wires and elastomeric rings **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.134,p.506-512, Orthop 2008.

SUN, F. *et al.*, Comparison of oral microbiota in orthodontic patients and healthy individuals. **Microbiologic Pathologic**, v. 123, n., p. 473-477, Oct 2018.

SWARTZ ML *et al.*, Ceramic Brackets. **Journal of Clinical Orthodontics**, v. 28, n.01, Marc 1988.

TANNER, A. C. *et al.*, White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. **Journal Dentistry Reiwes**, v. 91, n. 9, p. 853-8, Sep 2012.

THEIN, Z. M. *et al.*, Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses [S.I.]**, v. 52, n. 6, p. 467-75, Nov 2009.

TUFEKCI, E. *et al.*, Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. **Angle Orthodontics**, v. 81, n. 2, p. 206-10, Mar 2011.

TÜRKKAHRAMAN H, *et al.*, Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. **Angle Orthodontics**, v.75(2) p.231-6,2005.

VAN DER VEEN, M. H. *et al.*, Caries outcomes after orthodontic treatment with fixed appliances: do lingual brackets make a difference? **European Journal Oral Science**, v. 118, n. 3, p. 298-303, Jun 2010.

VANISHREE, T. *et al.*, Changes in the Oral Environment after Placement of Fixed Orthodontic Appliance for the Treatment of Malocclusion - a Descriptive Longitudinal Study. **Oral Health Dent**, v. 15, n. 5, p. 453-459, 2017.

YU YL, Qian YF. The clinical implication of self-ligating brackets. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v.16 (4), p.431-5, 2007.

ZHANG, J. *et al.*, Efficacy of combined orthodontic-periodontic treatment for patients with periodontitis and its effect on inflammatory cytokines: A comparative study. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 152, n. 4, p. 494-500, Oct 2017.

ZIJNGE, V. *et al.*, Oral biofilm architecture on natural teeth. **Plos One**, v.15, n. 1, Fev 2010.

UNIVERSIDADE DE UBERABA -
UNIUBE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das alterações do ambiente bucal após colocação de aparelho ortodôntico fixo para o tratamento da má oclusão

Pesquisador: Ruchele Dias Nogueira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 16594919.2.0000.5145

Instituição Proponente: SOCIEDADE EDUCACIONAL UBERABENSE

Patrocinador Principal: SOCIEDADE EDUCACIONAL UBERABENSE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.526.349

Apresentação do Projeto:

Retira-se da proposta a seguinte apresentação: "Aparelhos ortodônticos podem estar associados a efeitos adversos intra-orais sobre os dentes e o periodonto, pois fornecem um ambiente adequado para que microorganismos se acumulem em biofilmes e estimulem uma resposta imune do hospedeiro. O acúmulo de biofilmes sobre as superfícies dentais pode levar a processos de desmineralização dentária, bem como o surgimento de doenças periodontais, por meio da formação de biofilmes subgengivais. Se por um lado, o tratamento ortodôntico pode contribuir para a ancoragem microbiana, por outro, o alinhamento dentário pode ajudar na higiene, restaurar a estética, a função mastigatória e a boa oclusão. Vários modelos de aparelhos ortodônticos vem sendo indicados pelos profissionais, a fim de reduzir o acúmulo microbiano ocasionados pelos aparelhos convencionais, como por exemplo os sistemas auto-ligados e os alinhadores termoplásticos. Há controvérsias e pouca informação sobre a diversidade microbiana dos biofilmes formados durante o tratamento ortodôntico, especialmente sobre o envolvimento dos micro-organismos recentemente associados a cárie precoce. Diante disto, são objetivos do estudo avaliar a presença de micro-organismos orais em biofilmes supra e subgengivais, quantificar mediadores inflamatórios e componentes salivares e comparar dados clínicos, como presença de manchas brancas e doenças periodontais em pacientes tratados ortodonticamente com aparelhos convencionais, auto-ligados e alinhadores termoplásticos. Para isto, serão avaliados 100pacientes, sendo 50 entre 12 a 45 anos com indicação para tratamento ortodôntico (G1) e 50 pacientes com

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8816

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 3.526.349

tratamento já iniciado por 6 meses (G2). Serão examinados clinicamente e divididos em grupos, de acordo com as condições periodontais, presença de lesões de cáries e tipo de aparelho ortodôntico indicado para correção da má oclusão. Serão coletadas amostras de fluido crevicular gengival da região dos incisivos inferiores, amostras salivares não estimuladas e biofilmes nos molares. Estas amostras serão encaminhadas para análise dos níveis de mediadores pro-inflamatórias através de Ensaio Elisa e a diversidade microbiana por ensaios de PCR quantitativo. Os resultados elucidarão os efeitos dos diversos tipos de aparelhos ortodônticos na colonização oral, na resposta do hospedeiro e evolução clínica".

