

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tese de Doutorado

**ESTUDO PRÉ – CLÍNICO *IN VITRO* DO ACÚMULO DE *STREPTOCOCCUS*
MUTANS EM TRÊS DESENHOS DE CONTENÇÃO ORTODÔNTICA: ENSAIO
MICROBIOLÓGICO**

Marcelo de Moraes Curado

Brasília, 20 de junho de 2023

Marcelo de Moraes Curado

ESTUDO PRÉ – CLÍNICO *IN VITRO* DO ACÚMULO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*
EM TRÊS DESENHOS DE CONTENÇÃO ORTODÔNTICA: ENSAIO
MICROBIOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Sérgio Bruzadelli Macedo

Brasília, 2023

Marcelo de Moraes Curado

ESTUDO PRÉ – CLÍNICO *IN VITRO* DO ACÚMULO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM TRÊS DESENHOS DE CONTENÇÃO ORTODÔNTICA: ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 20 / 06 / 2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo (Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Sousa Gomes

Prof. Dr. Celso de Freitas Pedrosa Filho

Prof. Dr. Giovanni Modesto Vieira

Prof. Dr. Adriano Dobranszki

Dedico este trabalho a minha mãe (in memoriam) que sempre vibrou com minhas conquistas pessoais e profissionais! Que seus olhos brilhem ao ver todo esforço, tempo e dedicação desprendidos na busca deste título! Que a senhora se orgulhe dessa conquista! Muito obrigado por todo incentivo mãe! TE AMO INFINITAMENTE!

AGRADECIMENTO

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por sempre iluminar e abençoar cada passo dado ao longo da minha vida.

Agradeço imensamente ao meu amado pai que, com muito empenho e dedicação, me ensinou e me ensina valores morais e éticos que norteiam minha vida pessoal e profissional.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, que estiveram ao meu lado trazendo momentos de alegria e descontração. Às minhas primas – irmãs que são exemplos de força e fé. Ao meu sogro e minha sogra, que sempre vibraram a cada conquista. Amo todos vocês!

À minha esposa pelo apoio e incentivo incondicional nessa profissão que tanto amo. Você é o meu maior combustível nessa dura jornada de estudo, pesquisa, ensino e aprendizagem! Obrigado por estar ao meu lado me impulsionando. Te amo!

Às minhas filhas, Manuela e Marcela! Vocês são a razão da minha vida! Vocês são os amores da minha vida! Me sinto abençoado por ter vocês! Me desculpem por minha ausência durante esse período, mas cada passo meu, é dado pensando em um futuro melhor para vocês. Papai ama muito vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Bruzadelli Macedo, que conduziu meus passos e me acolheu calorosamente no projeto de Ozônio do HUB. O senhor tem o meu respeito e a minha admiração pelo profissionalismo, humildade e caráter! Muito obrigado por todo apoio!

À Universidade de Brasília por todo conhecimento transmitido! Aos funcionários e residentes do HUB e da UnB, bem como aos colegas. Agradeço especialmente ao funcionário Rafael Brasil pela disponibilidade e apoio durante a realização da pesquisa.

Aos queridos professores da banca de qualificação, com os quais pude aprender ainda mais e abrilhantar esse trabalho feito com tanto empenho e carinho.

Aos meus queridos alunos e à todos que de alguma forma participaram dessa conquista.

