



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

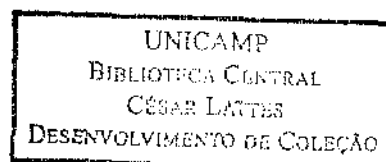


RICARDO ALVES DE SOUZA
Cirurgião-Dentista

**AVALIAÇÃO PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICA EM
PACIENTES COM DOIS TIPOS DE LIGADURAS
ORTODÔNTICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba - Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Radiologia Odontológica, Área
de Concentração em Ortodontia.

Piracicaba
2006





Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

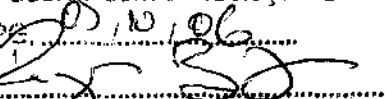


RICARDO ALVES DE SOUZA
Cirurgião-Dentista

AVALIAÇÃO PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICA EM
PACIENTES COM DOIS TIPOS DE LIGADURAS
ORTODÔNTICAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Radiologia Odontológica, Área de Concentração em Ortodontia.

este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a resolução CCPG 036/83.


Assinatura do Orientador

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani

Co-orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

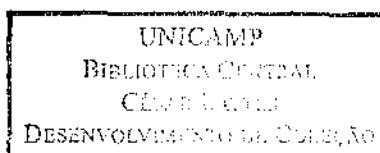
Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani

Prof. Dr. José Fernando Castanha Henriques

Prof. Dr. Darcy Flávio Nouer

Piracicaba
2006



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA: 7/UNICAMP
2009
 Ed. _____
 OMBO BCI 72641
 ROC. 16.145-07
☐ ☒ ☐
 REÇO 11.00
 ATA 23/05/07
 B-ID 41.1469

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
 Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

So89a Souza, Ricardo Alves de.
 Avaliação periodontal e microbiológica em pacientes com dois
 tipos de ligaduras ortodônticas. / Ricardo Alves de Souza. --
 Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores: Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani,
 Reginaldo Bruno Gonçalves

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Placa dentária. 2. Gengivite. 3. Reação em cadeia da
 polimerase. 4. Materiais dentários. 5. Higiene dental. I. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
 Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Periodontal and microbiologic evaluation in patients with two methods
 of orthodontic archwire ligation

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental plaque. 2. Gingivitis. 3. Polymerase
 chain reaction. 4. Dental materials. 5. Oral hygiene

Área de Concentração: Ortodontia

Titulação: Mestre em Radiologia Odontológica

Banca Examinadora: Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani, Darcy Flávio Nouer, José
 Fernando Castanha Henriques

Data da Defesa: 28-09-2006

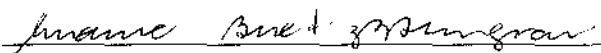
Programa de Pós-Graduação: Radiologia Odontológica

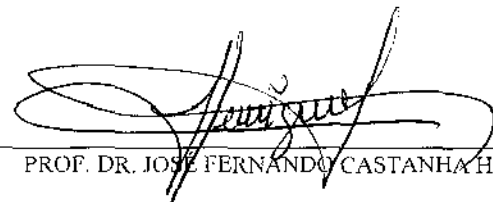


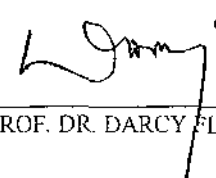
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 28 de Setembro de 2006, considerou o candidato RICARDO ALVES DE SOUZA aprovado.


PROFa. DRa. MARIA BEATRIZ BORGES DE ARAUJO MAGNANI


PROF. DR. JOSE FERNANDO CASTANHA HENRIQUES


PROF. DR. DARCY FLAVIO NOUER

2007-22735

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido irmão Carlos Eduardo
Alves Argolo Souza, que para sempre estará presente em
minha memória e em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por me conceder a graça de estar vivo, por guiar minha vida em todos os momentos e permitir mais este objetivo.

À Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Magnífico Reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge** e vice-reitor **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Diretor **Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho** e Diretor associado **Prof. Dr. Mário Fernando de Góes**.

A **Profª. Drª. Cecília Gatti Guirado** Chefe do Departamento de Odontologia Infantil, da FOP-UNICAMP.

Ao **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**, coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação e à **Profª. Drª. Gláucia Maria Bovi Ambrosano**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Radiologia Odontológica.

Ao **Prof. Dr. Darcy Flávio Nouer**, coordenador da Área de Ortodontia da FOP-UNICAMP, pela competência, pela colaboração, pelo compartilhamento dos conhecimentos e experiências na Ortodontia, e principalmente, pela confiança depositada em meu trabalho em todo este período de convivência, desde meu ingresso na FOP em 2001, nos cursos de Atualização e de Especialização.

A **Profª. Drª. Vânia Célia Vieira de Siqueira** da FOP-UNICAMP, pela sua dedicação ao ensino e pesquisa na Ortodontia, estimulando o aluno ao raciocínio crítico e contribuindo valorosamente para minha formação, como também para minha vida.

Ao **Prof. Dr. João Sarmento Pereira Neto** da FOP-UNICAMP, cuja amizade e auxílios prestados, não estão presentes apenas na realização deste trabalho, mas também em diversos momentos de minha estada em Piracicaba, sempre com humildade e gentileza em todos os aspectos, compreendendo nossas necessidades como pessoa e como alunos.

Ao professor **Dr. Paulo Roberto Aranha Nouer**, pela amizade e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional, despertando ainda mais o interesse em melhorar todos os aspectos de nossa profissão.

À professora **Gláucia Maria Bovi Ambrosano e Rafael Ambrosano** pela ajuda dispensada nas análises estáticas.

Aos amigos **Cléverson, Fábio, Saulo, André e César**, cujo convívio se tornou fonte de aprendizado e companheirismo. Com certeza, vocês fazem parte desta história.

Aos colegas de Mestrado **Vanessa, Ana Zilda e Viviane**, pela nossa amizade que cresceu durante o curso, e com certeza será para sempre. Agradeço pela colaboração na seleção dos pacientes para esta pesquisa, por todas alegrias e dificuldades que passamos juntos. Vocês foram muito importantes para superar esta intensa jornada.

Aos alunos do Doutorado **Gustavo, Fábio e Meire**, muito próximos de nós em todo este período, por isso, tenho certeza que encontrei grandes amigos para o resto de minha vida.

Aos amigos, ex-alunos de Doutorado da FOP-UNICAMP, **Stênio, Mayury, Fernando, Bruno, Silvia, Adriana, Haroldo, Tubel, Heloísa Valdrigh, Tukasan**, dentre outros, os quais sempre estiveram dispostos a incentivar e ensinar em todos os momentos. Agradeço a oportunidade de conhecê-los, e também por todo aprendizado, desde meu início nesta faculdade.

Aos professores das diversas áreas da FOP-UNICAMP, pelas aulas e cursos ministrados neste período. Aos professores de inglês e amigos **Jorge e Margery**.

Aos amigos das áreas de Periodontia, Microbiologia, Radiologia, Odontopediatria, Dentística e Materiais Dentários, pelos vários momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos amigos e amigas das diversas turmas de graduação e de especialização da FOP-UNICAMP, nas quais trabalhamos juntos.

Às secretárias das áreas, departamentos e pós-graduação da FOP-UNICAMP **Elizabeth, Tuca, Roberta, Raquel, Érica e Maria Elisa**, pela amizade, atenção e presteza durante todo o curso.

Às protéticas **Renata e Maria Roselis** pelo apoio nos trabalhos da clínica.

A todos outros funcionários da FOP-UNICAMP, técnicos de laboratórios e das clínicas, bibliotecárias, porteiros, de serviços gerais, e outros, que permitiram o desenvolvimento de nossas atividades.

Aos ex-funcionários **Roberto, Paloma e Nilmes** pela amizade, atenção e auxílio prestados.

Aos nossos pacientes de Ortodontia da FOP-UNICAMP, sem os quais não seria possível passar por todas estas etapas de aprendizado.

A CAPES, pelo apoio financeiro durante o curso de Mestrado.

Aos amigos da Bahia, **André Biondi, Marcelo e Roberto Pessoa, Maurício Maia, Vinicius Tolomei, Gustavo, Rodrigo, Elias, Zuza, Carlos Vieira, Ana Cláudia, Camila, Jadiane, Maurício Bulhões**, e muitos outros, além dos amigos e colegas da UESB, que torceram por mim todos estes anos.

Aos professores e amigos da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), responsáveis pela minha formação profissional.

A todos meus amigos e familiares, avós e avôs, tios e tias, primos e primas, sogro e sogra, cunhados, enfim, a todos as pessoas que participaram de minha vida e de minha formação.

Obrigado a todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram não só para a execução deste trabalho, mas sobretudo para minha evolução pessoal, dando força, carinho e com orações.

Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço imensamente à minha orientadora **Profª. Drª. Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani**. Agradeço o apoio, a atenção e a sua sabedoria, imprescindível para realização deste trabalho. Sou muito grato pelo carinho e pela sincera amizade adquiridos ao longo destes anos. Muito obrigado por tudo, pois graças à senhora cheguei até aqui!

Ao amigo e **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves**, que desde o primeiro contato, mesmo à distância e sem me conhecer ainda, mostrou uma disponibilidade imensa para viabilizar esta pesquisa. Sua experiência, dedicação e conhecimento possibilitaram a existência deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum** por suas valiosas sugestões para melhoria de meu trabalho, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos.

À aluna de Doutorado da Área de Microbiologia **Marlise Inêz Klein**, e ao aluno de Doutorado da Área de Periodontia **Cléverson Oliveira da Silva**, cuja colaboração em diversas etapas do trabalho foram indispensáveis, principalmente pela necessidade da interação interdisciplinar. Minha admiração por vocês e amizade jamais serão esquecidos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A meus pais **Josenildo Argolo Souza** e **Jovina Alves Argolo Souza**, inicialmente pela vida, pelo amor incondicional em todos estes anos, pela formação de minha personalidade e educação, pelos seus esforços, amor incondicional, dedicação e carinho.

Aos meus irmãos **Flávio Alves de Sousa** e **Camila Alves Souza**, e minha prima **Michele Cunha Dávila**, pela ajuda e incentivo que me deram para seguir este caminho.

A **Manuela Ribeiro Passos**, pelo amor, carinho, paciência e compreensão em virtude dos momentos ausentes.

**“Cada qual sabe amar a seu modo.
O modo pouco importa, o essencial é que saiba amar”.**

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
I - INTRODUÇÃO	3
II – PROPOSIÇÃO	6
III – CAPÍTULOS	7
CAPÍTULO 1	8
<i>Artigo 1: Alterações periodontais e microbiológicas após instalação de aparelho ortodôntico fixo</i>	
CAPÍTULO 2	23
<i>Artigo 2: Periodontal and microbiologic evaluation of two methods of archwire ligation: ligatures wires and elastomeric rings</i>	
IV - CONCLUSÕES	46
V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	52
1 - Deliberação da Coordenadoria Central de Pós-Graduação	52
2 - Exigência mínima para defesa de tese em formato alternativo	53
3 - Certificado Comitê de Ética	54
4 - Confirmação de envio do artigo do Capítulo 1	55
5 - Confirmação de aceite para publicação do artigo do Capítulo 2	56
6 - Tabelas e Gráficos	57
7 - Protocolo para extração de DNA	59
APÊNDICES	63

RESUMO

A dificuldade no controle de biofilme dentário em paciente sob tratamento ortodôntico promove modificações no periodonto e na microbiota normais da cavidade bucal. Neste aspecto, poucos estudos investigaram os efeitos dos dispositivos de amarração do arco ortodôntico, como ligaduras elásticas e metálicas. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações periodontais e microbiológicas de pacientes com aparelho ortodôntico fixo. No capítulo 1, através de uma revisão de literatura, evidenciou-se que, de forma geral, nos parâmetros periodontais, os resultados foram significativos para acúmulo de biofilme e inflamação gengival durante tratamento ortodôntico fixo. Neste estudo, caracterizou-se também, a forte correlação de espécies como *A. actinomycetemcomitans* ao biofilme subgengival de bandas ortodônticas. No capítulo 2 intitulado: *Periodontal and microbiologic evaluation of two methods of archwire ligation: ligatures wires and elastomeric rings*, estes dois métodos em questão foram comparadas, considerando aspectos periodontais e microbiológicos. Para realização desta pesquisa, foram selecionados 14 pacientes, sem sinais clínicos de inflamação gengival, em que foram coletadas amostras de biofilme dos dentes 15, 25, 32 e 42, antes da instalação de aparelho fixo, e após seis meses de tratamento. Cada arco ortodôntico foi fixado com anéis elásticos em um dos lados das arcadas, enquanto ligaduras metálicas foram utilizadas no lado oposto. Como parâmetro periodontal foi utilizado: índice de placa, de sangramento gengival e profundidade à sondagem; e para detecção de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, e *P. nigrescens*, foi realizada técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Após análise de variância ($p < 5\%$), os resultados periodontais mostraram diferenças estatísticas significantes para os anéis elásticos, que exibiram um elevado valor para índice de placa e de sangramento. Pelo teste de McNemar, os anéis elásticos demonstraram quantidade significativa no número de sítios positivos de *T. forsythia* e *P. nigrescens*, quando comparado às ligaduras metálicas ($p < 5\%$). Os resultados clínicos e a maior propensão de presença destes 2 periodontopatógenos, demonstraram que os anéis elásticos não são recomendados em pacientes com higiene bucal deficiente.

Palavras-chave: aparelho ortodôntico, placa dentária, gengivite, reação de polimerase em cadeia, materiais dentários, higiene bucal.

ABSTRACT

Periodontium and oral microbiota subject to alterations as orthodontic patients find difficulties in controlling oral biofilm. Few studies have investigated orthodontic devices, such as elastomeric rings and steel ligatures. Therefore, the aim of this study was to evaluate the periodontal and microbiological alterations in patients fixed orthodontic appliances. Literature review (chapter 1) showed significant results concerning accumulation of biofilm and gingival inflammation in patients under fixed orthodontic treatment. The present study revealed a strong correlation between *A. actinomycetemcomitans* and subgingival biofilm of orthodontic bands. The second chapter (*Periodontal and microbiologic evaluation of two methods of archwire ligation: ligatures wires and elastomeric rings*) shows a comparison between these two techniques, considering periodontal and microbiological aspects. This study evaluated 14 patients having no clinical signs of gingival inflammation. Biofilm samples of teeth 15, 25, 32 and 42 were collected before fixed appliance placement and again six months after treatment. Each orthodontic arc was fixed with elastomeric rings on one of the sides of the arches, while steel ligatures had been used on the opposite side. Plaque index, gingival bleeding and probing depth were used as periodontal parameter. A technique of Molecular Biology called polymerase in chain reaction (PCR) was used to detect *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, and *P. nigrescens*. Analysis of variance ($p < 5\%$) revealed statistically significant differences for the elastomeric rings, which showed high scores for bleeding and plaque index, while McNemar test showed that *T. forsythia* and *P. nigrescens* demonstrated a larger number of positive sites for the elastomeric rings group, when compared to steel ligatures group ($p < 5\%$). In conclusion, elastomeric rings favored the presence of these 2 pathogens, and due the periodontal findings, should not be recommended in patients with deficient oral hygiene.

Key-words: orthodontic appliance, dental plaque, dental gingivitis, polymerase in chain reaction, dental materials, oral hygiene.

I - INTRODUÇÃO

O processo de estabelecimento da gengivite em humanos foi comprovado cientificamente em estudos realizados na década de 60 os quais demonstraram a inter-relação da ausência de higiene bucal, acúmulo de biofilme dentário e de inflamação gengival (Løe et al., 1965). Avaliações microbiológicas longitudinais demonstraram a sucessão de grupos específicos de microorganismos com o acúmulo e maturação de biofilme no decorrer do tempo (Theilade et al., 1966). O desenvolvimento inicial do biofilme caracteriza-se pela maturação de espécies do tipo cocos e bastonetes Gram positivos, progredindo para uma microbiota mais complexa formada por microorganismos Gram negativos e espiroquetas (Syed & Loesche, 1978; Van Palenstein Helder, 1981). Desta forma, se aceita amplamente que para existência de doença periodontal, a condição de acúmulo de biofilme deve estar presente, entretanto, considerando a hipótese da placa específica, apenas um limitado número de microorganismos subgengivais atuam diretamente prejudicando o periodonto (Socransky & Haffajee, 1992).

A presença de fatores locais na cavidade bucal possui participação fundamental permitindo acúmulo de biofilme e contribuindo para o desenvolvimento da gengivite. Observações clínicas mostraram a associação freqüente desses fatores com a inflamação gengival, como nos casos de dentes apinhados (Behfelt et al., 1981; Silness & Roynstrand, 1985), de restaurações defeituosas (Lang et al., 1983), de próteses fixas e removíveis (Valderhaug, 1980) e de aparelhos e acessórios ortodônticos (Zachrisson & Zachrisson, 1972; Zachrisson, 1976; Forsberg et al., 1991).

