

UNIVERSIDADE DE UBERABA

ANA CRISTINA DA SILVEIRA SANTOS

ELIANA BATISTA DA SILVA

**Análise da adesão de *Streptococcus mutans* em diferentes tipos de
brackets.**

Uberaba

2019

UNIVERSIDADE DE UBERABA

ANA CRISTINA DA SILVEIRA SANTOS

ELIANA BATISTA DA SILVA

**Análise da adesão de *Streptococcus mutans* em diferentes tipos de
brackets.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba, como parte dos requisitos para à conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Prof.(a) Ruchele Dias Nogueira
Geraldo Martins

Uberaba

2019

Santos, Ana Cristina da Silveira.
S59a Análise da adesão de Streptococcus mutans em diferentes tipos de brackets / Ana Cristina da Silveira Santos, Eliana Batista da Silva. – Uberaba, 2019.
19 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso -- Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia, 2019.
Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins.

1. Braquetes ortodônticos. 2. Streptococcus mutans. 3. Odontologia. I. Silva, Eliana Batista da. II. Martins, Ruchele Dias Nogueira Geraldo. III. Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia. IV. Título.

CDD 617.643

UNIVERSIDADE DE UBERABA

ANA CRISTINA DA SILVEIRA SANTOS

ELIANA BATISTA DA SILVA

Análise de *Streptococcus mutans* em diferentes tipos de brackets.

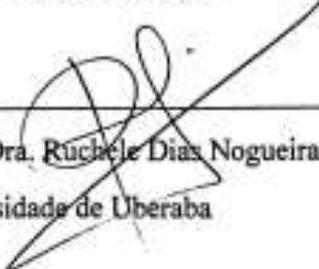
Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba.

Aprovada em: 29 /07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.  Ruchele Dias Nogueira G. Martins
Universidade de Uberaba

Prof. Dr.  Afonso Lomovani de Castro
Universidade de Uberaba

Prof. Dra.  Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins
Universidade de Uberaba

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus por ter me abençoado e ter chegado até aqui. À Prof.^a Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins pela sua atenção dedicada ao longo de todo o projeto. A minha mãe, Maria Helena da Silveira por ser minha base. À minha irmã, Ana Paula Duarte ter me dado a oportunidade de trilhar esta jornada. Ao meu companheiro Carlos Humberto Costa Junior que foi capaz de suportar todos os meus momentos de estresse durante o processo, me dedicaram tempo e atenção, me passaram a confiança para seguir em frente nos estudos, especialmente nos momentos mais difíceis.

Atenciosamente, Ana Cristina da Silveira Santos.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me conceder a sabedoria, paciência e os dons necessários para concluir esta etapa em minha vida. À minha família, aos meus pais, Rozendo Anjos da Silva e Helena Batista da Silva por todo o empenho, apoio e por todos os sacrifícios que fizeram para que este meu sonho se realizasse. Aos meus irmãos, Edson Batista da Silva, Rosilene Batista da Silva e André Luis Batista da Silva, por todo carinho e apoio dedicado. À Prof.^a Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Atenciosamente, Eliana Batista da Silva.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter nos dado força para nos dedicarmos a este curso e por nunca nos desamparar.

Aos nossos familiares por terem lutado e nos apoiado, ajudando-nos a realizar este sonho.

À Universidade de Uberaba, por nos proporcionar os meios necessários para que pudéssemos concluir este nosso sonho e pelo ensino de excelência.

A todos os professores que passaram por nós nestes anos de graduação, por nos apresentarem a Odontologia de forma competente e apaixonante, por nos motivarem a ser melhores a cada momento e superar nossas limitações.

Aos funcionários da instituição que sempre estiveram à disposição, para que nada nos faltasse.

A Prof.^a Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, nossa orientadora e amiga, por toda a atenção, apoio, confiança e dedicação que teve conosco e com este trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a nossa formação, o nosso muito obrigada.