RESUMO

Introdução: Na arcada inferior, o uso de contenção fixa é frequente, embora sua presença aumente o acúmulo de biofilme e tártaro podendo trazer prejuízos ao periodonto. **Objetivo:** O objetivo desta pesquisa foi avaliar, *in vitro*, o acúmulo de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) em 3 desenhos de contenção fixa. **Método:** A partir de um único modelo da arcada dentária inferior, foram reproduzidos 9 modelos em resina acrílica termoativada e divididos em grupos: contenção reta (CR), contenção com alça vertical (CAV), contenção com alça horizontal (CAH) além de modelo normalizador em cada grupo. O acúmulo de *S. mutans* foi avaliado por meio do ensaio MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) e então mensurado com leitor automatizado. O experimento foi repetido independentemente até atingir o *n* de 16/grupo. **Resultado:** O grupo CAH apresentou menor acúmulo de biofilme, estatisticamente significativa, em relação aos demais grupos ($p < 0.05$). A distância entre a superfície dentária e a contenção mostrou forte correlação negativa com o acúmulo de biofilme ($r_s = -0,79$, $p = 0,00037$). **Conclusão:** A CAH apresentou acúmulo de *S. mutans* significativamente menor que os demais desenhos avaliados devido à distância entre a contenção e a superfície dentária. Esta pesquisa fornece dados relevantes para futuro estudo clínico randomizado.

Palavras-Chaves: Biofilme; Contenção fixa; Contenção ortodôntica; *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Introduction: The use of fixed retainers in the lower arch is frequent; however, its presence increases the accumulation of biofilm and dental calculus. **Objective:** The objective of this research was to evaluate, *in vitro*, the accumulation of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) in 3 designs of fixed retainers. **Method:** Nine models were reproduced in heat-cured acrylic resin and divided into groups: straight retainer (SR), retainer with vertical strap (RVL), retainer with horizontal strap (RHL). The accumulation of *S. mutans* was assessed using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and then measured using an automated reader. **Result:** The RHL group showed less biofilm accumulation compared to the other groups ($p < 0.05$). The distance between the tooth surface and the retainer showed a strong negative correlation with biofilm accumulation ($r_s = -0.79$, $p = 0.00037$). **Conclusion:** The RHL showed significantly less accumulation of *S. mutans* due to the distance between the retainer and the tooth surface. This research provides relevant data for a future randomized clinical trial.

Keywords: Biofilm; Fixed retainer; Orthodontic Retainer; *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 METODOLOGIA	12
3 RESULTADOS.....	18
4 DISCUSSÃO.....	22
5 CONCLUSÃO.....	26
6 REFERÊNCIAS.....	27
7 PRESS RELEASE.....	31

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios da ortodontia é a prevenção de movimentos dentários indesejados pós-tratamento.[1] As recidivas podem ocorrer devido à falta de equilíbrio das estruturas musculares, remodelação da cavidade glenóide e crescimento mandibular tardio, alterações no padrão respiratório ou no processo dento-alveolar que continuam a sofrer alterações fisiológicas em toda a vida adulta.[2,3]

As fibras periodontais ao redor dos dentes levam, em média, 232 dias para remodelar na nova posição dentária.[4] No entanto, mesmo que os dentes permaneçam em posição durante esse período, a longo prazo podem apresentar recidiva. É sabido que a ocorrência de recidiva ortodôntica e sua extensão são imprevisíveis.[2,5] Portanto, é sugerido que as contenções ortodônticas fiquem em posição por longos períodos, e, às vezes indefinidamente.[5–9]

Estudo com acompanhamento de 40 anos mostrou que, mesmo indivíduos que nunca utilizaram aparelho ortodôntico, apresentaram alterações dentárias como: diminuição do comprimento do arco devido à migração mesial fisiológica dos dentes, aumento do apinhamento e da mordida profunda. [3] Portanto, deve-se presumir que todo paciente está potencialmente sujeito a apresentar mudanças oclusais a longo prazo. [2]

Logo, a fase de contenção é considerada etapa fundamental do tratamento ortodôntico, visto que é recomendada a utilização de algum tipo de contenção afim de evitar a recidiva ortodôntica e o apinhamento secundário.[8] As contenções ortodônticas fixas são usualmente confeccionadas com fio de aço,[1,10,11] em diferentes espessuras e desenhos, [1] sendo fixadas, preferencialmente, nos seis dentes anteriores.[12,13]