Muitas vezes a mecânica ortodôntica utilizada necessita de uma grande quantidade de dobras no arco, bandas ortodônticas e acessórios ortodônticos que afetam diretamente a quantidade e a qualidade do biofilme na cavidade bucal, determinando a ocorrência de sinais clínicos de inflamação gengival, sempre associado a uma escovação deficiente. Pode-se inferir, ao aparelho ortodôntico como um fator potencial para agravar a qualidade da higiene bucal, e dessa forma, contribuir para aumentar o risco de doença periodontal (Zachrisson & Alnaes, 1973; Kloehn & Pfeifer, 1974; Trossello & Gianelly, 1979; Zachrisson, 1976). Neste aspecto, alguns estudos relataram uma elevada perda de inserção periodontal em indivíduos sob tratamento ortodôntico em comparação com grupos

controles (Zachrisson, 1976; Alstad & Zachrisson, 1979), mas a maioria dos estudos longitudinais que se concentraram em efeitos clínicos durante o tratamento concluíram que as alterações gengivais induzidas pelo acúmulo de biofilme decorrente do aparelho ortodôntico foram transitórias e que não causaram danos permanentes às estruturas periodontais (Zachrisson & Zachrisson, 1972; Kloehn & Pfeifer, 1974; Trossello & Gianelly, 1979).

Entre as diversas abordagens clínicas sobre os possíveis efeitos do aparelho ortodôntico na cavidade bucal, os resultados mostraram principalmente, a ocorrência de aumento de acúmulo do biofilme e inflamação gengival (Boyd & Baumrind, 1992; Batoni et al., 2001; Jordan & LeBlanc, 2002). Os estudos sobre as alterações microbiológicas em pacientes sob tratamento ortodôntico consideraram, de uma forma geral, a elevação quantitativa de microorganismos cariogênicos como o *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, presente na saliva, como também no biofilme supragengival (Corbett et al., 1981; Diamanti-Kipioti et al., 1987; Lundström & Krasse, 1987; Svanberg et al., 1987; Forsberg et al., 1991). Os efeitos do aparelho fixo no peridonto, concentraram-se em investigações clínicas como por exemplo, os prejuízos causados pela perda de inserção, ou pela ação das bandas ortodônticas, as quais se caracterizaram como sítios ideais para colonização de bactérias como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Paolantonio et al., 1999; Sallum et al., 2004), espécie com elevada associação em lesões de periodontite juvenil localizada (Chung et al., 1989), e casos de doença periodontal destrutiva em adultos (van Winkelhoff et al., 1992).

Em relação aos acessórios utilizados na fixação do arco ortodôntico aos braquetes, como as ligaduras elásticas e as ligaduras metálicas, poucos estudos foram realizados sobre este tema, portanto, nada de conclusivo pode-se realmente afirmar sobre os efeitos destes acessórios, principalmente em relação às possíveis alterações periodontais provocadas pelos microorganismos periodontopatogênicos relacionados a estes acessórios. Desta forma, este estudo foi direcionado em 2 abordagens metodológicas que se complementam, como parâmetros clínicos periodontais convencionais, além de avaliação microbiológica amparada em procedimentos de Biologia Molecular, extremamente sensíveis e específicos (Gumerlock et al., 1991). A técnica utilizada caracterizou-se como um valioso instrumento na detecção e identificação de bactérias e vírus associados às doenças periodontais

(Ashimoto et al.,1996), principal foco do trabalho. A reação de polimerase em cadeia – PCR, baseia-se em reações enzimáticas cíclicas de desnaturação pelo calor, hibridização dos oligonucleotídeos e síntese enzimática de DNA, resultando na amplificação exponencial da sequência de DNA desejado, permitindo a identificação de sequências de genes específicos, tais como genes de espécies bacterianas (Mullis & Faloona, 1987).

Considerando a falta de dados na literatura sobre possíveis alterações periodontais e microbiológicas dos métodos de amarração ortodôntica, torna-se de interesse o estudo da influência destes acessórios nas características normais do periodonto e da microbiota presente na cavidade bucal.

II - PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho foram:

OBJETIVO GERAL

- Evidenciar possíveis alterações periodontais e microbiológicas em pacientes com aparelho ortodôntico fixo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar alterações clínicas após instalação de aparelho ortodôntico fixo utilizando parâmetros periodontais, entre dois tipos de acessórios ortodônticos para fixar o arco ortodôntico aos braquetes: ligaduras elásticas e ligaduras metálicas;

- Verificar a presença de bactérias periodontopatogênicas após instalação de aparelho fixo, assim como nos dentes amarrados com ligaduras elásticas e ligaduras metálicas;

III - CAPÍTULOS

Esta tese está baseada na Resolução CCPG/001/98/UNICAMP que regulamenta o formato alternativo para teses de Mestrado e Doutorado, e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato (Anexo 1 e 2). Por se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, tendo sido aprovado (Anexo 3). Assim sendo, esta tese é composta por dois capítulos contendo artigos submetidos para publicação, conforme descrito abaixo:

Capítulo 1

“Alterações periodontais e microbiológicas após instalação de aparelho ortodôntico fixo” Souza RA, Magnani MBBA, Nouer DF, Silva CO, Klein MI, Gonçalves MR, Sallum EA, Gonçalves RB. Este artigo foi submetido à publicação no periódico *Periodontia, da Sociedade Brasileira de Periodontologia*.

Capítulo 2

“Periodontal and microbiologic evaluation of two methods of archwire ligation: ligatures wires and elastomeric rings” Souza RA, Magnani MBBA, Nouer DF, Silva CO, Klein MI, Sallum EA, Gonçalves RB. Este artigo foi aceito para publicação no periódico *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. Os direitos autorais para publicação deste artigo pertencem à editora do periódico citado, e sua apresentação nesta dissertação não infringe seus direitos legais (declaração pág. 88), conforme normas apresentadas nos endereços eletrônicos: <http://journals.elsevierhealth.com/periodicals/ymod> e <http://authors.elsevier.com/home.html>.

CAPÍTULO 1

Alterações periodontais e microbiológicas após instalação de aparelho ortodôntico fixo

Periodontal and microbiologic changes after the placement of fixed orthodontic appliance

Ricardo Alves de Souza¹

Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani²

Darcy Flávio Nouer³

Cléverson de Oliveira e Silva⁴

Marlise Inêz Klein⁵

Marcos Roberto Gonçalves⁶

Enilson Antonio Sallum⁷

Reginaldo Bruno Gonçalves⁸

¹Mestrando em Ortodontia da FOP-UNICAMP, Especialista em Ortodontia pela FOP-UNICAMP.

² Professora Assistente de Ortodontia do Departamento de Odontologia Infantil da FOP-UNICAMP.

³Pofessor Titular de Ortodontia do Departamento de Odontologia Infantil da FOP-UNICAMP, coordenador da Área de Ortodontia da FOP-UNICAMP.

⁴Doutorando em Periodontia da FOP-UNICAMP, Mestre em Periodontia pela FOP-UNICAMP.

⁵Doutoranda em Microbiologia Oral da FOP-UNICAMP, Mestre em Microbiologia Oral pela FOP-UNICAMP.

RESUMO

Áreas de retenção do aparelho ortodôntico fixo permitem um maior acúmulo de biofilme dental, principal agente etiológico das doenças periodontais. Este estudo, através de revisão da literatura, pretende avaliar possíveis alterações periodontais e microbiológicas de pacientes com aparelho ortodôntico fixo. Os parâmetros clínicos, como índice de placa, índice de sangramento gengival e profundidade de sondagem foram analisados em diversos estudos, e a maior parte deles mostra resultados significativos de acúmulo de biofilme e inflamação gengival associado ao aparelho ortodôntico fixo. Há um grande aumento de microrganismos cariogênicos em pacientes ortodônticos, como *S. mutans* e *Lactobacillus*, principalmente nos casos de deficiência na higiene oral. Quanto ao biofilme subgengival, pode-se afirmar que *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia*, envolvidos com a doença periodontal, são os principais componentes do biofilme subgengival de bandas ortodônticas. Esta revisão mostrou que há uma necessidade de mais estudos sobre a relação entre patógenos periodontais e aparelhos ortodônticos e ressaltou a importância da interação entre Periodontia e Ortodontia durante os tratamentos ortodônticos, principalmente nos pacientes com maiores riscos.

UNITERMOS: biofilme dentário; aparelho ortodôntico fixo; doença periodontal

ABSTRACT

Retention areas in fixed orthodontic appliance lead to an increase in the accumulation of biofilm, main etiologic agent of periodontal diseases. This study, through a literature review, intends to evaluate possible periodontal and microbiological alterations in patients with fixed orthodontic appliance. The clinical parameters, as plaque index, gingival index, and probing depth were analyzed in many studies, and most of them shows significant outcomes of biofilm accumulation and gingival inflammation associated to the fixed orthodontic appliance. There is an increase in the cariogenic microorganisms in orthodontic patients, as *S. mutans* and *Lactobacillus*, mainly in cases of oral hygiene deficiency. As regards the subgingival biofilm, it can be assured that *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia*, related to periodontal disease, are the main components of subgingival biofilm of orthodontic band. This review showed that there is a need of more studies about the relationship between periodontal pathogens and orthodontic appliance and highlighted the importance of an interaction between Periodontics and Orthodontics during the orthodontic treatment, mainly in the patients with higher risks.

UNITERMS: dental biofilm; fixed orthodontic appliance; periodontal disease

INTRODUÇÃO

A doença periodontal constitui-se como uma das principais enfermidades da cavidade oral causada pela atividade patológica do biofilme dentário.

A combinação entre aparelho ortodôntico e gengivite na clínica ortodôntica diária retrata uma realidade bastante comum para o ortodontista. O motivo dessa associação deve-se, principalmente, à dificuldade de escovação e de utilização do fio dental próximo às superfícies retentivas de todo o aparelho ortodôntico fixo.

ZACHRISSON & ZACHRISSON, em 1972, verificaram que a maioria das 49 crianças de um estudo longitudinal desenvolveu gengivite hiperplásica moderada após 1 a 2 meses da instalação de aparelho fixo, apesar de boas condições de higiene bucal, e que somente ocorreu hiperplasia gengival severa naquelas com escovação dentária deficiente.

Investigações histológicas em humanos (DIEDRICH et al, 2001) mostraram que diversos co-fatores como inserção de bandas subgengivais, resíduos de cimentos ou projeção de margens gengivais nas bandas poderiam causar inflamação gengival e também contribuir para a destruição periodontal.

Poucos trabalhos procuraram fazer uma relação entre as alterações da microbiota periodontopatogênica e o uso de aparelhos ortodônticos. SALLUM et al, 2004, verificaram uma associação significativa entre inflamação gengival e o uso de aparelhos ortodônticos, caracterizada pelo elevado número de sítios positivos das bactérias *Actinobacillus actinomycescomitans* (Aa) e *Tannerella forsythia* (Tf). A escassez de informações em relação à presença de periodontopatógenos em pacientes ortodônticos, principalmente no biofilme subgengival (PAOLANTONIO et al, 1999), além da elevada procura de tratamento ortodôntico por parte de pacientes adultos nestas últimas décadas (MCKIERNAN et al, 1992; SANDERS, 1999), justificam maiores investigações sobre o assunto.

Baseados nestes achados da literatura, este trabalho se propõe, através de uma revisão, evidenciar possíveis alterações periodontais e microbiológicas em pacientes com aparelho ortodôntico fixo, analisando seu potencial para aumentar o risco à doença periodontal.

REVISÃO DE LITERATURA E DISCUSSÃO

Pouca atenção tem sido dada à relação entre o tratamento ortodôntico e a doença periodontal (KLOEHN & PFEIFER, 1974; SALLUM et al, 2004). JAMES & BEAGRIE, em 1963, chamaram atenção ao fato de se dar grande importância às técnicas ortodônticas e pouca importância ao cuidado periodontal, mostrado em dois casos em que o resultado final do ponto de vista ortodôntico era satisfatório, mas os exames dos tecidos moles mostravam gengivites crônicas e periodontites associadas à má higiene oral.

Os aparelhos ortodônticos fixos favorecem a retenção de resíduos alimentares e dificultam a escovação dos dentes, pela instalação de superfícies adicionais na cavidade bucal (BAER & COCCARO, 1964; BLOOM & BROWN, 1964; SAKAMAKI & BAHN, 1967). Assim, há um acúmulo elevado de biofilme promovendo maiores riscos para desenvolvimento de gengivite e doença periodontal (ALSTAD & ZACHRISSON, 1979; SINCLAIR et al, 1987; BOYD & BAUMRIND, 1992; PAOLANTONIO et al, 1999; DIEDRICH et al, 2001).

CONSIDERAÇÕES PERIODONTAIS

AINAMO & BAY (1975) mostraram que a gengivite se inicia com a reação inflamatória da gengiva livre, causada por colônias de bactérias orais na superfície dos dentes e na margem gengival. A gengivite crônica irá se desenvolver provocando um aumento do exsudato gengival resultando na formação de cálculos subgengivais e podendo induzir uma progressiva doença periodontal.

ZACHRISSON & ZACHRISSON, 1972, KLOEHN & PFEIFER, 1974, ZACHRISSON, 1976 e BOYD, 1983, observaram que a instalação do aparelho ortodôntico era um fator importante para iniciar ou aumentar a inflamação gengival. Situações de apinhamento dentário, presente em muitas maloclusões, e que propiciam acúmulo de biofilme, também se configuram com fatores de elevado risco para o acúmulo de biofilme, e evidentemente devem ser corrigidas (ADDY et al, 1988; ALEXANDER & TIPNIS, 1970). Além disso, os benefícios obtidos pelo tratamento ortodôntico, corrigindo as

maloclusões e outros problemas, facilita a escovação dentária, além de estabelecer uma oclusão satisfatória e melhor estética ao paciente (COOPER, 1979; THILANDER, 1983).

Baseando-se no índice gengival (LOE & SILNESS, 1963) e no índice de placa (SILNESS & LOE, 1964), LUNDSTROM et al, em 1980, constataram em quatro grupos de pacientes que o índice de placa permaneceu entre 0,5 e 0,7, o índice gengival excedeu 0,8 durante o tratamento, mas finalizou em 0,5 após remoção das bandas ortodônticas. PENDER, em 1986, encontrou valores mais baixos para o índice de placa, que inicialmente era de aproximadamente 0,4 e variou entre 0,48 e 0,23 durante o primeiro ano de tratamento. O índice gengival oscilou entre 0,21 e 0,29 inicialmente, e variou entre 0,29 e 0,46 durante o primeiro ano. Os valores encontrados por PAOLANTONIO et al, em 1999, mostram que tanto o índice de placa quanto o índice gengival apresentaram valores significativos tanto nos sítios controles como nos sítios teste. Entretanto, no estudo longitudinal realizado por ALSTAD & ZACHRISSON em 1979, não houve diferenças significativas nos valores de índice de placa e gengival ao comparar um grupo de 39 crianças não tratadas com outro grupo de 38 crianças em tratamento ortodôntico, e todos os dentes apresentando bandas ortodônticas, contudo seguindo um cuidadoso programa de higiene oral. Foi perceptível também que após a remoção de aparelho ortodôntico, os resultados encontrados para os índices de placa e gengival foram melhores no grupo teste do que no controle.

Os estudos de BOYD & BAUMRIND em 1992 confirmaram, tanto em adolescente quanto em adultos, uma concentração significativamente maior de quantidade de biofilme dentário, com presença de inflamação gengival, na região de molares com bandas ortodônticas, quando comparados a molares com acessórios colados. Os dados encontrados nesta pesquisa condizem com os estudos presentes na literatura (ZACHRISSON & ALNAES, 1973; KLOEHN & PFEIFER, 1974; BAXTER, 1976; TROSELLO & GIANELLY, 1979; BOYD, 1983; ALEXANDER, 1991). Os adolescentes apresentaram maior acúmulo de biofilme e inflamação gengival, quando comparados aos adultos, tanto na utilização de bandas ou acessórios colados, antes, durante e depois do tratamento ortodôntico (BOYD & BAUMRIND, 1992; MCKIERNAN et al, 1992).

Um estudo de ZACHRISSON & ALNAES, 1973, avaliou a perda de inserção entre adolescentes tratados com aparelho fixo e os não-tratados. Os resultados mostraram uma

diferença significativa, com valores de 0,41 mm e 0,11 mm respectivamente para os grupos teste e controle. Os autores ressaltaram, entretanto, que variações adicionais podem afetar estes resultados como a condição gengival de cada indivíduo, diferenças entre o tratamento realizado e efeitos traumáticos de uma escovação rigorosa. Em contrapartida, o estudo de HUSER et al, em 1990, avaliando 10 pacientes antes e depois da instalação de bandas ortodônticas constataram que os valores permaneceram próximos do normal para a profundidade de sondagem em ambos os grupos teste e controle. Entretanto, em relação ao índice de placa e de sangramento, os resultados foram bem maiores nos dentes bandados ortodonticamente do que nos sítios controles. No estudo longitudinal de DIAMANTI-KIPIOTI et al, em 1987, não foram observadas variações significativas nos índices de placa e gengival após início do tratamento ortodôntico. Esta discrepância em relação ao trabalho de HUSER et al, 1990, pode estar relacionada a diferenças de idades das amostras ou fatores de resistência do hospedeiro na população de pacientes. O período necessário para desenvolvimento de inflamação gengival, em condições de ausência de higiene oral, varia de uma pessoa para outra, e depende do ritmo de formação do biofilme (LÖE et al, 1965; THEILADE et al, 1966).

A terapia ortodôntica fixa causa injúrias severas no periodonto e nas unidades dentárias, tais como hiperplasias, perda de inserção e perda de óssea alveolar nos pacientes com higiene oral deficiente. Entretanto, em pacientes colaboradores em relação à higiene oral, os danos causados pelos braquetes ou bandas são totalmente reversíveis (ZACHRISSON, 1976).

CONSIDERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Diversos estudos mostraram alterações microbiológicas entre os pacientes ortodônticos, mesmo sob prévio treinamento e orientação de higiene oral, enfatizando principalmente os problemas provenientes de cáries, manchas brancas e desmineralização do esmalte dentário. A colonização bacteriana nas áreas de retenção criadas pela instalação do aparelho ortodôntico possibilita a rápida multiplicação de espécies como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* relacionadas diretamente com problemas dos tecidos duros

(CORBETT et al, 1981; DIAMANTI-KIPIOTI et al, 1987; LUNDSTRÖM & KRASSE, 1987; SVANBERG et al, 1987; FORSBERG et al, 1991; TÝRKKAHRAMAN et al, 2005).

Ao considerar os efeitos que a instalação de aparelho ortodôntico poderia causar na composição do biofilme relacionando à doença periodontal, PAOLANTONIO et al, em 1999, verificaram o crescimento subgengival de Aa, tanto em regiões de braquetes quanto de bandas ortodônticas. Essa bactéria está associada à periodontite crônica e agressiva (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005), dependendo também da interação com a resposta do hospedeiro (ZADEH et al, 1999). Em pesquisa realizada com pacientes com aparelhos ortodônticos fixos e que apresentavam gengivite, SALLUM et al, 2004, mostraram que 60% das amostras dos sítios foram positivas para Aa, tanto supra quanto subgengivalmente, principalmente nos sítios em que bandas ortodônticas foram instaladas. Estes autores observaram resultados significativos, também para Tf, envolvida com a periodontite crônica refratária (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

Além disso, HAGG et al, 2004, mostrou que a colocação de aparelho ortodôntico promove um aumento na quantidade de Cândida e espécies de coliformes. Os autores também concluíram que a orientação de higiene oral no paciente ortodôntico não necessariamente diminui o acúmulo de biofilme e seus possíveis efeitos adversos.

HUSER et al, 1990, mostraram em exames de composição do biofilme dentário um aumento na quantidade de espiroquetas e bastonetes móveis, concomitantemente ao decréscimo da concentração de cocos em dentes que receberam bandas ortodônticas. Estes resultados foram observados em modelos de gengivite experimental. Entretanto no estudo de BALENSEIFEN & MADONIA, em 1970, foram detectados espécies de *Streptococcus* após a bandagem ortodôntica, o que sugere, possivelmente, alterações físicas e químicas do meio ambiente, como alteração do pH, pela presença de carboidratos, que favoreceram o desenvolvimento de bactérias associadas à cárie dentária.

FORSBERG et al, em 1991, avaliando dois métodos de ligação do arco ortodôntico aos braquetes, ligadura metálica e elástica, em 12 pacientes ortodônticos, observaram elevado número de microorganismos nos incisivos laterais superiores fixados com elástico quando comparados àqueles com ligadura metálica no lado oposto. A diferença também foi significativa nas amostras de saliva antes da instalação de aparelho ortodôntico fixo e durante o tratamento, a qual evidenciou grande quantidade de *S. mutans* e lactobacilos

anaeróbios e aeróbios. Em contrapartida, os achados de TÝRKKAHRAMAN et al, em 2005, também comparando as duas técnicas de ligação do arco aos braquetes, não observaram diferenças significativas na quantidade de microrganismos nos 21 pacientes ortodônticos. Nestes dois trabalhos, as diferenças de resultados podem ser explicadas, possivelmente, pelas diferenças no tamanho da amostra, na amostra do sítio dentário, nos métodos estatísticos, ou ainda pelo tipo de metodologia empregada.

FOLIO et al, em 1985, avaliaram 4 pacientes com periodontite juvenil que receberam prévio tratamento periodontal, e necessitavam de tratamento ortodôntico. Após 6 meses, os autores relataram aumento do número de espiroquetas e bastonetes móveis no biofilme subgingival. Três desses pacientes apresentaram níveis altos de leucócitos polimorfonucleares ao redor dos dentes tratados ortodonticamente, indicando significativa inflamação. Medidas intensivas com antimicrobianos foram administradas, como tetraciclina sistêmica, auxiliando o controle da inflamação e a ação patógenos periodontais, permitindo a finalização da terapia ortodôntica. Este monitoramento bacteriológico permitiu a prevenção de mais destruição periodontal nos pacientes sob tratamento ortodôntico. DAHLÉN, em 2006, também destaca a importância do diagnóstico microbiológico que, segundo o autor, pode ser usado na prática geral, auxiliando o diagnóstico clínico, possibilitando uma melhor escolha do tratamento, permitindo a avaliação de riscos e a motivação dos pacientes na prevenção das doenças infecciosas da cavidade oral, principalmente da cárie e doença periodontal.

CONCLUSÃO

Esta revisão constatou a necessidade de mais estudos microbiológicos avaliando a relação entre uso de aparelhos ortodônticos e desenvolvimento de biofilme com marcante presença de patógenos periodontais. Evidentemente, cabe ressaltar a importância da interação entre a Periodontia e Ortodontia durante o tratamento ortodôntico, principalmente nos pacientes com maior propensão à inflamação gengival. Nestes casos em particular, é possível que em breve testes microbiológicos simples possam auxiliar a modular e personalizar programas profiláticos individualizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Addy M, Griffiths GS, Dummer PM, Kingdon A, Hicks R, Hunter ML, et al. The association between tooth irregularity and plaque accumulation, gingivitis, and caries in 11-12-year-old children. *Eur J Orthod* 1988;10:76-83.
2. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25:229-335.
3. Alexander AG, Tipnis AK. The effect of irregularity of teeth and the degree of overbite and overjet on gingival health. *Br Dent J* 1970;128:539-547.
4. Alexander SA. Effects of orthodontic attachments on the gingival health of permanent second molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;100:337-340.
5. Alstad S, Zachrisson BU. Longitudinal study of periodontal condition associated with orthodontic treatment in adolescents. *Am J Orthod* 1979;76:277-286.
6. Baer PN, Cocco J. Gingival enlargement coincident with orthodontic therapy. *J Periodontal* 1964;35:436-439.
7. Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. *J Dent Res* 1970;49:320-324.
8. Baxter DH. The effect of orthodontic treatment on alveolar bone adjacent to the cemento-enamel junction. *Angle Orthod* 1976;37:35-47.
9. Bloom RH, Brown Jr LR. A study of the effects of orthodontics appliances on the oral microbial flora. *Oral Surg & Oral Pathol* 1964;17:658-667.
10. Boyd RL. Longitudinal evaluation of a system for self-monitoring plaque control effectiveness in orthodontic patients. *J Clin Periodontol* 1983;10:380-388.

11. Boyd RL, Baumrind S. Periodontal considerations in the use of bonds or bands on molars in adolescents and adults. *Angle Orthod* 1992;62-2:117-125.
12. Cooper MB. Minor tooth movement in the management of the periodontal patient. In: *The diagnosis and treatment of periodontal disease*. Prichard JF. ed. Philadelphia: Saunders; 1979. p 462-504.
13. Corbett JA, Brown LR, Keene HJ, Horton IM. Comparison of *Streptococcus mutans* concentrations in non-banded and banded orthodontic patients. *J Dent Res*. 1981;60:1936–1942.
14. Dahlén G. Microbiological diagnostics in oral diseases. *Acta Odont Scand* 2006;64:164-168.
15. Diamanti-Kipioti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. *J Clin Periodontol*. 1987;14:326–333.
16. Diedrich P, Rudzki-Janson I, Wehrbein H, Ulrike, F. Effects of orthodontic bands on marginal periodontal tissues. A histologic study on two human specimens. *J Orofac Orthop* 2001;62:146–156.
17. Folio J, Rams TE, Keyes PH. Orthodontic therapy in patients with juvenile periodontitis: clinical and microbiologic effects. *Am J Orthod* 1985;87:421-431.
18. Forsberg CM, Brattström V, Malmberg E, Nord CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and lactobacilli. *Eur J Orthod* 1991;13:416-420.
19. Hagg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and *Enterobacteriaceae*. *Eur J Orthod* 2004; 26: 623-629.

20. Huser MC, Baehni PC, Lang R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1990;97:213-218.
21. James GA, Beagrie GS. The care of the periodontal tissues during orthodontic treatment. *Dent Pract* 1963;13:268-271.
22. Kloehn JS, Pfeifer JS. The effect of orthodontic treatment on the periodontium. *Angle Orthod* 1974;44:127-134.
23. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963;21:533-551.
24. Loe HE, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-187.
25. Lundstrom F, Hamp SE, Nyman S. Systematic plaque control in children undergoing long term orthodontic treatment. *Eur J Orthod* 1980;2:27-39.
26. Lundström F, Krasse B. Caries incidence in orthodontic patients with high levels of *Streptococcus mutans*. *Eur J Orthod*. 1987;9:117–121.
27. Mckiernan EXF, Mckiernan F, Jones ML. Psychological profiles and motives of adults seeking orthodontic treatment. *Int. J. Adult Orthod Orthognath Surg* 1992;7:187-198.
28. Paolantonio M, Festa F, Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;115-4:423-428.
29. Pender N. Aspects of oral health in orthodontic patients. *British J Orthod* 1986;13:95-103.
30. Sakamaki ST, Bahn AN. Effect of orthodontic banding on localized oral lactobacilli. *J Dent Res* 1967;47:275-279.

31. 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;126:363–366.
32. Sanders NL. Evidence-based care in orthodontics and periodontics: a review of the literature. *JADA* 1999;130:521-527.
33. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II: correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121-135.
34. Sinclair PM, Berry CW, Bennett CL. Changes in gingiva and gingival flora with bonding and banding. *Angle Orthod* 1987;57:271–278.
35. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005; 38: 135-187.
36. Svanberg M, Jacobson C, Hager B. Streptococcus mutans, lactobacilli and Streptococcus sanguis in plaque from abutment teeth of cemented and of loose retainers. *Caries Res.* 1987;21:474–480.
37. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man: a longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res* 1966;1:1-13.
38. Thilander B. Orthodontic tooth movement in periodontal therapy. In: *Textbook of Clinical Periodontology*. Lindhe J. ed. Copenhagen: Munksgaard; 1983. p 480.
39. Trosello V, Gianelly A. Orthodontic treatment and periodontal status. *J Periodontol* 1979;50:665-671.

40. Törkkahraman H, Sayin Ö, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Önal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthodontist*. 2005;75:227-232.
41. Zachrisson BU. Cause and prevention of injuries to teeth and supporting structures during orthodontic treatment. *Am J Orthod* 1976;69:285-300.
42. Zachrisson BU, Alnaes L. Periodontal condition in orthodontically treated and untreated individuals. I. Loss of attachment, gingival pocket depth and clinical crown height. *Angle Orthod* 1973;43:402-411.
43. Zachrisson S, Zachrisson BU. Gingival condition associated with orthodontic treatment. *Angle Orthod* 1972;42:26-34.
44. Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontol* 2000 1999;20:239-288.

CAPÍTULO 2

Periodontal and microbiologic evaluation of two methods of archwire ligation: ligature wires and elastomeric rings

Ricardo Alves de Souza, MS, DDS,^a

Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani, PhD, MS, DDS,^b

Darcy Flávio Nouer, PhD, MS, DDS,^c

Cleverson de Oliveira e Silva, MS, DDS,^d

Marlise Inêz Klein, MS, DDS,^e

Enilson Antonio Sallum, PhD, MS, DDS^f

Reginaldo Bruno Gonçalves, PhD, MS, DDS,^g

^aMaster Degree, orthodontic specialist, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Orthodontics professor of Southwest Bahia University, Bahia, Brazil.

^bAssociate professor, Department of Orthodontics, Piracicaba Dental School, University of Campinas.

^cChairman and professor, Department of Orthodontics, Piracicaba Dental School, University of Campinas.

^dPhD student, Division of Periodontics, Department of Periodontics and Prosthodontics, Piracicaba Dental School, University of Campinas.

^e PhD student, Division of Microbiology and Immunology, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas.

^gFull professor, Division of Periodontics, Department of Periodontics and Prosthodontics, Piracicaba Dental School, University of Campinas.

^fAssociate professor, Division of Microbiology and Immunology, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas.

Reprint requests to: Ricardo Alves de Souza

Piracicaba Dental School - University of Campinas, Department of Orthodontics

Av. Limeira, 901, Areão CEP: 3414-903 Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Phone number: (19) 3412-5200, fax number: (19) 3421-0144

ricardoalves@fop.unicamp.br

ABSTRACT

Introduction: Prophylactic programs to prevent dental biofilm accumulation must be implemented to minimize the risk of periodontal diseases developing in orthodontic patients. Therefore, this study assessed the possible periodontal and microbiologic changes resulting from the use of two methods of orthodontic archwire ligation: elastomeric rings and steel ligatures. **Methods:** The following parameters were measured: Plaque index, gingival bleeding index, probing depth and biofilm samples from teeth 15, 25, 32 and 42 were evaluated in 14 subjects, without clinical signs of gingival inflammation, before orthodontic appliance placement and after six month of treatment. Each orthodontic arch was fixed with elastomeric rings on one of the sides of the midline, while steel ligatures were used on the opposite side. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was used to detect *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, and *P. nigrescens*. **Results:** The elastomeric rings were associated with a higher score for plaque index and bleeding than steel ligatures, as well as, a large number of positive sites of *T. forsythia* and *P. nigrescens* ($P < 0.05$). **Conclusions:** The elastomeric rings favored the presence of these 2 periodontopathogens and it harmed the gingival conditions.

Key Words: elastomeric rings, orthodontic appliance, periodontal disease, dental biofilm, microbiology.

INTRODUCTION

The increased accumulation of biofilm indicates a high risk for adverse effects on the periodontium.¹⁻³ Many researchers have reported that the most important etiologic factor in periodontal disease is the presence of biofilm at the gingival margin.^{2,4-6} The combination of orthodontic therapy and poor oral hygiene can cause serious damage to the periodontium.⁷⁻⁹ The components of fixed orthodontic appliances create new retention areas, which are suitable for bacterial colonization and lead to an increase in the number of microorganisms.^{10,11} Several studies have used clinical parameters as a reference, such as, the plaque index, gingival index, probing depth and bone loss, involving periodontal tissues around orthodontic appliances.^{2,12-17} However, there is very little information available on the clinical and microbiologic comparisons with the different methods of ligation used to fix the orthodontic arch.^{10,11,18} It has been shown that a greater number of microorganisms were exhibited in patients with elastomeric rings than in those with steel wires, therefore, the orthodontic ligation techniques were considered an additional factor for biofilm accumulation.¹⁰

Fixed orthodontic appliances significantly increase the colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*, as shown in several studies.^{10,11,19-21} Periodontal pathogens such as *Actinobacillus actinomycetemcomitans*^{7,22,23} and *Tannerella forsythia*,²² have also been significantly associated with gingival inflammation during orthodontic therapy.^{9,22,23}

Among the various species that have preferentially been found in subjects with periodontal disease are *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola*.²⁴⁻²⁷ The chemical and physical characteristics of these bacteria have made them the most important members of periodontopathogenic microbiota.²⁸ But not all patients affected with periodontal disease harbor all of the supposedly periodontal pathogen species.²⁹⁻³⁴

P. gingivalis and *P. intermedia* species were found in pre-pubertal periodontitis.³⁵ Similarly, species associated with disease have frequently been found in apparently healthy patients.^{31,32} Many interactions between species can be typical in a pathological process.³⁶

Some authors also believed that the host's irreversible tissue destruction only occurs when bacterial levels reach a critical threshold.³⁷

The aims of the present investigation were to evaluate the periodontal status and microbiological changes in orthodontically treated patients, and verify the alterations associated with the development of biofilm in two different methods of ligation: elastomeric rings and steel ligatures.

MATERIAL AND METHODS

Patients and Clinical Procedure

Fourteen subjects (aged 17 ± 2.6 years [mean $\pm$ SD]; 6 men, 8 women) participated in the study. All patients were in good health; none had taken antibiotics 3 months before the baseline examination and during treatment; no clinical signs of gingival inflammation were present at baseline; each subject required fixed orthodontic treatment and had misaligned teeth in the anterior sextants of both dental arches. The exclusion criteria were as follows: smokers; pregnant or lactating women; users of systemic medication for chronic diseases; those who had undergone periodontal treatment within 3 months before the baseline examination; and any systemic disorders that could influence periodontal and microbiological conditions or response to treatment. The subjects were chosen randomly among patients at the Orthodontic Division of Piracicaba Dental School, and provided written informed consent. This study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the University of Campinas.

The subjects received exclusively professional guidance on oral hygiene (Bass technique) and prophylactic treatment ten days before the baseline exam. During 6 months, the patients at the Dentistry School were given no additional information about oral hygiene. At baseline, before orthodontic appliance placement, biofilm samples were collected from labial surfaces of the maxillary second premolars and mandibular lateral incisors (4 samples per patient). The clinical parameters recorded included plaque index,³⁸ gingival bleeding index,³⁹ and probing depth as measured by a Williams brand periodontal probe (Newmar, São Paulo, Brazil).

After clinical examinations, the patients received fixed orthodontic appliances that consisted of orthodontics brackets on incisors, canines, premolars and first molars, and orthodontics bands on second molars. Standard metal Edgewise brackets were used in all patients, in addition to a passive archwire fixed to the appliance immediately after bonding. Tweed-Merrifield directional force technology with FOP-UNICAMP modifications was the orthodontic technique used. In all patients conventional elastomeric rings were used for ligation on one side of the dental arch midline, while steel wires were used on the opposite side. Each dental arch side randomly received auxiliary archwire tying, with the object of minimizing possible individual preferences for toothbrushing side. The elastomeric rings and steel wires were changed every month. The archwire sequence for the 6 months treatment period was as follows: a 0.014'' stainless arch initially, after 2 months, a 0.016'' stainless arch was used to improve the alignment, therefore, when the patient used a 0.018'' stainless arch, the final biofilm collection was concluded.