RESUMO

A adesão de bactérias nos brackets representam uma grande preocupação do tratamento ortodôntico, especialmente de *Streptococcus mutans*, que é o principal agente etiológico da cárie. Vários brackets são utilizados na prática, como os de aço inoxidável e os estéticos. Os brackets autoligados são apresentados com ótimas propriedades biomecânicas e com menor adesão microbiana. Diante disto, é objetivo do presente trabalho analisar e comparar a quantidade de *Streptococcus mutans* aderidos a diferentes tipos de brackets ortodônticos. Os experimentos de adesão foram realizados utilizando brackets ortodônticos, sendo estes: autoligados, cerâmicos e convencionais. Cultura de *S. mutans* ($DO^{600nm} = 1.0$) cultivada em meio de cultura Brian Heart Infusion em microaerofilia foi utilizada para a formação de biofilme em placas estéreis de 24 poços (Costar). Os brackets foram imersos nas culturas e deixados por 24 horas. Em seguida os brackets foram removidos e lavados com PBS estéril para remoção das bactérias não aderentes. Os brackets com suas bactérias aderentes foram tratados com tripsina EDTA, para descolamento das bactérias aderentes e incluídos em meio estéril e seguidos por sonicação vigorosa por 1 minuto. A seguir diluições seriadas foram realizadas e inoculadas em placas de BHI ágar com 5% de sacarose. Após 48 horas de incubação foi realizada a contagem do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Os resultados mostraram que um total médio de $379,5 \pm 192,41$; $8,7 \pm 9,3$ e $0,5 \pm 1,5$ UFC foram encontrados para os brackets cerâmicos, autoligados e convencionais respectivamente. O número de UFC nos cerâmicos foram estatisticamente maiores e significantes do que nos demais brackets de aço (ANOVA, $p < 0.0001$). Concluiu-se que os brackets cerâmicos possibilitaram maior adesão e formação de biofilme de *S. mutans* seguido pelo autoligado.

Palavras Chave: Brackets ortodônticos, biofilme, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

The adhesion of bacteria to the brackets represent a major concern of orthodontic treatment, especially of *Streptococcus mutans*, which is the main etiological agent of caries. Several brackets are used in practice, such as stainless steel and aesthetics. Self-ligating brackets are presented with excellent biomechanical properties and with lower microbial adhesion. In view of this, it is the objective of this study to analyze and compare the amount of *Streptococcus mutans* adhered to different types of orthodontic brackets. The adhesion experiments were performed using orthodontic brackets, these being: self-ligating, ceramic and conventional. Culture of *S. mutans* ($DO^{600nm} = 1.0$) cultured in Brian Heart Infusion microaerophilic culture medium was used for biofilm formation in sterile 24-well plates (Costar). The brackets were immersed in the cultures and left for 24 hours. Then the brackets were removed and washed with sterile PBS to remove non-adherent bacteria. The brackets with their adherent bacteria are treated with trypsin EDTA for detachment of the adherent bacteria and included in sterile medium and followed by vigorous sonication for 1 minute. Subsequent serial dilutions were performed and inoculated on BHI agar plates with 5% sucrose. After 48 hours of incubation, the count of the CFU (Colony Forming Units) was counted. The results showed that a mean total of 379.5 ± 192.41 ; 8.7 ± 9.3 and 0.5 ± 1.5 UFC were found for self-ligating and conventional ceramic brackets, respectively. The number of CFUs in the ceramics were statistically larger and significant than in the other steel brackets (ANOVA, $p < 0.0001$). It was concluded that the ceramic brackets allowed for greater adhesion and biofilm formation of *S. mutans* followed by self-ligating brackets.