O primeiro desenho de contenção fixa descrito foi a barra lingual de canino a canino inferior, sendo indicada como parte integrante do tratamento ortodôntico nos Estados Unidos na década de 1970, como um elemento ortodôntico fixo pós-tratamento.[6] A impossibilidade de acesso do fio dental culminou em novo

desenho de contenção, apresentado em 1989,[14] que propôs um modelo com curvaturas / alças nas porções interproximais direcionados a região cervical, cruzando a papila interdental.[15] Entretanto, o maior acúmulo de biofilme neste último modelo serviu de inspiração para novo desenho de contenção que apresenta curvaturas / alças paralelas ao plano oclusal, que possibilitam o acesso do fio dental até o interior do sulco gengival.[16–18]

Embora as contenções ortodônticas fixas sejam utilizadas há décadas na prática clínica, a seleção do melhor protocolo de tratamento continua sendo uma questão subjetiva. Não existe evidência de alta qualidade relacionada ao regime de uso e ao desenho ideal de contenção a ser utilizada,[2] nem mesmo há uma abordagem universal mais adequada.[8,19,20]

Apesar da baixa evidência, revisão sistemática aponta para a incerteza dos resultados periodontais com o uso prolongado de contenções fixas, bem como assinala que o acúmulo de biofilme é diferente nos distintos desenhos de contenção.[21] A maioria dos ortodontistas e periodontistas acreditam que, quando comparada à contenção reta (CR), a contenção com alça vertical (CAV) acumula maior quantidade de biofilme e promove maior dano ao periodonto devido à dificuldade de higienização.[9]

O *S. mutans* está abundantemente presente na saliva humana[22] e é um dos microrganismos mais resistentes.[23] Esta bactéria tem a habilidade de aderir à superfície dentária, sendo uma reconhecida colonizadora de superfícies lisas. Ademais, é o primeiro microrganismo a colonizar a superfície dentária e formar a base para adesão dos demais microrganismos presentes da cavidade bucal possam proliferar.[24] Portanto, o *S. mutans* é rotineiramente associado à cárie[25] e a formação do biofilme dental.[26]

Tanto ortodontistas quanto periodontistas concordam que os diferentes desenhos de contenção fixa acumulam quantidades distintas de biofilme, sendo que acreditam que a CR é o desenho que apresenta menor acúmulo. [9] Entretanto, não há avaliação comparativa referente ao acúmulo de *Streptococcus mutans* em diferentes desenhos de contenção fixa. Por isso, o objetivo deste estudo foi comparar, *in vitro*, o acúmulo de *S. mutans* em diferentes desenhos de contenção ortodôntica fixa.

Hipótese nula

Não há diferença significativa no acúmulo de *S. mutans in vitro* entre diferentes desenhos de contenção ortodôntica fixa.

2 METODOLOGIA

O presente estudo *in vitro* foi realizado de acordo com as diretrizes fornecidas pelo CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies).[27]

2.1 AMOSTRA

Para determinação do *n* desta pesquisa, foi utilizado o *n* padrão para estudos *in vitro* com MTT[28–30], que é igual a 6, incluindo perdas. Para aumentar a força do estudo, utilizamos *n*=16.

A partir de um único manequim do arco inferior (região anterior) com bom alinhamento dentário, 9 modelos de resina acrílica (Vipi Cril plus-VIPI, SP, Brasil) foram reproduzidos por um único operador experiente.

Os modelos de resina acrílica foram igualmente polidos a fim de alcançar baixa rugosidade superficial adequada para não interferir no acúmulo de biofilme ($\leq 2\mu\text{m}$).[31] O polimento foi realizado com o auxílio da máquina de polimento com disco de musseline (Bordente, São Paulo/SP, Brasil) e pó de branco de Espanha (Asfer, São Caetano do Sul/SP, Brasil) com água.[32]

Os modelos foram distribuídos aleatoriamente para os três grupos padronizados de maneira que cada grupo foi composto por dois modelos da mesma contenção ortodôntica fixa e um modelo normalizador sem contenção. Os desenhos de contenções utilizados nesta pesquisa foram: reta (CR)[6], com alça vertical (CAV).[14,15] e com alça horizontal (CAH).[16–18] (Figura1)