Clinical parameters were recorded in six sites (mesiobuccal, buccal, distobuccal, mesiolingual, lingual, and distolingual) of all teeth, except the second and third molar, at 2 different times: baseline and 6 months after orthodontic bonding. Only one professional (COS), blind to the groups, did all the clinical parameter evaluations, at the same time as the biofilm samples were collected.

Sample Collection

Experimental areas were isolated with sterile cotton rolls to avoid contamination by saliva. The biofilm, 2 mm supragingival and 2 mm subgingival, was collected with a sterilized periodontal curette and placed in an Eppendorf tube containing 0.3 mL of T.E. buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). The total number of samples $n = 112$, came from the 14 selected patients, at 2 assessment times and 4 dental sites per patient (4 sites at baseline, $n = 56$; 2 final sites with elastomeric rings, $n = 28$, and 2 final sites with metal, $n = 28$). These samples were stored at -20°C until DNA extraction.

DNA extraction and PCR Identification:

The genomic DNA was extracted in accordance with Doyle & Doyle methodology.⁴⁰ The extracted DNA solution was stored at -20°C until PCR analysis.

The samples were boiled for 10 minutes and centrifuged, and the supernatant was subsequently used for polymerase in chain reaction (PCR) analysis. The primers and the PCR temperature profiles used have been previously described for each of the five bacteria: *Porphyromonas gingivalis* (Pg),⁴¹ *Tannerella forsythia* (Tf),⁴² *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa),⁴² *Prevotella intermedia* (Pi),⁴³ and *Prevotella nigrescens* (Pn).⁴³ PCR reactions were performed in a reaction mixture containing 1 µL of DNA, 200 µM of dNTPs, 2.5mM of MgCl₂, 0.3 µM of each upper and lower primer and 1.25 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil) in a final volume of 50 µL. Genomic DNA of strains *P. gingivalis* (ATCC 33277), *T. forsythia* (ATCC 43037), *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522), *P. intermedia* (ATCC 25611), and *P. nigrescens* (NCTC9336), were used as positive controls and distilled water was used as a negative control. PCR products were analyzed in 1.5% agarose gel, in buffer (8V/cm in Tris-borate-EDTA) and stained with ethidium bromide.

Statistical Analysis

After exploratory data analysis, analyses of variance – ANOVA – was used for the periodontal parameters, to evaluate the repeated measurements.

In microbiological data, the number of sites harboring the 5 evaluated bacteria was computed at baseline and at 6 months following orthodontic treatment of both groups. McNemar test was used to verify intragroup differences between baseline and after 6 months of orthodontic treatment. The same test was also used to verify differences between groups. The level of significance was 5%.

RESULTS

Statistically significant differences were observed between the two periods evaluated, and also between the two archwire ligation techniques for the plaque index (Table I). The scores showed a mean of 37.72% initially for the baseline, as compared with 63.72% after 6 months when elastomeric rings were used. With the steel ligatures, the values increased from 37.72% to 51.09% in the final period. When the two techniques were compared, the difference confirmed an increased plaque index score in the elastomeric

group. The results observed for the gingival bleeding index were even more significant between the groups and intragroups. The values for elastomeric rings (12.28 %) were higher than for steel (6.71 %). Before placing the fixed appliances (at baseline), the percentages were much lower, 4.28% and 3.86%, (Table II).

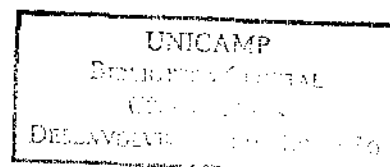
No significant difference was found in probing depth between the elastomeric group (2.21 mm) and the steel wires group (2.13 mm) at final evaluation (Table III). When the baseline was compared with the final evaluation, however, the groups showed statistical differences: the mean initial probing depths were 1.46 mm (without elastomeric) and 1.42 mm (without steel).

Microbiologically, the differences were not significant at the baseline period, as shown in Table IV. In this case, a larger number of dental sites were negative for all periodontopathogens evaluated before the treatment. When the analysis occurred after the treatment, considering the 2 groups (Table V), or at the 2 times for elastomeric rings (Table VI) and for the steel ligatures (Table VII), there were statistically significant differences for Tf and Pn, between the periods evaluated, as well as in the archwire ligation method used.

The percentage of positive sites found for Tf and Pn was 92.85% in each, in the elastomeric ring group. The reduction of scores observed for the steel ligature group was 57.14% for Tf and 71.42% for Pn (Figure A). No statistically significant differences were found for the other microorganisms evaluated (Aa, Pg and Pi).

DISCUSSION

Several studies have reported that the placement of orthodontic appliances increases dental biofilm accumulation,^{2,3,5-9,12,14,15-17,21-23} as already shown in the present research. Few authors^{10,11,18} have, however, evaluated periodontal and microbiological differences among the orthodontic archwire ligation methods. The period for evaluating the possible effects on the periodontium, between the 2 techniques used in this study was determinant, so that final biofilm collection was carried out after six months, a satisfactory period for starting to observe a chronic disease, such as periodontitis. In this period, there was no change in the patients' cooperation and motivation as regards oral hygiene, in an attempt to simulate very common clinical situations. In other studies the greatest periodontal



alterations were shown to occur 3 months after orthodontic bonding.^{9,23} Our methodology and other comparative studies^{10,11} between elastomeric rings and ligature wires used a cross-arch study for microbiological evaluation, as a condition to reduce individual variations and intragroup differences, however, there are inevitable deficiencies and difficulties related to the possibility of bacterial contamination across the arch which must, of course, inevitably occur.

A significant increase in bleeding scores of bonded⁴⁴ and banded⁹ teeth was reported due to the presence of a fixed orthodontic appliance. The present study findings that the teeth attached with elastomeric rings were more prone to bleeding agree with the study of Türkkahraman et al,¹¹ that evaluated the bleeding scores five weeks after bonding, and concluded that the use of elastomeric rings is not recommended in patients with poor oral hygiene. These authors also reported that teeth attached with elastomeric rings exhibited a slightly greater number of microorganisms (*S. mutans* and *Lactobacilli*) than teeth attached with steel ligature wires, but the differences were not statistically significant and could be ignored. They also observed no differences when comparing the plaque index between elastomeric and steel ligation. In this clinical parameter, the present study result showed an important association with the type of ligation, with a high score on the elastomeric ring side. The discrepancy in these points with regard to the present study may be related to the differences in microorganisms analyzed, type of microbiological test, period of evaluation, or host-resistance factors in the patient population. It is known, for example, that the time necessary for gingival inflammation to develop when oral hygiene is abolished, varies from one person to another and depends on the biofilm formation rates.^{4,45}

On the other hand, the periodontal parameters such as, probing depth, showed a significant difference after orthodontic appliance placement, but no discrepancy was seen between the two methods of archwire ligation. This clinical situation created a propitious environment for microorganism development, but on one of the sides of the dental arches, this situation was still more favorable, at least for the bacteria Tf and Pn, probably correlated because of the presence of elastomeric rings.

In a study conducted with scanning electron microscopy (SEM) to evaluate bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances, the authors observed that the ligation method did not appear to influence the bacterial morphotypes adhering to either

composite or enamel surfaces.¹⁸ This methodology was, however, carried out in only 3 weeks, and the orthodontic archwire was not ligated to the bracket, because the experimental design of the study included only one bonded tooth in each quadrant.

The present study demonstrated a significant difference in the number of Pn and Tf positive sites after orthodontic bonding, also on the side of the dental arch with elastomeric rings. Initially, the species *P. nigrescens*, was more commonly observed in children than in adults,⁴⁶ however, later this bacterium was listed as being a possible pathogen related to adult periodontitis.⁴⁷ Interestingly, an author reported that interdental supragingival biofilm could serve as a natural habitat of *P. nigrescens* and of other presumed periodontopathgens in healthy individuals.⁴⁸ *T. forsythia* was a specie observed in greater number in the sites of destructive periodontal disease than in healthy sites, or those with gengivitis.⁴⁹ Moreover, Tf was detected more frequently and in greater number in active periodontal lesions than in inactive lesions.⁵⁰ Some authors have also reported that this species was the one most detected in refractory conditions,⁵¹ with a rise in seric antibodies in patients with periodontitis.⁵² Other researchers considered Tf as being the most significant microbial risk factor that distinguishes individuals with periodontitis from those that present periodontal health.^{30,53}

The results of Forsberg et al¹⁰ showed that in the majority of patients, the teeth attached to the archwires with elastomeric rings exhibited a greater number of microorganism in the biofilm than the incisors ligated with steel wire. These results were similar to our research, and their study was also conducted over a longer period. Nevertheless, these authors evaluated *S. mutans* and *Lactobacilli*, cariogenic pathogens. Others authors⁵⁴ observed the development of biofilm and *S. mutans* in connection with steel ligatures and elastomeric rings in orthodontic patients treated with and without 0.4% stannous fluoride gel. The results showed that the numbers of *S. mutans* in the saliva and biofilm were not statistically different between the teeth fitted with elastomeric rings and stainless steel ligatures, or between the experimental and control groups. In this investigation, the biofilm samples were collected at 15 and 30 days after appliance placement, while our final biofilm evaluation was carried out after 6 months.

The present study also showed that there were no statically significant differences for the microorganism Aa and Pi, null for Pi at Table IV, and null in all situations for Pg.

Species such as *A. actinomycetemcomitans* were, however, associated with gingival inflammation in orthodontic patients.^{22,23} Therefore, from the evaluated clinical parameters and the significant result of positive sites for Tf and Pn, the elastomeric rings demonstrated a stronger correlation with these types of microorganisms, generally found in periodontal diseases, than the steel ligatures did.

CONCLUSIONS

The use of elastomeric rings promotes a significant retention of biofilm, with significant clinical alterations of the plaque index and gingival bleeding. They also allowed greater presence of periodontopathogens such as *Tannerella forsythia* and *Prevotella nigrescens*.

REFERENCES

1. Ash MM, Gitlin BN, Smith WA. Correlation between plaque and gingivitis. *J Periodontol* 1964; 35:424-29 .
2. Zachrisson S, Zachrisson BU. Gingival condition associated with orthodontic treatment. *Angle Orthod* 1972;42:26-34.
3. Kloehn JS, Pfeifer JS. The effect of orthodontic treatment on the periodontium. *Angle Orthod* 1974;44:127-34.
4. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-87.
5. Pender N. Aspects of oral health in orthodontic patients. *Br J Orthod*. 1986;13:95-103.
6. Boyd RL, Baumrind S. Periodontal considerations in the use of bands or bonds on molars in adolescents and adults. *Angle Orthod* 1992;62:117-26.
7. Lundström F, Hamp SE, Nyman S. Systematic plaque control in children undergoing long-term orthodontic treatment. *Eur J Orthod* 1980;2:27-39.
8. Huber SJ, Vernino AR, Nanda RS. Professional prophylaxis and its effect on the periodontium of full-banded orthodontic patients. *Am J Orthod Dentfac Orthop* 1987;91:321-7.
9. Huser MC, Baehni PC, Lang R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1990;97:213-218.

10. Forsberg CM, Brattstrom V, Malmberg E, Nord CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. Eur J Orthod 1991;13:416-420.
11. Türkkahraman H, Sayin Ö, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Önal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. Angle Orthodontist 2005;75:227-232.
12. Zachrisson BU. Cause and prevention of injuries to teeth and supporting structures during orthodontic treatment. Am J Orthod 1976;69:285-300.
13. Alstad S, Zachrisson BU. Longitudinal study of periodontal conditions associated with orthodontic treatment in adolescents. Am J Orthod 1979;76:277-86.
14. Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. J Dent Res 1970;49:320-324.
15. Sinclair PM, Berry CW, Bennett CL, Israelson H. Changes in gingiva and gingival flora with bonding and banding. Angle Orthod 1987;57:271-278.
16. Zachrisson BU, Alnaes L. Periodontal condition in orthodontically treated and untreated individuals. II. Alveolar bone loss: radiographic findings. Angle Orthod 1973;43:402-12.
17. Trossello VR, Gianelly AA. Orthodontic treatment and periodontal status. J Periodontol 1979;50:665-71.
18. Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. Eur J Orthod 2001;23:475-484.

19. Lundström F, Krasse B. *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* frequency in orthodontic patients – the effect of chlorhexidine treatments. Eur J Orthod 1987;9:109-116.
20. Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. The effect of orthodontic treatment on salivary flow, pH, buffer capacity, and levels of *mutans streptococci* and *lactobacilli*. Aust Orthod J 1999;15:229-234.
21. Svanberg M, Jacobson C, Hager B. *Streptococcus mutans*, *lactobacilli* and *Streptococcus sanguis* in plaque from abutment teeth of cemented and of loose retainers. Caries Res 1987;21:474-480.
22. 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;126:363-6.
23. Paolantonio M, Festa F, di Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. Site-specific subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1999;115:423-428.
24. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J Periodontol 1985;56:447-56.
25. Moore WE. Microbiology of periodontal disease. J Periodontal Res 1987;22:335-41.
26. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988;15:85-93.
27. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992;63:S322-31.

28. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 1999;20:136-67.
29. Alpagot T, Wolff LF, Smith QT, Tran SD. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. *J Clin Periodontol* 1996;23:982-8.
30. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65:260-7.
31. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 1998;36:3239-42.
32. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998;25:346-53.
33. Machtei EE, Dunford R, Hausmann E, Grossi SG, Powell J, Cummins D, Zambon JJ, Genco RJ. Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1997;24:102-9.
34. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998;25:85-98.
35. Watanabe K. Prepubertal periodontitis: a review of diagnostic criteria, pathogenesis, and differential diagnosis. *J Periodontal Res* 1990;25:31-48.
36. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-44.

37. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. J Clin Microbiol. 2000;38:2362-5.
38. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II: correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand 1964;22:121-35.
39. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dent J 1975;25:229-335.
40. Doyle JJT, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1990;12:13-18.
41. Benkirane RM, Guillot E, Mouton C. Immunomagnetic PCR and DNA probe for detection and identification of *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol 1995;33:2908-12.
42. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1995;2:304-7.
43. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol 1997;35:1876-82.
44. Glans R, Larsson E, Ogaard B. Longitudinal changes in gingival condition in crowded and non-crowded dentitions subjected to fixed orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2003;124:679-682.
45. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man: a longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodont Res 1966;1:1-13.

46. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Cato EP, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Bacteriology of experimental gingivitis in children. *Infect Immun* 1984;46:1-6.
47. Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol* 1991;18:729-39.
48. Gmur R, Marinello CP, Guggenheim B. Periodontitis associated bacteria in supragingival plaque of dental hygienists: stability of carrier state and clinical development. *Eur J Oral Sci* 1999;107:225-8.
49. Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M, Slots J. *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:152-7.
50. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988;15:316-23.
51. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993;64:155-61.
52. Taubman MA, Haffajee AD, Socransky SS, Smith DJ, Ebersole JL. Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. *J Periodontal Res* 1992;27:511-21.
53. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995;66:23-9.

54. Bretas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MA. Effect of 0.4% stannous fluoride gel on Streptococci mutans in relation to elastomeric rings and steel ligatures in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2005;127:428-33.

TABLES

Table I. Plaque index (mean and SD) as a function of treatment and time.

Time	Method of ligation	
	Elastomeric rings	Steel ligatures
Baseline	37.72% (19.35) A b	37.72% (18.21) A b
Final	63.72% (12.43) A a	51.09% (12.27) B a

Means followed by different letters (capital letters – row; lower case letters – column) are significant different ($p < 0.05$).

Table II. Gingival bleeding index (mean and SD) as a function of treatment and time.

Time	Method of ligation	
	Elastomeric rings	Steel ligatures
Baseline	4.28% (4.12) A b	3.86% (3.86) A b
Final	12.28% (6.66) A a	6.71% (3.71) B a

Means followed by different letters (capital letters – row; lower case letters – column) are significant different ($p < 0.05$).

Table III. Probing depth (mean and SD) as a function of treatment and time.

Time	Method of ligation	
	Elastomeric rings	Steel ligatures
Baseline	1.46 (0.29) A b	1.42 (0.29) A b
Final	2.21 (0.49) A a	2.13 (0.45) A a

Means followed by different letters (capital letters – row; lower case letters – column) are significant different ($p < 0.05$).

Table IV. Absolute and relative frequency between the 2 groups at baseline.

BACTERIA	without elastomeric rings	without steel ligatures	Absolute and relative frequency (%)	P
Aa	-	-	26 (92.86%)	0.3173 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	1 (3.57%)	
Tf	-	-	23 (82.14%)	0.1797 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	4 (14.24%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	27 (96.43%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	22 (78.57%)	1.000 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	4 (14.29%)	

* Statistically significant difference by McNemar Test ($p < 0.05$); ns: not significant.

(-) Dental site negative; (+) Dental site positive.

Table V. Absolute and relative frequency between the 2 groups after treatment.

BACTERIA	elastomeric rings	steel ligatures	Absolute and relative frequency (%)	P
Aa	-	-	26 (92.86%)	0.3173 ns
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	1 (3.57%)	
Tf	-	-	1 (3.57%)	0.0039*
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	11 (39.29%)	
	+	+	15 (53.57%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	25 (89.29%)	0.5637 ns
	-	+	2 (7.14%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	1 (3.57%)	0.0339*
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	7 (25.00%)	
	+	+	19 (67.86%)	

* Statistically significant difference by McNemar Test ($p < 0.05$); ns: not significant.

(-) Dental site negative; (+) Dental site positive.