Keywords: orthodontic Brackets, biofilm, *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. OBJETIVOS	12
3. Material e Métodos	12
4. Resultados esperados	14
5. Conclusão	18
6. Referencias	19

LISTA DE IMAGENS

Tabela 1- Seleção da Cepa e Meios de Cultura	12
Figura 1 - Meios de cultura contendo colônias de <i>S. mutans</i> crescida após o contato com brackets cerâmicos, Autoligado (SLI) e Convencional (MAX)	14
Figura 2 - Valores médios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>S. mutans</i> aderidos aos brackets cerâmicos, autoligados e Convencionais.	15
Figura 3- Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>S. mutans</i> aderidos aos brackets autoligados e Convencionais.	15

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, e que traz várias alterações neste ambiente bucal sendo algumas benéficas e outras que podem trazer problemas para o paciente. O desequilíbrio microbiológico de um hospedeiro, devido ao aumento e modificação da colonização microbiana subgengival está amplamente relacionada a etiologia das gengivites e periodontites (Kim et al., 2012). 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 e subgengival e o estado periodontal, dentário e imunológico precisam ser investigados e constantemente vigiados.

Os dispositivos utilizados em aparelhos ortodônticos (bandas, fios, ligaduras e ou braquetes) podem promover o aumento da adesão de bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* (Forsberg 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 (Tufekci et al., 2011), ao aumento do risco de desmineralização do esmalte (Faltermeier 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).

Diante do reconhecimento do acúmulo microbiano e das doenças orais recorrentes ao uso de aparelhos ortodônticos fixos, os avanços científicos e tecnológicos da Ortodontia vem 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 comum são os de aço inoxidável. Em decorrência da busca de tratamentos ortodônticos mais estéticos, surgiram os bráquetes construídos com materiais cerâmicos e mais recentemente, os alinhadores termoplásticos, que consistem em um conjunto de placas confeccionadas a partir de um escaneamento dos dentes do paciente e que é composto por moldeiras que cobrem todos os dentes incluindo a gengiva marginal, que pode ser removido para alimentação e higiene.

Os bráquetes convencionais estão associados ao uso de ligadura elastomérica 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 (Cacciafesta 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 aplicada, 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 brackets (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.

2. HIPÓTESE

Os brackets autoligados aderem uma menor quantidade de *S.mutans* em comparação com os demais testados.

3. OBJETIVOS

Gerais:

- Avaliar a adesão de *Streptococcus mutans* em diferentes tipos de bráquetes ortodônticos.

Específicos:

- Comparar o número de *S. mutans* crescidos em meio de cultura em brackets autoligados, cerâmicos e convencionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da Cepa Microbiana e Meios de Cultura

O quadro a seguir indica a cepa, seu registro de ATCC, e os meios de cultura utilizado para obtenção do inóculo para os testes realizados:

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

Tabela 1- Seleção da Cepa e Meios de Cultura

4.2 Ensaios de Contaminação com SM nos brackets *in vitro*

4.2.2 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 SM 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.

4.2.3 Adesão de bactérias a suportes ortodônticos

Foram utilizadas dez repetições em placas estéreis de 24 poços de microtitulação com fundo plano de poliestireno (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Foram utilizados brackets Metálicos (aço inoxidável) convencionais (Max) e autoligados (SLI), cerâmico (policristalino alumina) da marca Morelli (*Sorocaba - SP*) do incisivo central inferior. Todos os brackets tinham um Slot de 0,022 polegadas. Dez brackets de cada tipo foram previamente autoclavado 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 brackets 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 brackets 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.

Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando BioSTAT. Análise de variância unidirecional (ANOVA) e pós teste de Boferroni foi utilizado para comparar o número de UFC de acordo tipo de bracket. Para todas as análises, considerou-se $p < 0.05$ estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aparelhos ortodônticos fixos impedem medidas de higiene bucal e aumentam a formação de biofilme dentário, que causam e iniciam uma manifestação periodontal inflamatória, especialmente em pacientes adultos submetidos ao tratamento. Medidas preventivas que controlem a formação de biofilme dental, durante a ortodontia, podem ser extremamente benéficas para o paciente, mas alguns estudos relacionados aos problemas relacionados com a formação do biofilme e a consequente desmineralização do esmalte e inflamação dos tecidos moles, permanecem sem solução (Oaagard, 2008). Dentro das limitações da revisão de literatura de Nascimento e colaboradores (2014), os autores concluíram 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 que houve crescimento microbiano após a incubação (Figura 1) e o número de UFC foi contado. Foram encontradas diferenças significativas na adesão de *S. mutans* nos diferentes tipos de brackets (Figura 1). Um total médio de $379,5 \pm 192,41$; $8,7 \pm 9,3$ e $0,5 \pm 1,5$ UFC foram encontrados para os brackets cerâmicos, autoligados e convencionais respectivamente (Figura 2). O número de UFC foram estatisticamente maiores e significantes do que nos demais brackets (Figura 2, ANOVA, $p < 0.0001$).