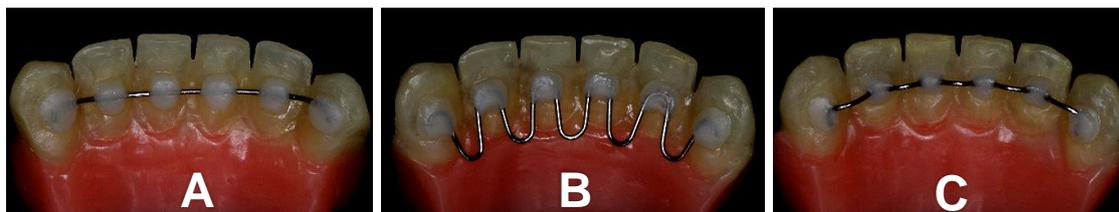


Figura 1 – Modelos de contenção ortodôntica: A – reta (CR), B – com alça vertical (CAV) e C – com alça horizontal (CAH).

Todos as contenções foram feitas com fio ortodôntico de aço inoxidável de 0,5 mm / 0,0195 polegadas (Morelli, Sorocaba, SP), por um único operador experiente seguindo as referências técnicas sugeridas por seus idealizadores.[6,14,16] O comprimento do fio utilizado na confecção das contenções ortodônticas foi o mesmo para cada grupo (CR, CAV e CAH), medido com régua milimetrada. Os comprimentos utilizados foram: 32, 79 e 43 mm para as contenções CR, CAV e CAH, respectivamente (Figura 2). As contenções foram produzidas utilizando os alicates: 139, Nance e corte.

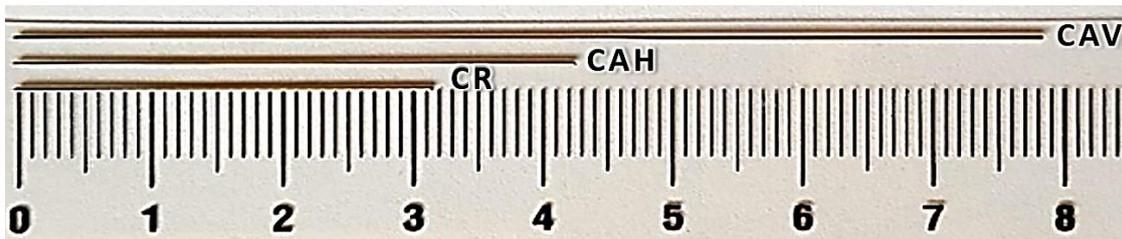


Figura 2 – Comprimento dos fios ortodônticos utilizados para confecção das contenções: reta (CR), com alça vertical (CAV) e com alça horizontal (CAH).

O procedimento de fixação de cada da contenção foi realizado pelo mesmo operador com o auxílio de uma balança eletrônica de precisão (Marca 214A, Bel, Piracicaba, SP, Brasil). Foram utilizados 7mg de resina (resina Z100, 3M, Maplewood, Minnesota, EUA) para fixação da contenção em cada um dos seis dentes anteriores nos modelos com contenção, bem como nos modelos sem contenção (normalizador). Como o posicionamento da contenção fixa, seja mais coronário ou cervical, parece não afetar a ocorrência de sintomas nos tecidos periodontais,[33] o centro da coroa clínica dos seis dentes anteriores inferiores [16], por lingual, foi definido como o sítio de instalação da resina em todos os nove modelos. (Figura 3)