Table VI. Absolute and relative frequency between 2 times for the elastomeric rings group.

BACTERIA	Baseline	After 6 months	Absolute and relative frequency (%)	P
Aa	-	-	25 (89.29%)	0.5637 ns
	-	+	2 (7.14%)	
	+	-	1 (3.7%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Tf	-	-	2 (7.14%)	<0.0001*
	-	+	22 (78.57%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	4 (14.29%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	26 (92.86%)	1.000 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	2 (7.14%)	<0.0001*
	-	+	21 (75.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	5 (17.86%)	

* Statistically significant difference by McNemar Test ($p < 0.05$); ns: not significant.

(-) Dental site negative; (+) Dental site positive.

Table VII. Absolute and relative frequency between 2 times for the steel ligatures group.

BACTERIA	Baseline	After 6 months	Absolute and relative frequency (%)	P
Aa	-	-	25 (89.29%)	0.5637 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	2 (7.14%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Tf	-	-	11 (39.29%)	0.0003*
	-	+	16 (57.14%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	26 (92.86%)	-
	-	+	2 (7.14%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	7 (25.00%)	0.0003*
	-	+	16 (57.14%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	4 (14.29%)	

* Statistically significant difference by McNemar Test ($p < 0.05$); ns: not significant.

(-) Dental site negative; (+) Dental site positive.

FIGURES

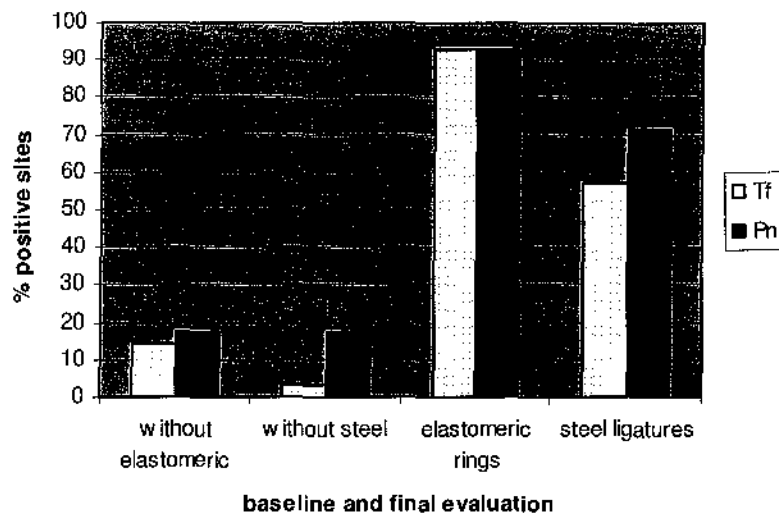


Figure A. Percentage of positive sites for microorganism Tf and Pn, comparing the 2 orthodontic ligation methods at baseline and after 6 months.

IV - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente trabalho, concluiu-se que:

- O aparelho ortodôntico fixo possibilitou a ocorrência de sinais clínicos de inflamação dos tecidos periodontais, além da colonização significativa de microorganismos como *Tannerella forsythia* e *Prevotella nigrescens*.
- As ligaduras elásticas apresentaram elevado número de sítios positivos das bactérias *Tannerella forsythia* e *Prevotella nigrescens* em relação às ligaduras metálicas, além de possibilitar maior predisposição ao sangramento gengival e retenção de biofilme, portanto, não são recomendadas em pacientes com higiene bucal deficiente.

V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A retenção de biofilme dentário evidentemente constitui-se um fator crítico do aparelho ortodôntico fixo, principalmente em pacientes não colaboradores com a higiene bucal, entretanto além dos benefícios promovidos pelo tratamento ortodôntico como reabilitação das funções estomatognáticas e obtenção de melhor estética dentofacial, muitas vezes a saúde das gengivas é facilitada pelo próprio tratamento ortodôntico, por exemplo, após a correção de um apinhamento severo, ou corrigindo-se uma extrusão patológica, assim como, recuperando tecido gengival após procedimentos de extrusão dentária para confecção de próteses dentárias. Todos estes recursos ortodônticos, dentre muitos outros, justificam e consolidam a intervenção ortodôntica nos casos oportunos.

Estudos como este, ainda pouco presente na literatura, até pelas dificuldades metodológicas ou por não despertar tantos interesses comerciais, não possui o intuito de criar uma nova tendência na Ortodontia, mas de chamar atenção para que seja possível minimizar os efeitos prejudiciais de determinados acessórios ortodônticos durante o tratamento. Fatores intrínsecos de resposta a agentes externos presentes em cada paciente podem, por exemplo, definir a quantidade de perda óssea em pacientes susceptíveis ou não a este problema, ou ainda, interferir no nível de inflamação gengival, devido resposta de endotoxinas proveniente de determinado microorganismo agregado numa ligadura elástica.

Por fim, com o avanço tecnológico e científico das áreas de saúde, muito em breve, testes microbiológicos rápidos poderão ser realizados no consultório odontológico, e auxiliar no estabelecimento do risco do paciente à inflamação gengival ou à cárie dentária. Na Ortodontia, a utilização de novos acessórios e materiais ortodônticos, como braquetes autoligáveis e substituição das bandas ortodônticas, podem contribuir significativamente para redução e proliferação de biofilmes específicos agressivos aos tecidos gengivais e dentários.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Alstad S, Zachrisson BU. Longitudinal study of periodontal condition associated with orthodontic treatment in adolescents. *Am J Orthod* 1979;76:277-286.
2. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-73.
3. Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, Campa M, Senesi S. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonization by mutans streptococci in children. *Eur J Oral Sci.* 2001;109:388-392.
4. Behlfelt K, Ericsson L, Jacobson L, Linder-Aronson S. The occurrence of plaque and gingivitis and its relationship to tooth alignment within the dental arches. *J Clin Periodontol.* 1981;8:329-37.
5. Boyd RL, Baumrind S. Periodontal considerations in the use of bonds or bands on molars in adolescents and adults. *Angle Orthod* 1992;62:117-125.
6. Chung HJ, Chung CP, Son SH, Nisengard RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1989;60:506-11.
7. Corbett JA, Brown LR, Keene HJ, Horton IM. Comparison of *Streptococcus mutans* concentrations in non-banded and banded orthodontic patients. *J Dent Res* 1981;60:1936-1942.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. Diamanti-Kipioti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. *J Clin Periodontol* 1987;14:326–333.
9. Forsberg CM, Brattström V, Malmberg E, Nord CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and lactobacilli. *Eur J Orthod* 1991;13:416-420.
10. Gumerlock PH, Tang YJ, Meyers FJ, Silva J Jr. Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces. *Rev Infect Dis* 1991;13:1053-60.
11. Jordan C, LeBlanc DJ. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:65–71.
12. Kloehn JS, Pfeifer JS. The effect of orthodontic treatment on the periodontium. *Angle Orthod* 1974;44:127-134.
13. Lang NP, Kiel RA, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *J Clin Periodontol* 1983;10:563-78.
14. Loe HE, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-187.
15. Lundström F, Krasse B. Caries incidence in orthodontic patients with high levels of *Streptococcus mutans*. *Eur J Orthod* 1987;9:117–121.
16. Mullis, KB, Faloona, FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase-catalised chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.

17. Paolantonio M, Festa F, Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1999;115:423-428.
18. 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;126:363-366.
19. Silness J, Roynstrand T. Relationship between alignment conditions of teeth in anterior segments and dental health. J Clin Periodontol 198512:312-20.
20. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. Journal of Periodontology 1992;63:322-331.
21. Svanberg M, Jacobson C, Hager B. Streptococcus mutans, lactobacilli and Streptococcus sanguis in plaque from abutment teeth of cemented and of loose retainers. Caries Res 1987;21:474-480.
22. Syed SA, Loesch WJ. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. Infect Immun 1978;21:821-9.
23. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man: a longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodont Res 1966;1:1-13.
24. Trosello V, Gianelly A. Orthodontic treatment and periodontal status. J Periodontol 1979;50:665-671.
25. Valderhaug J. Periodontal conditions and carious lesions following the insertion of fixed prostheses: a 10-year follow-up study. Int Dent J 1980;30:296-304.
26. Van Palenstein Helderma WH. Longitudinal microbial changes in developing human supragingival dental plaque. Arch Oral Biol 1981;26:7-12.

27. Van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Periodontol* 1992;63:52-7.
28. Zachrisson BU. Cause and prevention of injuries to teeth and supporting structures during orthodontic treatment. *Am J Orthod* 1976;69:285-300.
29. Zachrisson S, Zachrisson BU. Gingival condition associated with orthodontic treatment. *Angle Orthod* 1972;42:26-34.
30. Zachrisson BU, Alnaes L. Periodontal condition in orthodontically treated and untreated individuals. I. Loss of attachment, gingival pocket depth and clinical crown height. *Angle Orthod* 1973;43:402-411.

ANEXOS

1- Deliberação da Coordenadoria Central de Pós-Graduação UNICAMP.

DELIBERAÇÃO CCPG – 001/98

Dispõe a respeito do formato das teses de Mestrado e de Doutorado aprovadas pela UNICAMP

Tendo em vista a possibilidade, segundo parecer PG Nº 1985/96, das teses de Mestrado e Doutorado terem um formato alternativo àquele já bem estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - Todas as teses de mestrado e de doutorado da UNICAMP terão o seguinte formato padrão:

- I) Capa com formato único, dando visibilidade ao nível (mestrado e doutorado), e à Universidade.
- II) Primeira folha interna dando visibilidade ao nível (mestrado ou doutorado), à Universidade, à Unidade em que foi defendida e à banca examinadora, ressaltando o nome do orientador e co-orientadores. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III) Segunda folha interna onde conste o resumo em português e o Abstract em inglês.
- IV) Introdução Geral.
- V) Capítulo.
- VI) Conclusão geral.
- VII) Referências Bibliográficas.
- VIII) Apêndices (se necessários).

Artigo 2º - A critério do orientador, os Capítulos e os Apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

Parágrafo único – Os veículos de divulgação deverão ser expressamente indicados.

Artigo 3º - A PRPG providenciará o projeto gráfico das capas bem como a impressão de um número de exemplares, da versão final da tese a ser homologada.

Artigo 4º - Fica revogada a resolução CCPG 17/97.

2- Exigência mínima para defesa de tese em formato alternativo.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



INTERESSADO: COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
ASSUNTO: DEFESA DE TESE EM FORMATO ALTERNATIVO

A Congregação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em sua 105ª Reunião Ordinária, realizada em 17/12/03, aprovou a exigência mínima para defesa de tese em formato alternativo na FOP, que passará a vigorar para os alunos ingressantes a partir do ano de 2004.

Para Dissertação de Mestrado: um artigo submetido para publicação em revista científica com classificação Qualis B Nacional; e

Para Tese de Doutorado: um artigo submetido para publicação em revista científica com classificação Qualis C Internacional.

Piracicaba, 18 de dezembro de 2003.

Thales Rocha de Mattos Filho
Diretor

Original assinado, está sendo enviado à Coord. de Pós-Graduação



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise clínica e microbiológica antes e depois da instalação de aparelho ortodôntico fixo**", protocolo nº **105/2005**, dos pesquisadores **RICARDO ALVES DE SOUZA, ENILSON ANTONIO SALLUM, MARIA BEATRIZ BORGES DE ARAÚJO MAGNANI e REGINALDO BRUNO GONÇALVES**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 24/10/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Clinical and microbiologic analysis before and after settlement of orthodontic appliance**", register number **105/2005**, of **RICARDO ALVES DE SOUZA, ENILSON ANTONIO SALLUM, MARIA BEATRIZ BORGES DE ARAÚJO MAGNANI and REGINALDO BRUNO GONÇALVES**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 24/10/2005.


Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

4- Confirmação de envio do artigo do Capítulo 1

9 – Jun – 2006

Prezado colega,

É um prazer informá-lo que seu artigo foi protocolado sob número 010106 pelo Corpo Editorial da Revista Periodontia – SOBRAPE, e enviado para o revisor. Após apreciação entraremos em contato.

Atenciosamente,
Daiane Peruzzo – editora associada
Enilson Antonio Sallum
Editor - Revista Periodontia

5- Confirmação de aceite para publicação do artigo do Capítulo 2

De: AJO-DQ
Para: ricardoalves@ortodontista.com.br
Assunto: Ms. Ref. No.: AJODO-D-06-00385R1
Data: 28/09/06 16:58

Ms. Ref. No.: AJODO-D-06-00385R1

Title: Periodontal and microbiologic evaluation of two methods of archwire ligation: ligature wires and elastomeric rings

American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics

Dear Prof. Souza,

Thank you for revising your manuscript, "Periodontal and microbiologic evaluation of two methods of archwire ligation: ligature wires and elastomeric rings," and resubmitting it to the American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics. You have successfully addressed the reviewers' concerns and I am pleased to accept the paper for publication. It will make a fine contribution to the orthodontic literature.

Because we have a large backlog of accepted papers, our wait time for publication is now about 18 months. To alleviate this, we began publishing an Online Only section in 2006. Articles published in this section are listed in the Table of Contents of a printed journal and the abstracts are printed, but the full text of the articles is available only on our website. The articles are permanently linked to that printed issue (with its volume and pages numbers), and they are indexed in PubMed and otherwise treated like any other article published in the AJODO. We can offer authors much quicker publication in the Online Only section. Please let me know by return email if you would like to have your article published within the next 6 month in the Online Only section.

When we approach the publication date, we will forward your submission to the production department where the paper will be readied for publication. The production department will send you an email when the proof is ready for your approval.

Thank you for submitting your work to this journal. I look forward to seeing the article in print.

With kind regards,

David L. Turpin
Editor-in-Chief
American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

6- TABELAS E GRÁFICOS

Gráficos dos parâmetros periodontais (referente tabela I, II e III do capítulo 2).

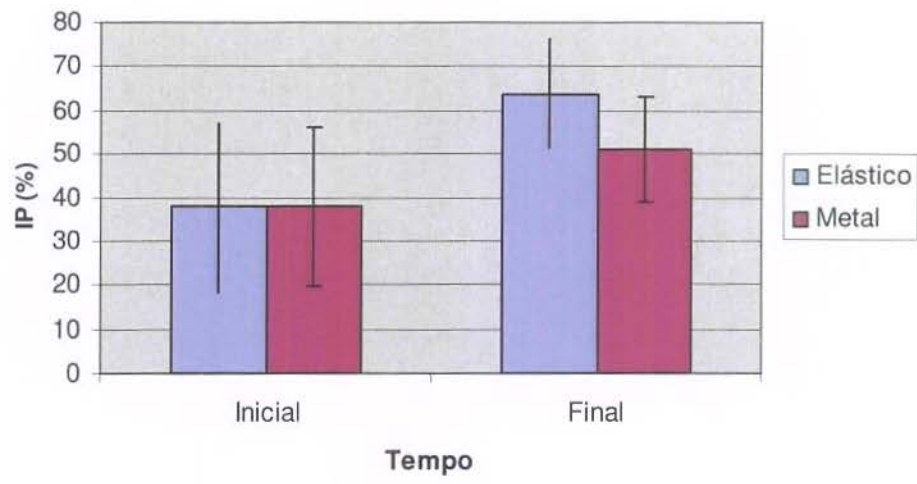


Gráfico I. Média (Desvio Padrão) do Índice de Placa em função do tratamento e do tempo.

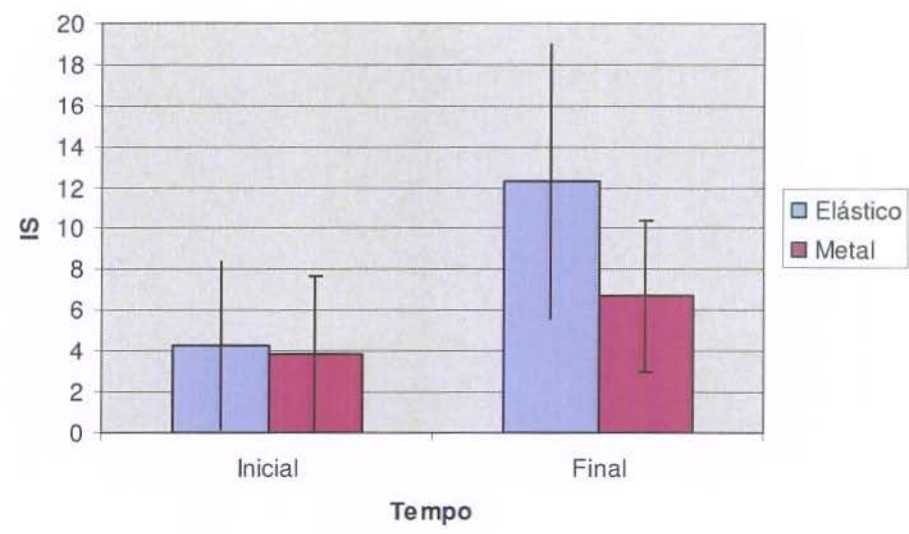


Gráfico II. Média (Desvio Padrão) do Índice de Sangramento Gengival em função do tratamento e do tempo.