Figura1. Meios de cultura contendo colônias de *S. mutans* crescida após o contato com brackets cerâmicos, Autoligado (SLI) e Convencional (MAX).

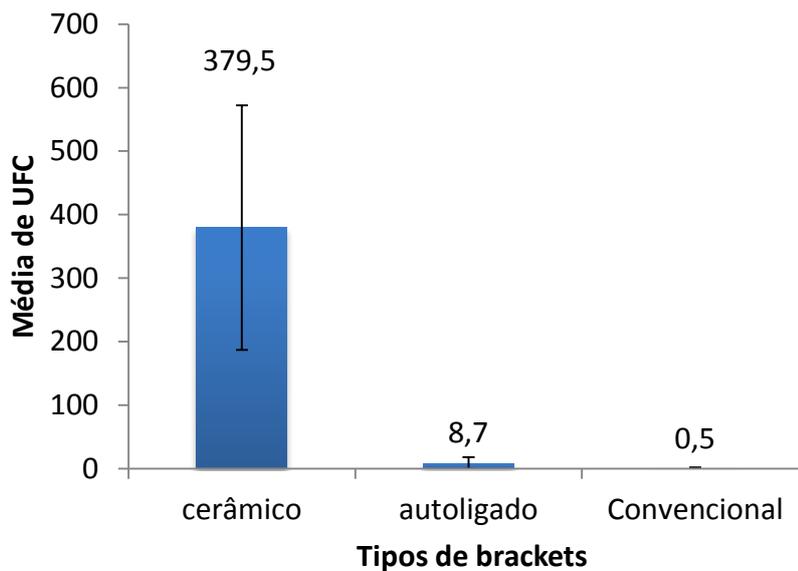


Figura 2. Valores médios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. mutans* aderidos aos brackets cerâmicos, autoligados e Convencionais.

Houve também uma diferença estatisticamente significativa entre os brackets de aço inoxidável (Figs 2 e 3, ANOVA, $p=0.016$), em que os autoligados aderiram mais micro-organismos que o convencional. Todos os brackets autoligados apresentam pelo menos 1 UFC ($n=2$), enquanto que apenas 1 convencional apresentou 5 UFCs (figura 3).