Objetivo da Pesquisa:

A proposta descreve os seguintes objetivos primários: "O objetivo geral do estudo é o de avaliar as modificações microbiológicas, bioquímicas e imunológicas do ambiente oral em decorrência do tratamento ortodôntico de diferentes tipos de brackets. Os objetivos específicos incluem analisar a presença de micro-organismos orais em biofilmes supra e subgengivais e mediadores inflamatórios em pacientes com doença periodontal e lesões cáries incipientes tratados ortodonticamente com aparelhos convencionais, auto-ligados e alinhadores termoplásticos e observar os efeitos clínicos do tratamento ortodôntico no restabelecimento das doenças associadas. Além de divulgar e publicar os resultados encontrados em revistas de bom impacto, formar alunos de mestrado e doutorado em várias áreas de conhecimento

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A proposta descreve os seguintes riscos e benefícios:

"Riscos: O presente projeto não apresenta riscos aos participantes por se tratar de coletas seguras, não invasivas e indolores".

"Benefícios: Os benefícios aos participantes concentrar-se-ão nas instruções individuais realizadas pelos pesquisadores sobre a prevenção de doença oral (cárie e doenças periodontais) durante o tratamento ortodôntico. Após a realização das coletas será realizado profilaxia e adequação do meio bucal, com auxílio de taças de borracha e pasta dentária fluoretada. Os pacientes que apresentarem cárie ou doença periodontal durante o exame clínico serão encaminhados para tratamento na Clínica Integrada da Universidade de Uberaba".

Foi solicitado no último parecer que os autores se atentassem para complementar as informações dos riscos e dos benefícios com dados sobre o risco da perda de confidencialidadee sobre o benefício indireto da proposta.

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801	
Bairro: Universitário	CEP: 38.055-500
UF: MG	Município: UBERABA
Telefone: (34)3319-8816	Fax: (34)3314-8910
	E-mail: cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 3.526.349

Nessa última versão do PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1389701, estas informações continuam ausentes. Tais informações foram corrigidas/adicionadas apenas nos seguintes documentos: 1- TCLE(TERMO_DE_CONSENTIMENTO_ORTOCORRIGIDO), 2- Projeto completo (Projeto_ORTO_corrigo) e 3- Carta de resposta ao CEP-UNIUBE (carta_resposta_CEP_UNIUBE_2019_ORTO);

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No presente projeto, os autores visam a realização de um estudo laboratorial, do tipo experimental, de natureza qualitativa, com finalidade aplicada, e com temporalidade transversal. Afim de avaliar a presença de micro-organismos orais em biofilmes supra e subgingivais, quantificar mediadores inflamatórios e componentes salivares e comparar dados clínicos, como presença de manchas brancas e doenças periodontais em pacientes tratados ortodonticamente com aparelhos convencionais, auto-ligados e alinhadores termoplásticos.

Após análise dos documentos enviados, constata-se que o presente projeto de pesquisa apresenta todos os componentes necessários, tendo objetivos, metodologia, hipóteses e justificativas pertinentes a pergunta/problema de pesquisa. Dessa forma, o presente projeto está de acordo com todos os quesitos legislados pela Resolução 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores apresentam os seguintes documentos:

- 1- Projeto preenchido na Plataforma Brasil (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1389701);
- 2- Projeto Detalhado / Brochura Investigador (Projeto_ORTO_corrigo.doc);
- 3 - TCLE/Termos de Assentimento/Justificativa de Ausência(Projeto_ORTO_corrigo.doc) ;
- 4- Carta de autorização assinada pelos Coordenadores Clínicos da Policlínica Getúlio Vargas(cart_autorizacao_orto.pdf);
- 5- Declaração do conhecimento e anuência a Resolução 466/12(DECLARAcAoOORTO.pdf);
- 6- Folha de rosto - Plataforma Brasil assinada pelo Pro-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da UNIUBE (pagina_rosto.jpeg);
- 7- Carta de Resposta ao CEP-UNIUBE (carta_resposta_CEP_UNIUBE_2019_ORTO.pdf).

Recomendações:

Nada digno de nota.

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801	CEP: 38.055-500
Bairro: Universitário	
UF: MG	Município: UBERABA
Telefone: (34)3319-8816	Fax: (34)3314-8910
	E-mail: cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 3.526.349

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Salvo melhor entendimento dos componentes desta Plenária, o presente projeto pode ser aprovado em razão que nesta versão foi apresentada todas as correções sugeridas anteriormente. Nesta versão, o presente projeto está de acordo com todos os quesitos legislados pela Resolução 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em 22/08/2019, a plenária votou de acordo com o relator, pela aprovação da proposta. O CEP-UNIUBE lembra o pesquisador responsável pelo projeto do seu compromisso com a Resolução 466/12, especialmente no tocante à proteção do participante da pesquisa e da entrega do relatório parcial/final através de Emenda, na Plataforma Brasil

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1389701.pdf	30/07/2019 14:30:21		Aceito
Outros	carta_resposta_CEP_UNIUBE_2019_ORTO.pdf	30/07/2019 14:29:53	Ruchele Dias Nogueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ORTO_corrigido.docx	30/07/2019 14:29:34	Ruchele Dias Nogueira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_ORTOCORRIGIDO.doc	30/07/2019 14:28:06	Ruchele Dias Nogueira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAOORTO.pdf	01/07/2019 11:54:54	Ruchele Dias Nogueira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_autorizacao_orto.jpeg	01/07/2019 11:49:39	Ruchele Dias Nogueira	Aceito
Folha de Rosto	pagina_rosto.pdf	01/07/2019 11:48:04	Ruchele Dias Nogueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8816

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br