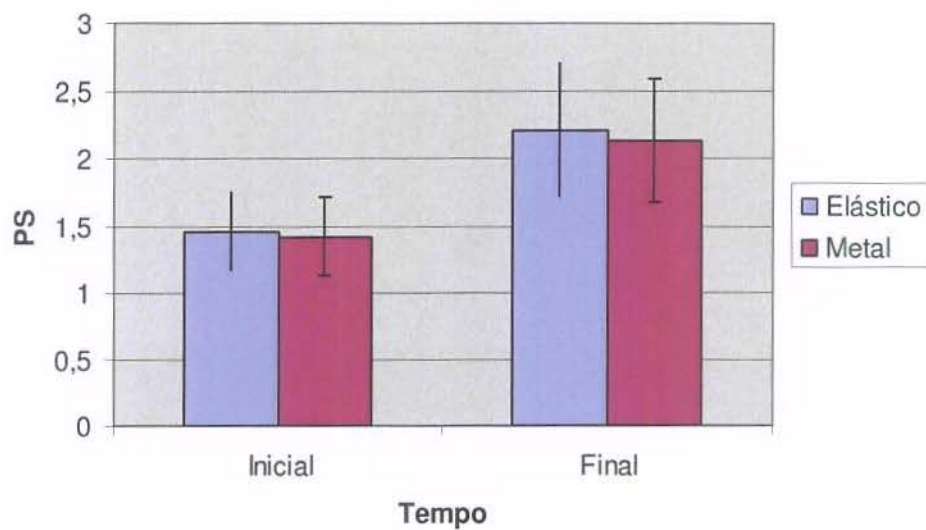


Gráfico 3. Média (Desvio Padrão) da Profundidade à Sondagem em função do tratamento e do tempo.

7- PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA

Após o degelo das amostras clínicas, elas foram submetidas à centrifugação (10000 rpm/10 minutos), seguida de remoção do sobrenadante (solução transporte TE - 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). O precipitado (biofilme dental) resultante foi submetido à extração de DNA segundo o protocolo abaixo (modificado de Doyle & Doyle, 1990):

1. Uma alíquota de 700µL de tampão de extração^δ foi adicionada à amostra, a mesma foi agitada ao vórtex e deixada por 30 minutos à 65°C num banho-maria, sendo homogeneizada suavemente a cada dez minutos;
2. Após a incubação, adicionou-se 650mL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico; 24:1), homogeneizou-se até formar uma emulsão. Depois de formada a emulsão, a amostra foi centrifugada (10000 rpm/10 minutos).
3. A fase aquosa formada após a centrifugação foi transferida para novo tubo *epENDORF* de 1,5mL e 200µL de tampão de extração sem proteinase K foi adicionado; em seguida, adicionou-se de CIA, homogeneizou-se até formar uma emulsão. Depois de formada a emulsão, a amostra foi centrifugada (10000 rpm/10 minutos).
4. Novamente a fase aquosa formada foi transferida para outro tubo *epENDORF*. A adição de CIA foi repetida por mais uma ou duas vezes, até obtenção de uma fase aquosa transparente e límpida.
5. Após obtenção de uma fase aquosa límpida, precipitou-se o DNA com adição de 650µL de álcool isopropílico à temperatura ambiente e centrifugação (10000 rpm/10 minutos).
6. Após a centrifugação, removeu-se o álcool isopropílico e 50mL de álcool etílico a 70% foi adicionado para lavar a superfície do DNA precipitado, sem ressuspender. Novamente o precipitado foi centrifugado, seguido da remoção do etanol. O tubo *epENDORF* foi deixado aberto até a secagem do precipitado.

^δ NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8,0; PVP-40 1%; CTAB 2%; Proteinase K 100 µg/mL; β-Mercaptanol 0,2% Água Milli-Q.

7. Para finalizar, o DNA foi ressuspensionado em 30µL de tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) com 10 µg/mL de RNase e deixado em Banho-Maria à 37°C por 30 minutos.

PCR

As reações de PCR foram padronizadas para cada primer (Tabela 1) utilizando-se como controle positivo o DNA genômico das cepas *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522), *T. forsythia* (ATCC 43037), *P. gingivalis* (ATCC 33277), *P. nigrescens* (NCTC 9336) e *P. intermedia* (HG110) como controle positivo; e a ausência de DNA foi utilizada como controle negativo. As reações de PCR consistiram de 200µM de dNTPs, 2,5mM de MgCl₂, 0,3µM de cada primer, 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen do Brasil) e aproximadamente 10ng de DNA genômico, em volumes de 50µL. As condições térmicas para cada par de primers foram as seguintes:

- *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*: A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 95°C por 2 min, seguida de 36 ciclos – fase de desnaturação a 94°C por 30 segundos, fase de hibridização dos “primers” a 55°C por 1 min, e fase de extensão a 72°C por 2 min – finalizando a reação a 72°C por 10 minutos (Ashimoto et al., 1996).
- *T. forsythia*: A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 95°C por 2 min, seguida de 36 ciclos – fase de desnaturação a 95°C por 30 segundos, fase de hibridização dos “primers” a 60°C por 1 min, e fase de extensão a 72°C por 1 min – finalizando a reação a 72°C por 2 minutos (Slots et al., 1995).
- *P. gingivalis*: A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos – fase de desnaturação a 94°C por 1 min, fase de hibridização dos “primers” a 70°C por 1 min, e fase de extensão a 72°C por 1 min – finalizando a reação a 72°C por 2 minutos (Benkirane et al., 1995).
- *P. nigrescens*: A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 95°C por 2 min, seguida de 36 ciclos – fase de desnaturação a 95°C por 30 segundos, fase de hibridização dos “primers” a 65°C por 1 min, e fase de extensão a 72°C por 1 min – finalizando a reação a 72°C por 2 minutos (Guillot & Mouton, 1997).

Tabela 1: Pares de *primers* utilizados.

Primers (<i>tamanho esperado; pb</i>)	Referências	Seqüência
A. actinomycetemcomitans (557pb)	Ashimoto et al., 1996	5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'
T. forsythensis (641pb)	Slots et al., 1995	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'
P. gingivalis (539pb)	Benkirane et al., 1995	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'
P. intermedia (575pb)	Ashimoto et al., 1996	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TAC ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'
P. nigrescens (1.100pb)	Guillot & Mouton, 1997	5' TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3' 5' ATG GCG AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3'

O total de 10ul das reações de PCR foram analisadas em géis de agarose a 1% (separados a 8V/cm em tampão Tris-Borato EDTA), corados com brometo de etídio (5 ug/mL), e as bandas foram observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta. Foi incluído, em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen do Brasil).

Referências:

1. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996; 11: 266-273.

2. Benkirane RM, Guillot E, Mouton C. Immunomagnetic PCR and DNA probe for detection and identification of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2908-2912.
3. Doyle, J.J.T., Doyle, J.L.. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-18, 1990.
4. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia sensu stricto* and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol*. 1997; 35:1876-82.

APÊNDICE

FIGURAS



Figura 1: GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer).

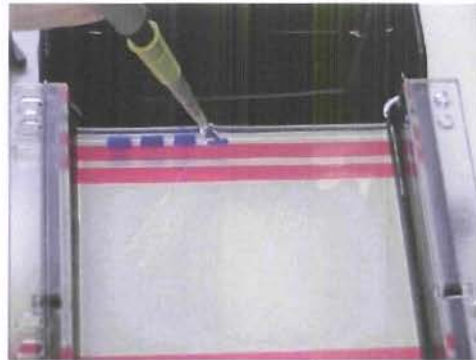


Figura 2: Eletroforese gel de agarose 1,5%.

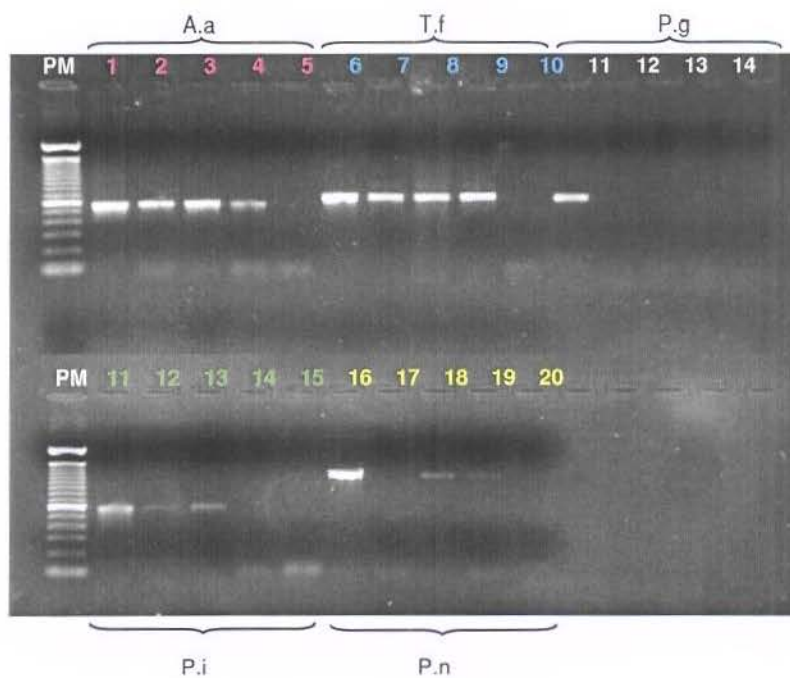


Figura 3: PM: padrão peso molecular 100pb. Canaletas 1 a 5, produtos de PCR com primers para A.a.- canaleta 1: controle positivo Aa JP2 (557pb), canaletas 2 a 3: amostras clínicas. 5: controle negativo (sem DNA).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações dispostas neste termo foram fornecidas por **Ricardo Alves de Souza** (aluno do curso de Mestrado em Ortodontia autor e responsável pelo projeto), **Prof. Dra. Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani** (Orientadora) **Profº. Drº. Enilson Antônio Sallum** (Colaborador), e **Profº. Drº. Reginaldo Bruno Gonçalves** (Colaborador), para estabelecer acordo formal por escrito, **em duas vias, uma das quais ficará em posse do voluntário, ou do responsável pelo menor**, se for o caso, e outra com o pesquisador responsável, com o intuito de autorizar sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1- Título do projeto de pesquisa

Análise clínica e microbiológica antes e depois da instalação de aparelho ortodôntico fixo.

2- Justificativa

Esta pesquisa justifica-se pela possibilidade de alteração da microbiota bucal após a instalação de aparelhos ortodônticos e a possibilidade de que esta alteração possa facilitar doença periodontal.

3- Objetivo

Avaliar clínica e microbiologicamente a modificação da flora bacteriana antes e 6 meses após a instalação de aparelho ortodôntico.

4- Procedimentos clínicos (metodologia):

Os pacientes serão examinados e acompanhados, durante os 6 meses que envolvem os pacientes na pesquisa, por profissional da área odontológica, devidamente calibrado, obedecendo todos os requisitos de biossegurança. Será realizado exame clínico periodontal, ou seja, da gengiva, analisando o seguinte: índice de placa (verificar percentualmente a quantidade de placa bacteriana aderida ao dente), profundidade de sondagem (verificar presença de espaços patológicos entre o dente e a gengiva), índice de sangramento (caso

ocorra sangramento na gengiva devido inflamação), recessão gengival (caso apresente retração gengival) e nível de inserção óssea (avaliação direta das próprias radiografias, solicitadas para instalação do aparelho, portanto sem custo e sem novas exposições à radiação). Além disso ocorrerá a coleta de placa bacteriana próxima à gengiva e ao dente, em 4 unidades dentárias, para avaliação microbiológica, ou seja, verificar a presença ou ausência de bactérias que causem inflamação na gengiva. O estudo contará também, com possíveis diferenças entre a peça que amarra o arco ortodôntico aos braquetes. Elas são constituídas de metal e de elástico, e serão fixadas da seguinte forma, no lado direito com elástico, e lado esquerdo com metal, para comparar em qual ocorre o maior acúmulo de placa bacteriana, e não interferirá no tratamento ortodôntico.

5- Desconforto ou risco esperados

O procedimento proposto possibilita um desconforto muito pequeno ao paciente, e são normalmente realizados em consultas odontológicas. Não será testado nenhum tipo de material, somente serão avaliados os tecidos gengivais antes e após a instalação de aparelho fixo, com coleta de placa bacteriana da cavidade bucal. .

6- Benefícios esperados

Monitoramento da flora bacteriana periodontopatogênica possibilitando um acompanhamento de sua higiene bucal mais cuidadosa, além de permitir uma intervenção rápida, em raros, mas possíveis problemas periodontais agudos, durante a pesquisa.

7- Métodos alternativos

Não há a possibilidade de métodos alternativos, visto que somente será realizado exame clínico nos pacientes.

8- Forma de acompanhamento e assistência

Os pacientes serão examinados na clínica de pós-graduação de Ortodontia e de Periodontia da FOP-UNICAMP, durante as fases de exame, planejamento, instalação e manutenções do aparelho fixo, não necessitando portanto de deslocamentos extras, ou outra qualquer forma

de acompanhamento e assistência. Caso seja necessário esclarecimento, os pais ou responsáveis poderão entrar em contato com os pesquisadores do estudo, através de telefone deixado no final deste termo. **Caso ocorra a persistência do quadro de gengivite e algum tipo de perda óssea, o paciente será descartado da pesquisa, e encaminhado para o setor de Periodontia da FOP-UNICAMP.**

9- Direitos dos voluntários:

Todos os voluntários têm garantido o direito de receber esclarecimento sobre a metodologia a ser empregada, antes e durante o curso do projeto. Além disso, todos os voluntários têm plena liberdade de recusa de participação ou de retirada do consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Os dados coletados e as informações pessoais são confidenciais para assegurar a privacidade dos participantes.

10- Garantia de sigilo de dados confidenciais:

Todos os dados coletados estarão sob a posse e supervisão do pesquisador responsável, e serão utilizados exclusivamente para divulgação científica, de forma que os dados presentes nesta pesquisa não trarão qualquer tipo de dano ao sujeito da pesquisa, se utilizado para estes fins.

11- Ressarcimento de despesa e formas de indenização:

Não haverá ônus material ou financeiro para os pacientes para participação nesta pesquisa, portanto não há previsão de ressarcimento de gastos. No caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa, as formas de indenização serão definidas judicialmente no foro local, de acordo com a legislação vigente. Eventuais despesas feitas pelo pacientes com transporte e alimentação serão devidamente ressarcidas pelo executor da pesquisa.

12- Consentimento formal para participação em pesquisa clínica.

Por este instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu,

_____,
RG: _____, CPF: _____, residente à

na cidade de _____, responsável pelo menor (se for o
caso): _____, concordo

com absoluta consciência que eu (meu filho) serei (será) examinado clinicamente, nos
termos relacionados nas disposições anteriores. Esclareço ainda que este consentimento não
exime a responsabilidade do profissional que executará os exames clínicos. Por estar de
acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Piracicaba, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável _____.

Assinatura do pesquisador _____.

Dúvidas e esclarecimentos: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP),
Departamento de Odontologia Infantil, Área de Ortodontia. End. Av. Limeira, 901 Caixa
Postal 52 - Piracicaba - SP CEP 13414-903, Tel.: 3421-0049 ou 8154-3354 falar com
Ricardo Alves de Souza, aluno do Mestrado em Ortodontia. CEP-FOP (Comitê de Ética e
Pesquisa) Caixa Postal 52, 13414-903 Piracicaba-SP (0xx19) 3412-5349, fax (0xx19)
3412-5218. cep@fop.unicamp.br

Parâmetros periodontais individuais de índice de placa (IP), índice de sangramento gengival (ISG) e profundidade à sondagem (IP).

EXAME INICIAL

PACIENTES	SEM ELÁSTICO			SEM METAL		
	IP	ISG	PS	IP	ISG	PS
1	8,33%	1%	1,17	10,71%	2%	1,34
2	46,42%	1%	1,45	54,76%	2%	1,13
3	59,72%	2%	1,14	56,94%	5%	1,04
4	29,16%	0	1,45	29,16%	0	1,28
5	19,23%	2%	1,19	15,47%	3%	1,18
6	19,44%	5%	1,71	18,05%	0	1,50
7	65,27%	7%	1,45	61,11%	9%	1,50
8	27,77%	0	1,13	25%	2%	1,22
9	65,27%	10%	1,96	65,27%	0	1,83
10	47,22%	0	1,17	43,05%	1%	1,16
11	47,22%	13%	1,85	41,66%	11%	1,87
12	51,38%	8%	1,85	48,61%	11%	1,94
13	29,16%	6%	1,32	38,88%	4%	1,30
14	12,50%	5%	1,60	19,44%	4%	1,55

EXAME FINAL

PACIENTES	ELÁSTICO			METAL		
	IP	ISG	PS	IP	ISG	PS
1	44,04%	8%	1,55	35,71%	1%	1,47
2	65,47%	2%	2,16	60,71%	2%	2,14
3	77,77%	19%	1,72	59,72%	5%	1,90
4	80,55%	23%	2,53	68,05%	8%	2,37
5	74,35%	10%	2,77	53,57%	10%	2,70
6	72,22%	11%	2,82	62,50%	8%	2,84
7	58,33%	19%	2,35	41,66%	9%	2,38
8	52,77%	4%	1,66	41,66%	5%	1,82
9	81,94%	18%	2,90	68,05%	14%	2,70
10	51,38%	3%	2,08	34,72%	4%	2,03
11	61,11%	16%	2,77	45,83%	11%	2,25
12	68,05%	16%	2,25	62,50%	9%	2,21
13	48,61%	8%	1,57	38,88%	4%	1,46
14	55,55%	15%	1,80	41,66%	4%	1,58

Parâmetros microbiológicos individuais.

Controle de amostras, pacientes e resultados obtidos pela análise por PCR.