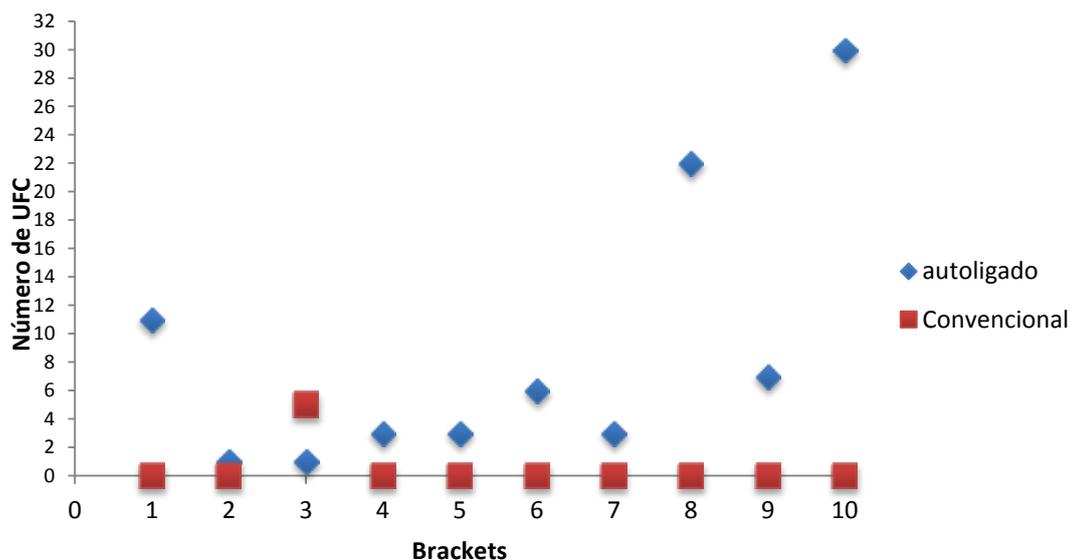


Figura 3. Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. mutans* aderidos aos brackets autoligados e Convencionais.

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). Além do que, as propriedades elétricas de superfície, como zeta e potenciais de transmissão e cargas de superfície, também estão envolvidos em interações interfaciais com fluidos biológicos e células vivas. Nosso resultado mostrou que *S. mutans* tiveram menor afinidade aos brackets de aço inoxidável do que ao de cerâmica como encontrado por Fournier et al, (1998); e Papaioannou et al., 2007), discordando de Ahn et al (2002) que constatou que o aço inoxidável teve a maior adesão microbiana.

O marketing dos brackets autoligáveis anunciam uma melhor eficácia no controle da acumulação bacteriana em sua superfície, por causa da eliminação de elastômero e ligaduras de aço inoxidável. Estudos que comparam a influência de autoligáveis e brackets 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 (Gameiro et al., 2009, Pellegrini et al., 2009).

Há muitas controvérsias a respeito da colonização microbiana nos diversos tipos de brackets metálicos. Alguns estudos (Pellegrini et al., 2009; Paduano et al., 2008; Yu & Qian, 2007; Fernandes & Almeida, 2008, Türkkahraman et al., 2005) relatam que os braquetes autoligados são menos suscetíveis à colonização bacteriana devido à sua forma, além da falta de ligaduras metálicas ou elastoméricas. Outros estudos (Phiton et al., 2011; Pejda et al., 2013, Pandis et al., 2010) não foram unânimes em relatar uma possível influência do desenho de brackets (convencional ou auto-ligante) sobre a adesão e formação de colônias de *Streptococcus mutans*.

Pedja et al.(2013) não encontraram diferenças na adesão de periodontopatógenos em diferentes tipos de brackets de aço inoxidável (convencional e autoligado). No entanto, Garcez et al. (2011) mostraram diferença significativa na quantidade e composição de biofilme próximo a diferentes tipos de brackets. Eles mostraram que havia menos biofilme supragengival nos brackets convencionais ligados com ligadura de aço inoxidável do que em autoligados em condições *in vitro*. Um estudo recente de Pithon et al. (2011) também mostrou maior acúmulo bacteriano em autoligado do que

em bráquetes convencionais mesmo ligados com ligadura elástica. Por outro lado, um estudo *in vivo* de Pellegrini et al. (2009) sugerem maior retenção de bactérias na placa brackets convencionais ligados com ligadura elastomérica do que em autoligados.

Diante dos resultados a hipótese do estudo foi parcialmente refutada pois os autoligados foram menos aderentes ao cerâmicos mas os convencionais tiveram uma menor capacidade de adesão. Há de se considerar que os brackets convencionais funcionam com ligaduras elastoméricas que permitiram uma adesão microbiana. Além disto, o controle adequado do biofilme pelo paciente é mais fortemente influenciado pela correta orientação e cooperação dos pacientes do que pela simples escolha de um sistema de bracket ao invés de outro.

5- CONCLUSÕES

Através do experimento laboratorial, foi possível encontrar diferenças significativas na adesão do *S. mutans* nos brackets cerâmico, autoligados e convencional.