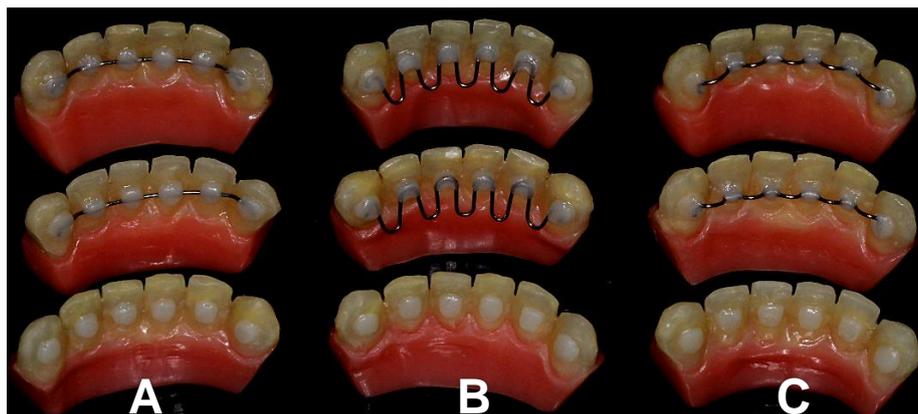


Figura 3 – Grupos CR (A), CAV (B) e CAH (C). Cada grupo contendo duas contenções (mesmo desenho) e um modelo normalizador. Mesma quantidade de resina composta em todos os dentes.

As distâncias entre as porções livres (não fixadas) do fio ortodôntico à superfície dentária dos modelos foram medidas utilizando paquímetro digital (MPD-300, Instrutherm, São Paulo, Brasil). As mensurações foram realizadas entre as regiões interproximais: do ponto de contato até a contenção (CR e CAH) e, da mucosa até o fio ortodôntico (CAV) de maneira perpendicular à contenção. (Figura 4 e 5) As mensurações foram realizadas nas cinco regiões interproximais (mesial de canino a mesial do canino contralateral) e foi utilizada a média aritmética obtida para cada contenção. Os dados foram exportados para planilha do Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)



Figura 4 – Mensuração da distância entre superfície dentária até a contenção nos diferentes desenhos: CR (A), CAV (B) e CAH (C).

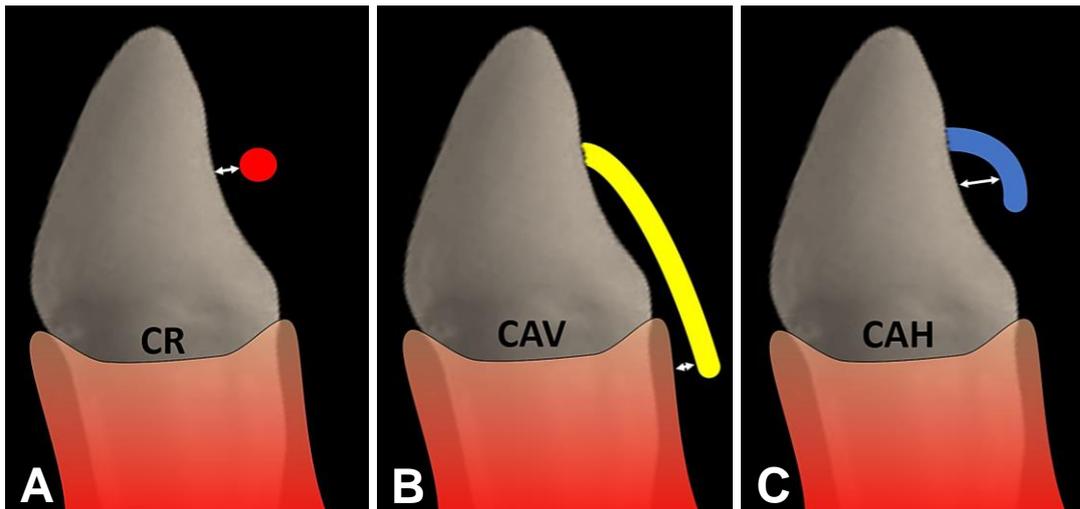


Figura 5 – Esquema ilustrando a mensuração da distância entre as porções livres (não cobertas por resina) do fio ortodôntico e a superfície dentária dos modelos: CR (A), CAV (B) e CAH (C) – vista interproximal.