COLETA INICIAL

AMOSTRA		BACTÉRIAS						
Nº	PACIENTE	PLACA	DENTE	A.a.	T.f.	P.g.	P.i.	P.n.
1		<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
2	PACIENTE - 1	(2 mm)	25	-	-	-	-	-
3		+	32	-	-	-	-	-
4		<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
5		(2 mm)						
6	PACIENTE - 2	<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
7		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
8		+	32	-	-	-	-	-
9		<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	-
10	PACIENTE - 3	(2 mm)						
11		<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
12		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
13		+	32	-	-	-	-	-
14	PACIENTE - 4	<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
15		(2 mm)						
16		<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
17		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
18	PACIENTE - 5	+	32	-	-	-	-	-
19		<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	+
20		(2 mm)						
21	PACIENTE - 6	<u>SUPRA</u>	15	-	+	-	+	-
22		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
23		+	32	-	-	-	-	-
24		<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
25	PACIENTE - 7	(2 mm)						
26		<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
27		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
28		+	32	-	-	-	-	-
29	PACIENTE - 8	<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
30		(2 mm)						
31		<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
32		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
33	PACIENTE - 9	+	32	-	-	-	-	+
34		<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
35		(2 mm)						
36	PACIENTE - 10	<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
37		(2 mm)	25	+	-	-	-	+
38		+	32	+	-	-	-	+
39		<u>SUB</u>	42	+	+	-	-	+
40		(2 mm)						

Nº	PACIENTE	PLACA	DENTE	A.a.	T.f.	P.g.	P.i.	P.n.
41	PACIENTE - 11	<u>SUPRA</u>	15	-	-	-	-	-
42		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
43		+	32	-	-	-	-	-
44	PACIENTE - 12	<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
45		(2 mm)	15	-	-	-	-	-
46		<u>SUPRA</u>	25	-	-	-	-	-
47	PACIENTE - 13	+	32	-	-	-	-	-
48		<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
49		(2 mm)	15	-	-	-	-	-
50	PACIENTE - 14	<u>SUPRA</u>	25	-	-	-	-	-
51		(2 mm)	32	-	-	-	-	-
52		+	42	-	-	-	-	-
53	PACIENTE - 14	<u>SUB</u>	15	-	-	-	-	-
54		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
55		+	32	-	-	-	-	-
56		<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
		(2 mm)						

+ : presença de bactéria
 - : ausência de bactéria

Controle de amostras, pacientes e resultados obtidos pela análise por PCR.

COLETA FINAL

AMOSTRA		BACTÉRIAS						
Nº	PACIENTE	PLACA	DENTE	A.a.	T.f.	P.g.	P.i.	P.n.
57	PACIENTE - 1	<u>SUPRA</u>	15	-	+	-	-	+
58		(2 mm)	25	-	-	-	-	+
59		+	32	-	-	-	-	+
60	PACIENTE - 2	<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
61		(2 mm)	15	-	+	-	-	+
62		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
63	PACIENTE - 3	+	32	-	+	-	-	+
64		<u>SUB</u>	42	-	+	-	+	+
65		(2 mm)	15	-	+	-	-	+
66	PACIENTE - 4	<u>SUPRA</u>	25	-	+	-	-	+
67		(2 mm)	32	-	+	-	-	+
68		+	42	-	+	-	-	+
69	PACIENTE - 5	<u>SUB</u>	15	-	+	-	-	+
70		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
71		+	32	-	-	-	-	+
72	PACIENTE - 6	<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
73		(2 mm)	15	+	+	-	-	+
74		+	25	-	+	-	-	+
75	PACIENTE - 7	<u>SUB</u>	32	+	+	-	+	+
76		(2 mm)	42	+	+	-	-	+
77		<u>SUPRA</u>	15	-	+	-	-	+
78	PACIENTE - 8	(2 mm)	25	-	+	-	-	+
79		+	32	-	+	-	-	+
80		<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
81	PACIENTE - 9	(2 mm)	15	-	+	-	-	+
82		+	25	-	-	-	-	+
83		<u>SUB</u>	32	-	+	-	-	+
84	PACIENTE - 10	(2 mm)	42	-	+	-	-	+
85		<u>SUPRA</u>	15	-	+	-	-	+
86		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
87	PACIENTE - 10	+	32	-	-	-	-	-
88		<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
89		(2 mm)	15	-	+	-	-	+
90	PACIENTE - 10	<u>SUPRA</u>	25	-	+	-	-	+
91		(2 mm)	32	-	-	-	-	-
92		+	42	-	+	-	-	+
93	PACIENTE - 10	<u>SUB</u>	15	-	+	-	-	+
94		(2 mm)	25	-	+	-	+	+
95		+	32	-	+	-	-	+
96		<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
		(2 mm)						

Nº	PACIENTE	PLACA	DENTE	Aa	Tf	Pg	Pi	Pn
97	PACIENTE - 11	<u>SUPRA</u>	15	-	+	-	-	+
98		(2 mm)	25	-	+	-	-	+
99		+	32	-	+	-	-	+
100	PACIENTE - 12	<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
101		(2 mm)	15	-	+	-	-	+
102		(2 mm)	25	-	+	-	-	-
103		+	32	-	+	-	-	+
104	PACIENTE - 13	<u>SUB</u>	42	-	-	-	-	-
105		(2 mm)	15	-	+	-	-	+
106		<u>SUPRA</u>	25	-	+	-	-	+
107		(2 mm)	32	-	-	-	-	+
108	PACIENTE - 14	+	42	-	+	-	-	+
109		<u>SUB</u>	15	-	-	-	-	-
110		(2 mm)	25	-	-	-	-	-
111		+	32	-	-	-	-	-
112		<u>SUB</u>	42	-	+	-	-	+
		(2 mm)						

+ : presença de bactéria
 - : ausência de bactéria

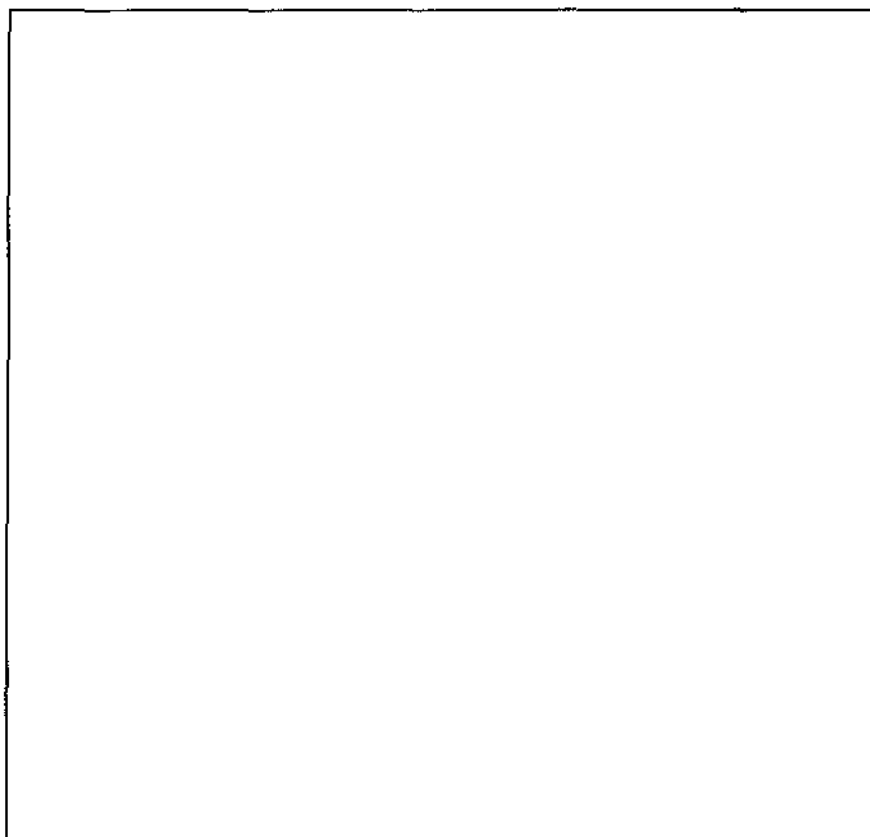
FICHA DE PROTOCOLO DE PCR UTILIZADO

PCR: _____

Conc. gel	Volume do gel	Voltagem	Tempo de corrida	Data

	H ₂ O milli-Q	Tampão do PCR 10X	dNTPs 10mM	MgCl ₂ 25mM	Primer S. 10uM	Primer I. 10uM	Taq pol. 5U/ul	DNA
volume								
[] final								
Master MIX								vol. total: uL

Canaleta	Amostra
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	



Tamanho esperado do produto: _____

Condições térmicas

Amostra aplicada:

Vol. Do tampão de corrida: _____

Vol. da amostra: _____

VERSÃO EM PORTUGUÊS DO CAPÍTULO 2

Avaliação periodontal e microbiológica de dois métodos de amarração do arco ortodôntico: ligaduras metálicas e elásticas.

Ricardo Alves de Souza^a

Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani^b

Darcy Flávio Nouer^c

Cleverson de Oliveira e Silva^d

Marlise Inêz Klein^e

Enilson Antonio Sallum^f

Reginaldo Bruno Gonçalves^g

^aMestre e Especialista em Ortodontia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, Professor de Ortodontia da Universidade Estadual de Sudoeste da Bahia, Brasil.

^bProfessora Assistente, Departamento de Ortodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.

^cCoordenador e Professor Titular, Departamento de Ortodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.

^dEstudante de Doutorado, Área de Periodontia, Departamento de Periodontia e Prótese, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.

^e Estudante de Doutorado, Área de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.

^gProfessor Titular, Área de Periodontia, Departamento de Periodontia e Prótese, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.

^fProfessor Assistente, Área de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.

Autor para correspondência: Ricardo Alves de Souza

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade de Campinas, Área de Ortodontia
Avenida Limeira, 901, Areão CEP: 3414-903 Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Telefone: (19) 3412-5200, fax: (19) 3421-0144 ricardoalves@fop.unicamp.br

RESUMO

Introdução: Condutas profiláticas, com a finalidade de evitar o acúmulo de biofilme, devem ser empregadas para minimizar o risco de desenvolvimento de doença periodontal em pacientes sob tratamento ortodôntico. Desta forma, este estudo avaliou possíveis alterações periodontais e microbiológicas proveniente da utilização de dois métodos para fixação do arco ortodôntico: anéis elásticos e ligaduras metálicas. **Métodos:** Os seguintes parâmetros: índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade à sondagem e amostras de biofilme dos dentes 15, 25, 32 e 42 foram avaliados em 14 pacientes, sem sinais clínicos de inflamação gengival antes da instalação de aparelho ortodôntico e após seis meses de tratamento. Cada arco ortodôntico foi fixado com anéis elásticos em um dos lados da linha média, enquanto ligaduras metálicas foram utilizadas no lado oposto. Reação de polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada para detectar *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, e *P. nigrescens*. **Resultados:** Os anéis elásticos demonstraram maior valores para os índices de placa e de sangramento do que as ligaduras metálicas, bem como um grande número de sítios positivos de *T. forsythia* e *P. nigrescens* ($p < 0,05$). **Conclusões:** Os anéis elásticos favoreceram a presença destes dois periodontopatógenos, e prejudicou as condições gengivais.

Palavras-chave: anéis elásticos, aparelho ortodôntico, doença periodontal, biofilme dentário, microbiologia.

INTRODUÇÃO

O aumento da quantidade de biofilme dentário indica um elevado risco de efeitos adversos para o periodonto.¹⁻³ Muitos estudos relataram que o fator etiológico na doença periodontal mais importante é a presença do biofilme dentário na margem gengival.^{2,4-6} A combinação de tratamento ortodôntico e uma higiene bucal deficiente pode causar sérios danos ao periodonto.⁷⁻⁹ Os componentes do aparelho ortodôntico fixo propiciam novas áreas de retenção, as quais permitem a colonização bacteriana e o crescimento do número de microorganismos.^{10,11} Diversos estudos utilizaram como referência, parâmetros clínicos como índices de placa, índice gengival, profundidade à sondagem e perda óssea, envolvendo os tecidos periodontais próximos dos aparelhos ortodônticos.^{2,12-17} Entretanto, muito pouca informação existe para avaliar possíveis alterações clínicas e microbiológicas das diferentes técnicas para amarração do arco ortodôntico aos braquetes.^{10,11,18} Um estudo mostrou que um maior número de microorganismos foram exibidos em pacientes com anéis elásticos do que em ligaduras metálicas, portanto considerou-se que o método de amarração ortodôntica foi um fator adicional para o acúmulo de biofilme.¹⁰

Diversas pesquisas mostraram que aparelhos ortodônticos fixos elevaram significativamente a colonização de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilli*.^{10,11,19-21} Patógenos periodontais, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*^{7,22,23} e *Tannerella forsythia*²², também estiveram significativamente associados com a inflamação gengival durante o tratamento ortodôntico.^{9,22,23}

Entre as várias espécies que têm sido encontradas preferencialmente em indivíduos com doença periodontal estão *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola*.²⁴⁻²⁷ Essas bactérias possuem características químicas e biológicas que as tornam os principais membros da microbiota periodontopatogênica.²⁸ Porém nem todos os indivíduos com comprometimento periodontal albergam todas as espécies supostamente periodontopatógenas.²⁹⁻³⁴

As espécies *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram encontradas em periodontite pré-pubertal.³⁵ Da mesma forma, espécies associadas à doença têm sido frequentemente encontradas em pacientes aparentemente saudáveis.^{31,32} Diversas interações entre as

espécies podem ser típicas num processo patológico.³⁶ Alguns autores acreditam ainda, que a destruição irreversível de tecidos do hospedeiro ocorra somente quando níveis bacterianos atingem um limiar crítico.³⁷

Os objetivos desta presente investigação foram avaliar a condição periodontal e as mudanças microbiológicas em pacientes tratados ortodonticamente, e verificar as alterações associadas ao desenvolvimento de biofilme dentário em dois diferentes métodos de amarração: anéis elásticos e ligaduras metálicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e procedimentos clínicos

Quatorze indivíduos (idade 17 ± 2.6 anos [média $\pm$ DP]; 6 homens, 8 mulheres) participaram deste estudo. Todos pacientes possuíam boa saúde; nenhum utilizou antibiótico 3 meses antes do exame inicial e durante o tratamento; inicialmente não apresentavam sinais clínicos de inflamação gengival; cada paciente necessitava de tratamento ortodôntico fixo e possuía apinhamento dentário na região anterior em ambas arcadas. Os critérios de exclusão foram: fumantes; mulheres grávidas ou em fase de amamentação; usuários de medicação sistêmica para doenças crônicas; aqueles que se submeteram a tratamento periodontal 3 meses antes do exame inicial; e qualquer desordem sistêmica pudesse influenciar as condições periodontais e microbiológicas ou resposta ao tratamento. Os pacientes foram selecionados aleatoriamente entre os pacientes da Área de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, que forneceram consentimento formal por escrito. Este protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Campinas.

Os pacientes receberam exclusivamente orientação profissional de higiene bucal (técnica de Bass) e tratamento profilático dez dias antes do exame inicial. Durante 6 meses, nenhuma informação adicional sobre higiene bucal foi instituída aos pacientes na Faculdade de Odontologia. Amostras de biofilme foram coletadas antes da instalação do aparelho ortodôntico fixo, na superfície vestibular dos segundos pré-molares superiores e dos incisivos laterais inferiores (4 amostras por paciente). Os parâmetros clínicos

analisados incluíram índice de placa,³⁸ índice de sangramento gengival,³⁹ profundidade à sondagem medida por sonda periodontal da marca Williams (Newmar, São Paulo, Brasil).

Após os exames clínicos, os pacientes receberam aparelho ortodôntico fixo, com braquetes nos incisivos, caninos, pré-molares e primeiros molares, e bandas ortodônticas nos segundos molares. Braquetes metálicos Edgewise padrão foram utilizados em todos os pacientes, além de um arco passivo fixado ao aparelho ortodôntico imediatamente após a colagem. A técnica ortodôntica utilizada foi a tecnologia de forças direcionais Tweed-Merifield, com modificações da FOP-UNICAMP. Em todos os pacientes, anéis elásticos convencionais foram utilizados para amarrar um dos lados da arcada dentária a partir da linha media, enquanto ligaduras metálicas foram utilizadas no lado oposto. Cada lado, das arcadas dentárias, recebeu aleatoriamente os auxiliares de amarração ortodôntica, com o intuito de minimizar possíveis preferências individuais do lado de escovação. Os anéis elásticos e ligaduras metálicas foram trocados todos os meses. A sequência de arcos ortodônticos para o período de 6 meses foi a seguinte: inicialmente um 0,014'' de aço foi instalado, após 2 meses um 0,016'' de aço foi usado para melhorar o alinhamento dentário, portanto, quando o paciente apresentava um 0,018'', também de aço, foi realizada a coleta final de biofilme.

Parâmetros clínicos foram registrados em seis sítios dentários (mesiovestibular, vestibular, mesiolingual, lingual e distolingual) de todos os dentes, exceto dos segundos e terceiros molares, em dois diferentes tempos: antes da instalação do aparelho ortodôntico, e seis meses após a colagem ortodôntica. Somente um profissional (COS), com experimento cego aos grupos, realizou todas as avaliações clínicas, ao mesmo tempo, em que foram coletadas as amostras de biofilme.

Coleta das Amostras

As áreas experimentais foram isoladas com rolos de algodão estéril para evitar contaminação com saliva. O biofilme foi coletado com uma cureta periodontal, envolvendo a região cervical do dente, aproximadamente 2 mm na porção supragengival e 2 mm subgengivalmente, e colocada em tubo de eppendorf contendo 0,3 ml T.E. de solução tampão esterilizada (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). O total de amostras

n= 112, foram provenientes dos 14 pacientes selecionados, em 2 tempos de avaliação e 4 sítios dentais por paciente (4 sítios iniciais, n= 56; 2 sítios finais com elástico, n= 28, e 2 sítios finais com metal, n= 28). Estas amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C, até realização de extração do DNA.