O maior crescimento do *S. mutans* foi registrado para os brackets de cerâmica. Em relação ao autoligado houve crescimento maior que o convencional.

A composição do material do aparelho e a microbiota do hospedeiro são fatores determinantes para adesão de bactérias como o *S. mutans* e a progressão para uma doença periodontal.

6 - REFERÊNCIAS

- 1- AHN, S. J. et al. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v. 131, n. 6, p. 736-41, Jun 2007.
- 2- CACCIAFESTA, V. et al. Evaluation of friction of stainless steel and esthetic self-ligating brackets in various bracket-archwire combinations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v. 124, n. 4, p. 395-402, Oct 2003.
- 3- CHAPMAN, J. A. et al. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v. 138, n. 2, p. 188-94, Aug 2010.
- 4- DO NASCIMENTO, L. E. et al. Are self-ligating brackets related to less formation of *Streptococcus mutans* colonies? A systematic review. *Dental Press J Orthod*, v. 19, n. 1, p. 60-8, Jan-Feb 2014.
- 5- FALTERMEIER, A. et al. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v. 133, n. 4 Suppl, p. S99-103, Apr 2008.
- 6- FERNANDES C, Almeida R. self-ligating appliances: evolution or revolution? *Aust Orthod*. 2008;24(1):97-103.
- 7- 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*. *Eur J Orthod*, v. 13, n. 5, p. 416-20, Oct 1991.
- 8- FOURNIER A, Payant L, Bouclin R. Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1998;114:414-417.

- 9- GAMEIRO GH, Nouer DF, Cenci MS, Cury JA. Enamel demineralization with two forms of archwire ligation investigated using an in situ caries model—a pilot study. *Eur J Orthod.* 2009;31:542–546.
- 10- GARCEZ AS, Suzuki SS, Ribeiro MS, Mada EY, Freitas AZ, Suzuki H. Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthoped.* 2011;140:193–198.
- 11- OAAGARD B. White spot lesions during orthodontic treatment: mechanisms and fluoride preventive aspects. *Semin Orthod.* 2008;14:183–193.
- 12- KIM, S. H. et al. Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment. *Angle Orthod*, v. 82, n. 2, p. 254-60, Mar 2012.
- 13- PADUANO S, Cioffi I, Iodice G, Rapuano A, Silva R. Time efficiency of self-ligating vs conventional brackets in orthodontics: effect of appliances and ligating systems. *Prog Orthod.* 2008;9(2):74-80.
- 14- PANDIS N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *Eur J Orthod.* 2010;32(1):94-916.
- 15- PAPAIOANNOU W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod.* 2007 Nov;77(6):1090-5.
- 16- PEJDA S, Varga ML, Milosevic SA, Mestrovic S, Slaj M, Repic d, Bosnjak A. Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2013;83(1):133-9

- 17- PELLEGRINI P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA Jr, Maier T, et al. Plaque retention by self-ligation vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison or oral bacteria detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135(4):426.e1-9.
- 18- PHITON MM, Santos RL, Nascimento LE, Ayres AO, Alviano D, Bolognese AM. Do self-ligating brackets favor greater bacterial aggregation? *Braz J Oral Sci.* 2011;10(3):208-12
- 19- REGO, R. O. et al. Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. *Am J Dent*, v. 23, n. 6, p. 317-23, Dec 2010.
- 20- TANNER, A. C. et al. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *J Dent Res*, v. 91, n. 9, p. 853-8, Sep 2012.
- 21- TUFEKCI, E. et al. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *Angle Orthod*, v. 81, n. 2, p. 206-10, Mar 2011.
- 22- TÜRKKAHRAMAN H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod.* 2005;75(2):231-6.
- 23- VAN DER VEEN, M. H. et al. Caries outcomes after orthodontic treatment with fixed appliances: do lingual brackets make a difference? *Eur J Oral Sci*, v. 118, n. 3, p. 298-303, Jun 2010.
- 24- 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 Prev Dent*, v. 15, n. 5, p. 453-459, 2017.

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