2.2 CONDIÇÕES CULTURAIS DE *S. MUTANS*

A cepa de *S. mutans* ATCC 25175 (Manassas, VA, EUA) foi utilizada para a formação de biofilme nos modelos de contenção (CR, CAV e CAH). Os microrganismos foram cultivados em *Brain Heart Infusion* (BHI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Amostras pré-cultura *S. mutans* foram distribuídas em tubos Falcon® de 50 ml (Corning, Painted Post, NY, USA) contendo as amostras com e sem contenção, em uma concentração inicial de 2×10^4 unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/ml), em um volume de 35ml (Figura 6). As amostras foram incubadas a 37°C durante 48 horas antes do ensaio MTT (Figura 7).



Figura 6 – Amostra de contenção sendo incubada no tubo Falcon contendo *S. mutans* a 37 °C, 48 horas.



Figura 7 – Amostras com e sem contenção incubadas nos tubos Falcon contendo *S. mutans* a 37 °C, 48 horas.

2.3 ENSAIO MTT

O ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) baseia-se na redução de sal tetrazólico por enzimas, formando um composto roxo solúvel chamado formazan.[34] A análise quantitativa de formazan é um método colorimétrico rápido e usado com frequência para avaliar a viabilidade celular e mensuração da proliferação celular. [28,29] Trata-se de um ensaio de atividade metabólica que permite a quantificação de microrganismos vivos.

Após a incubação das amostras por 48 horas na cultura *S. mutans*, estas foram assepticamente transferidas para tubos Falcon® (Corning) de 50 ml contendo 0,55mg/ml de MTT em PBS (sterile phosphate-buffered saline) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e as amostras foram então incubadas por 4 horas adicionais na incubadora a 37°C. A redução do sal MTT produzido pelo metabolismo de microrganismos viáveis forma os cristais violetas. Os cristais de formazan das amostras foram solubilizados com lavagens sucessivas utilizando álcool isopropílico acidificado (álcool isopropílico, 0,04N HCl, Sigma-Aldrich). O soluto obtido representa a quantidade de organismos viáveis que estava aderido em cada amostra.

Devido à impossibilidade de cegamento no momento da contagem celular, optou-se pelo método de contagem automatizado. O soluto de cada amostra foi plaqueado para mensuração da absorbância por meio do ensaio colorimétrico

(MTT). A leitura das placas foi realizada utilizando um leitor automatizado de microplacas (SpectraMax384 Plus, Molecular Devices, Sunnyvale – CA, USA) na Densidade Ótica (DO) de 570nm. [28]

O ensaio MTT foi repetido independentemente até alcançar n=16/grupo. Antes de cada repetição, as amostras foram higienizadas de maneira igualitária, por meio de lavagem com sabão enzimático (Zymedet Gold 5-E, ProLink, Guapiaçu, Brasil), esterilização com ciclo padrão da autoclave (Vitale Class, Cristófoli, Paraná, Brasil) e novo processo de polimento.

A DO de cada amostra com contenção foi normalizada através da subtração da DO do modelo com contenção pela DO média dos modelos sem contenção (normalizadores) ($DO = DO_{\text{com contenção}} - DO_{\text{média normalizadores}}$). Os dados foram exportados para planilhas do Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) e submetidos à análise estatística.

2.4 TESTES ESTATÍSTICOS

Os dados foram submetidos à análise estatística de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e análise de variância, ANOVA unidirecional com análise de grupos (Bonferroni pós-teste). Os resultados foram considerados significativos com $p < 0,05$. A associação entre "o comprimento do fio ortodôntico e a formação de biofilme (DO)" e "a distância das superfícies dentárias e a formação de biofilme", foram avaliadas pela Correlação de Pearson. O programa estatístico utilizado foi o STATA IC 17.0 (StataCorp, College Station, TX, USA).