Extração de DNA e Identificação por PCR

O DNA genômico foi extraído de acordo com metodologia proposta por Doyle & Doyle.⁴⁰ A solução de extração foi estocada à temperatura de -20°C até análise por PCR.

Os “primers” bacterianos e a temperatura de processamento do PCR utilizado, foram descritos previamente, para cada uma das cinco bactérias: *Porphyromonas gingivalis* (Pg),⁴¹ *Tannerella forsythia* (Tf),⁴² *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa),⁴² *Prevotella intermedia* (Pi),⁴³ e *Prevotella nigrescens* (Pn).⁴³ A PCR foi processada pela mistura de reagentes contendo 1 µL de DNA, 200 µM de dNTPs, 2,5mM de MgCl₂, 0,3 µM de cada primer superior e inferior, e 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) com um volume final de 50 µL. O DNA genômico purificado de *P. gingivalis* (ATCC 33277), *T. forsythia* (ATCC 43037), *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522), *P. intermedia* (ATCC 25611), e *P. nigrescens* (NCTC9336), foi utilizado como controle positivo, e água bi-destilada como controle negativo. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão (8V/cm em Tris-borato-EDTA), e corado em brometo de etídio.

Análise Estatística

Para os parâmetros periodontais, após análise exploratória dos dados, a análise de variância – ANOVA – foi utilizada para avaliar as medidas repetidas.

Nos dados microbiológicos, o número de sítios, que abrigaram as 5 bactérias avaliadas, foi processado no início e após seis meses de tratamento, e para ambos os grupos de ligadura ortodôntica também. O teste de McNemar foi utilizado para verificar diferenças

intragrupos no início e seis meses após o tratamento ortodôntico. E o mesmo teste, também foi utilizado para verificar diferenças entre grupos. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Para o índice de placa foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois períodos de tempo analisados, como também, em ambos os métodos de amarração ortodôntica (Tabela I). Os valores mostraram uma média de 37,72% inicialmente, e 63,72% após seis meses quando se utilizou anel elástico. As ligaduras metálicas aumentaram os valores de 37,72% para 51,09% no período final. Ao comparar os dois tipos de acessório de amarração ortodôntica, o resultado demonstrou índice de placa maior no grupo de ligaduras elásticas. No índice de sangramento gengival os valores foram ainda mais discrepantes entre e intragrupos. Os valores no grupo de anéis elásticos (12,28%) foram maiores do que nas ligaduras metálicas (6,71%). Antes da instalação de aparelho fixo os percentuais eram bem menores 4,28% e 3,86% (Tabela II).

Para o parâmetro de profundidade à sondagem, não ocorreu diferença significativa entre o grupo dos elásticos (2,21mm) e o grupo das ligaduras metálicas (2,13mm) após colagem ortodôntica (Tabela III). Entretanto, ao comparar os valores iniciais e os finais, os grupos mostraram diferença estatística, de forma que a profundidade inicial média foi de 1,46mm e 1,42mm.

Microbiologicamente, as diferenças não foram significantes no período inicial, como mostrado na tabela IV. Neste caso, a maioria dos sítios foi negativa para todos periodontopatógenos avaliados antes do tratamento. Quando a análise ocorreu depois do tratamento ortodôntico, considerando os dois grupos (Tabela V), ou nos dois tempos para anéis elásticos (Tabela VI) e para ligaduras metálicas (Tabela VII), verificaram-se diferenças estatisticamente significantes para Tf e Pn, entre os períodos avaliados, bem como, no método de amarração ortodôntico utilizado.

O percentual de sítios positivos encontrados tanto para Tf como para Pn foi de 92,85%, nos dentes amarrados com anéis elásticos. A redução dos valores observados para o grupo amarrado por ligaduras metálicas foi de 57,14% para Tf e 71,42% para Pn (Figura

A). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os outros microorganismos avaliados (Aa, Pg e Pi).

DISCUSSÃO

Diversos estudos relataram que a instalação de aparelho ortodôntico promove acúmulo de biofilme dentário,^{2,3,5-9,12,14,15-17,21-23} o que foi demonstrado também, nesta presente pesquisa. Entretanto, poucos autores^{10,11,18} avaliaram as diferenças periodontais e microbiológicas entre os métodos de amarração do arco ortodôntico. O período de observação dos possíveis efeitos no periodonto, entre as 2 técnicas utilizadas neste estudo, foi determinante para que a coleta do biofilme final fosse realizada após seis meses, um período satisfatório para começar a observação de uma doença crônica, como a periodontite. Neste período, a cooperação e a motivação dos pacientes para a higiene bucal não foi modificada, numa tentativa de simular situações clínicas bastante comuns. Em outros estudos, as maiores alterações periodontais ocorreram 3 meses após a colagem ortodôntica.^{9,23} Em nossa metodologia e de outros estudos^{10,11} comparativos entre anéis elásticos e ligaduras metálicas foram utilizadas para avaliação microbiológica o método de arco cruzado, como condição de reduzir variações individuais e diferenças intragrupos, entretanto, existem deficiências inevitáveis e dificuldades relacionadas à possibilidade de contaminação bacteriana através do arco, que com certeza, ocorrem inevitavelmente.

Um elevado percentual de sangramento em dentes com braquetes colados⁴⁴ e dentes bandados⁹ também foi relatado devido presença de aparelho ortodôntico fixo. Nossos resultados em dentes amarrados com anéis elásticos determinaram uma maior tendência de sangramento gengival, este dado corroborou com o estudo de Türkkahraman et al,¹¹ os quais avaliaram o sangramento em cinco semanas após a colagem, e concluíam que a utilização de anéis elásticos não é recomendado em pacientes com higiene bucal deficiente. Entretanto, estes autores também relataram que dentes amarrados com anéis elásticos demonstraram que o número de microorganismos (*Streptococcus mutans* and *Lactobacilli*) foi um pouco maior do que nas ligaduras metálicas, de forma que a diferença não foi significativa estatisticamente, e poderia ser ignorado. Estes autores também não observaram diferenças ao comparar o índice de placa entre elásticos e metais. Neste parâmetro clínico,

nosso resultado mostrou uma importante associação com o tipo de amarração ortodôntica, e demonstrou um elevado índice de placa no lado da arcada dentária fixada por anéis elásticos. A discrepância com o nosso estudo, nestes pontos, pode estar relacionada pelas diferenças nos microorganismos analisados, no tipo de teste microbiológico, no período de avaliação estudado, ou nos fatores de resistência do hospedeiro das amostras. Até o tempo necessário para o desenvolvimento de inflamação gengival, na ausência de higiene oral, varia de uma pessoa para outra e depende da velocidade de formação do biofilme.^{4,45}

Por outro lado, o parâmetro clínico como profundidade à sondagem, foi observada uma diferença significativa após a instalação do aparelho ortodôntico fixo, mas não foram verificadas discrepâncias quando a análise ocorreu entre os dois métodos de amarração ortodôntica avaliados. Esta situação clínica, criou um ambiente propício para desenvolvimento de microorganismos, mas em um dos lados da arcada dentária, esta condição estava ainda mais favorável, pelo menos para as bactérias Tf e Pn, correlacionada, provavelmente, pela presença dos anéis elásticos.

Em estudo realizado com microscopia eletrônica de varredura (SEM) para avaliar colonização bacteriana associada ao aparelho ortodôntico fixo, os autores observaram que o método de amarração ortodôntica não aparentava influenciar nos tipos bacterianos aderidos ao compósito ou às superfícies de esmalte.¹⁸ Entretanto, esta metodologia foi realizada somente em três semanas e o arco ortodôntico não estava amarrado aos braquetes, pois o modelo experimental do estudo incluiu somente um dente colado em cada quadrante.

Nosso estudo demonstrou diferença significativa no número de sítios positivos de Pn e Tf após colagem ortodôntica, bem como nos anéis elásticos utilizados para amarrar um dos lados das arcadas dentárias. Inicialmente, a espécie *P. nigrescens* era mais comumente observada em crianças do que em adultos,⁴⁶ entretanto, posteriormente esta bactéria foi listada como sendo um possível patógeno relacionado à periodontite do adulto.⁴⁷ Interessantemente, um autor relatou que o biofilme supragengival interdental poderia servir como habitat natural de *P. nigrescens* e de outros supostos periodontopatógenos em indivíduos saudáveis.⁴⁸ *T. forsythia* foi uma espécie observada em maior número nos sítios de doença periodontal destrutiva do que em sítios saudáveis, ou com gengivite.⁴⁹ Além disso, a Tf foi detectado mais frequentemente e em maior número em lesões periodontais ativas do que em lesões inativas.⁵⁰ Alguns autores também relataram que esta espécie era a mais

detectada em quadros refratários,⁵¹ com elevação de anticorpos séricos em paciente com periodontite.⁵² Outros pesquisadores consideraram o Tf como sendo o fator de risco microbiano mais significativo que distingue indivíduos com periodontite daqueles que se apresentam periodontalmente saudáveis.^{30,53}

Os resultados de Forsberg *et al*¹⁰ mostraram que a maioria das unidades dentárias amarradas com anéis elásticos, demonstrou um maior número de microorganismos no biofilme, do que os dentes amarrados com ligadura metálica. Neste aspecto, estes resultados foram semelhantes aos nossos, e também foi realizado em um período de tempo maior. Contudo, a avaliação realizada por estes autores foram em *S mutans* e *Lactobacilli*, patógenos cariogênicos. Outros autores⁵⁴ observaram o desenvolvimento de biofilme e de *S. mutans* associado a ligaduras metálicas e anéis elásticos em pacientes ortodônticos tratados com e sem 0,4% de flúor gel estanhoso. Os resultados mostraram que o número de *S. mutans* na saliva e no biofilme não foi diferente estatisticamente entre os dentes amarrados com anéis elásticos e ligaduras metálicas, ou entre os grupos: experimental e controle. Nesta investigação, as amostras finais de biofilme foram coletadas entre 15 e 30 dias após instalação do aparelho, enquanto que nossa avaliação final do biofilme foi realizada após 6 meses.

Nosso estudo também mostrou que as diferenças não foram significantes para os microorganismos Aa e Pi, nulo para Pi na tabela IV, e nulo em todas situações analisadas para Pg. Entretanto, principalmente bactérias como *A. actinomycetemcomitans* foram associadas em pacientes ortodônticos com inflamação gengival.^{22,23} Portanto, pelos parâmetros clínicos avaliados e pelo resultado significativo de sítios positivos para Tf e Pn, os anéis elásticos demonstraram uma maior correlação com estes tipos de microorganismos, geralmente encontrados em doenças periodontais, do que as ligaduras metálicas.

CONCLUSÕES

A utilização de anéis elásticos promove uma retenção significativa de biofilme, com alterações clínicas significantes para o índice de placa e índice de sangramento gengival. Elas também propiciaram uma maior presença de periodontopatógenos como *Tannerella forsythia* e *Prevotella nigrescens*.

TABELAS

Tabela I. Média (Desvio Padrão) de IP em função do tratamento e do tempo.

Tempo	Método de amarração ortodôntica	
	Elástico	Metal
Inicial	37,72% (19,35) A b	37,72% (18,21) A b
Final	63,72% (12,43) A a	51,09% (12,27) B a

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem entre si pela ANOVA) .

Tabela II. Média (Desvio Padrão) de IS em função do tratamento e do tempo.

Tempo	Método de amarração ortodôntica	
	Elástico	Metal
Inicial	4,28% (4,12) A b	3,86% (3,86) A b
Final	12,28% (6,66) A a	6,71% (3,71) B a

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem entre si pela ANOVA).

Tabela III. Média (Desvio Padrão) de OS em função do tratamento e do tempo.

Tempo	Método de amarração ortodôntica	
	Elástico	Metal
Inicial	1,46 (0,29) A b	1,42 (0,29) A b
Final	2,21 (0,49) A a	2,13 (0,45) A a

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem entre si pela ANOVA).

Tabela IV. Frequência absoluta e relativa entre os 2 grupos antes do tratamento.

BACTÉRIA	sem elástico	sem Metal	Frequência absoluta e relativa (%)	P
Aa	-	-	26 (92.86%)	0.3173 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	1 (3.57%)	
Tf	-	-	23 (82.14%)	0.1797 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	4 (14.24%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	27 (96.43%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	22 (78.57%)	1.000 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	4 (14.29%)	

* significativo pelo teste de McNemar ($p < 0,05$); ns: não significativo

(-) Sítio dental negativo; (+) Sítio dental positivo.

Tabela V. Frequência absoluta e relativa entre os 2 grupos após 6 meses.

BACTÉRIA	anéis elásticos	ligaduras metálicas	Frequência absoluta e relativa (%)	P
Aa	-	-	26 (92.86%)	0.3173 ns
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	1 (3.57%)	
Tf	-	-	1 (3.57%)	0.0039*
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	11 (39.29%)	
	+	+	15 (53.57%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	25 (89.29%)	0.5637 ns
	-	+	2 (7.14%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	1 (3.57%)	0.0339*
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	7 (25.00%)	
	+	+	19 (67.86%)	

* significativo pelo teste de McNemar ($p < 0,05$); ns: não significativo

(-) Sítio dental negativo; (+) Sítio dental positivo.

Tabela VI. Frequência absoluta e relativa entre os 2 tempos para o grupo de anéis elásticos.

BACTÉRIA	Antes	Após 6 meses	Frequência absoluta e relativa (%)	P
Aa	-	-	25 (89.29%)	0.5637 ns
	-	+	2 (7.14%)	
	+	-	1 (3.7%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Tf	-	-	2 (7.14%)	<0.0001*
	-	+	22 (78.57%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	4 (14.29%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	26 (92.86%)	1.000 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	2 (7.14%)	<0.0001*
	-	+	21 (75.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	5 (17.86%)	

* significativo pelo teste de McNemar ($p < 0,05$); ns: não significativo

(-) Sítio dental negativo; (+) Sítio dental positivo.

Tabela VII. Frequência absoluta e relativa entre os 2 tempos para o grupo de ligaduras metálicas.

BACTÉRIA	Antes	Após 6 meses	Frequência absoluta e relativa (%)	P
Aa	-	-	25 (89.29%)	0.5637 ns
	-	+	1 (3.57%)	
	+	-	2 (7.14%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Tf	-	-	11 (39.29%)	0.0003*
	-	+	16 (57.14%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pg	-	-	28 (100.00%)	-
	-	+	0 (0.00%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pi	-	-	26 (92.86%)	-
	-	+	2 (7.14%)	
	+	-	0 (0.00%)	
	+	+	0 (0.00%)	
Pn	-	-	7 (25.00%)	0.0003*
	-	+	16 (57.14%)	
	+	-	1 (3.57%)	
	+	+	4 (14.29%)	

* significativo pelo teste de McNemar ($p < 0,05$); ns: não significativo

(-) Sítio dental negativo; (+) Sítio dental positivo.

FIGURAS

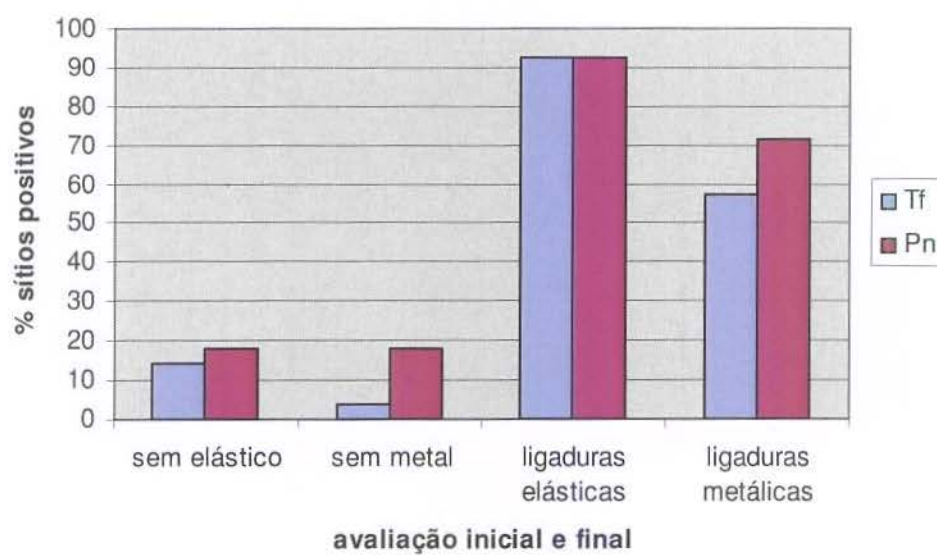
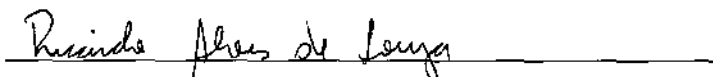


Figura A. Percentual de sítios positivos para microorganismos Tf e Pn, comparando os 2 métodos de amarração ortodôntica nos tempos inicial e após 6 meses.

DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado, intitulada "AVALIAÇÃO PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICA EM PACIENTES COM DOIS TIPOS DE LIGADURAS ORTODÔNTICAS", não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba, 03 de Outubro de 2006.



RICARDO ALVES DE SOUZA

RG Nº 532932587

AUTOR



MARIA BEATRIZ BORGES DE ARAÚJO MAGNANI

RG Nº 7798577

ORIENTADOR