3 RESULTADOS

3.1 BIOFILME *S. MUTANS*

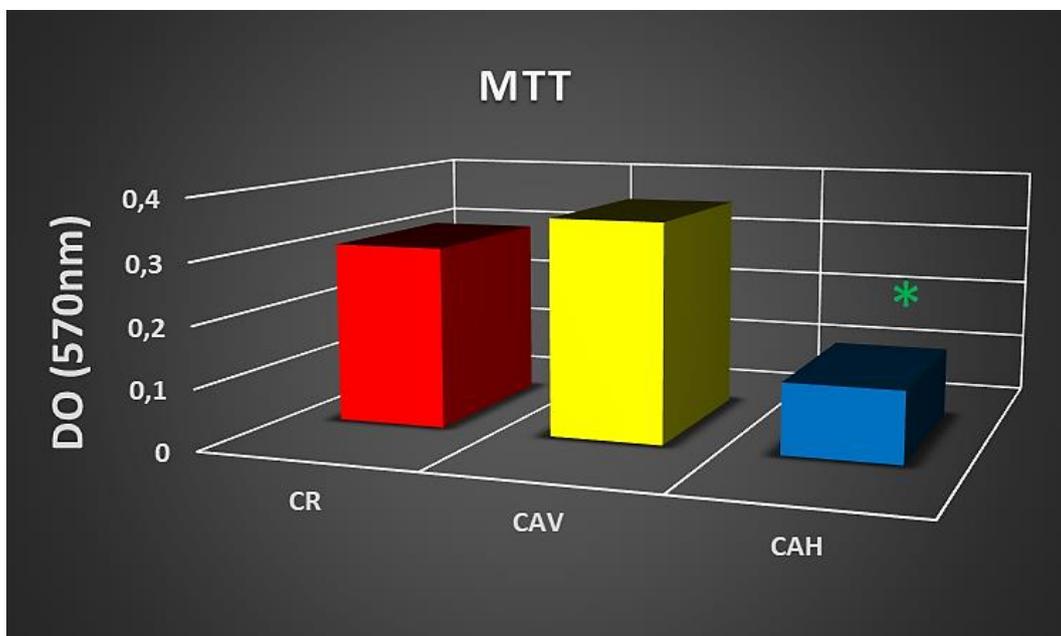
O biofilme de *S. mutans* foi detectado em todas as amostras com contenção (CR, CAL e CAH), bem como nos modelos normalizadores. Na tabela 1 são descritos os valores da DO, em nanômetros (nm), de cada amostra com contenção após a normalização. O grupo que apresentou maior DO foi o CAV enquanto o grupo CAH mostrou menor DO, o que representa uma redução significativa do biofilme metabólico ativo no grupo CAH, quando comparado aos demais grupos (CR e CAV). (Tabela 1)

Tabela 1 – Valor normalizado de MTT ativo de biofilme de *S. mutans* (DO em nm) nos diferentes desenhos de contenção (CR, CAV e CAH). Desvio padrão (0,1189nm – CAV; 0,0835nm – CR; e 0,0513nm – CAH)

Amostra Grupo	CR (DO em nm)	CAV (DO em nm)	CAH (DO em nm)
1	0,215	0,298	0,164
2	0,261	0,267	0,182
3	0,251	0,261	0,070
4	0,228	0,243	0,156
5	0,204	0,541	0,109
6	0,264	0,326	0,169
7	0,222	0,357	0,093
8	0,208	0,308	0,072
9	0,465	0,286	0,019
10	0,375	0,500	0,064
11	0,412	0,563	0,154
12	0,340	0,563	0,100
13	0,359	0,310	0,071
14	0,354	0,259	0,129
15	0,357	0,286	0,188
16	0,215	0,298	0,164

A média do acúmulo de biofilme ativo nos três grupos foi de: 0,3577nm, 0,3009nm e 0,1160nm para os grupos CAV, CR e CAH respectivamente. O desvio-padrão foi de: 0,1189nm (CAV), 0,0835nm (CR) e 0,0513nm (CAH). Ou seja, a proliferação celular foi significativamente maior nos grupos CR e CAV, quando comparados com o grupo CAH. (Gráfico1)

Gráfico 1 – MTT ativo de biofilme de *S. mutans* nos diferentes desenhos de contenção. “*” representa significância estatística entre os grupos ($p < 0.05$): CR, CAV e CAH.



De acordo com o cálculo da força deste estudo, um $n=2$ seria o suficiente para um alfa de 5% e força de 80%, mas como o n utilizado foi de 16, a força do nosso estudo foi de 100% com alfa de 5%.

3.2 CORRELAÇÃO ENTRE O ACÚMULO DE BIOFILME E A DISTÂNCIA DA CONTENÇÃO AS ESTRUTURAS DENTÁRIAS

Os valores da distância entre a superfície dentária e o fio ortodôntico foram de: 1,3354mm, 0,3751mm e 2,6823mm para os grupos CR, CAV e CAH respectivamente com desvio-padrão de: 0,0923mm (CR), 0,0980mm (CAV) e 0,2290mm (CAH). A correlação entre a distância da contenção a superfície dentária e o acúmulo do biofilme *S. mutans* (MTT) foi fortemente negativa ($r_s = -0,79$, $p = 0,00037$) indicando que a proximidade da contenção com o dente acarreta maior acúmulo de biofilme. (Gráfico 2) Os valores da DO mensurados ao final do ensaio MTT, ou seja, previamente à normalização, ilustram a forte correlação negativa entre as duas variáveis. (Gráfico 3)

Gráfico 2 – Distância (mm) da contenção à estrutura dentária (média \pm Desvio padrão). Correlação de Pearson ($r_s = -0.79$, $p < 0.05$).

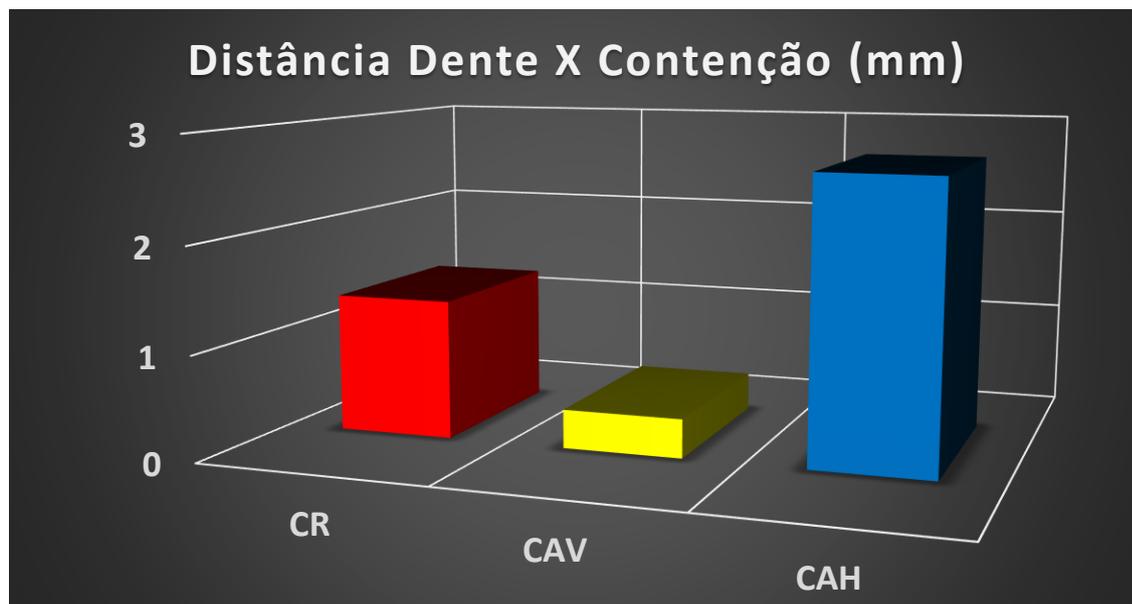
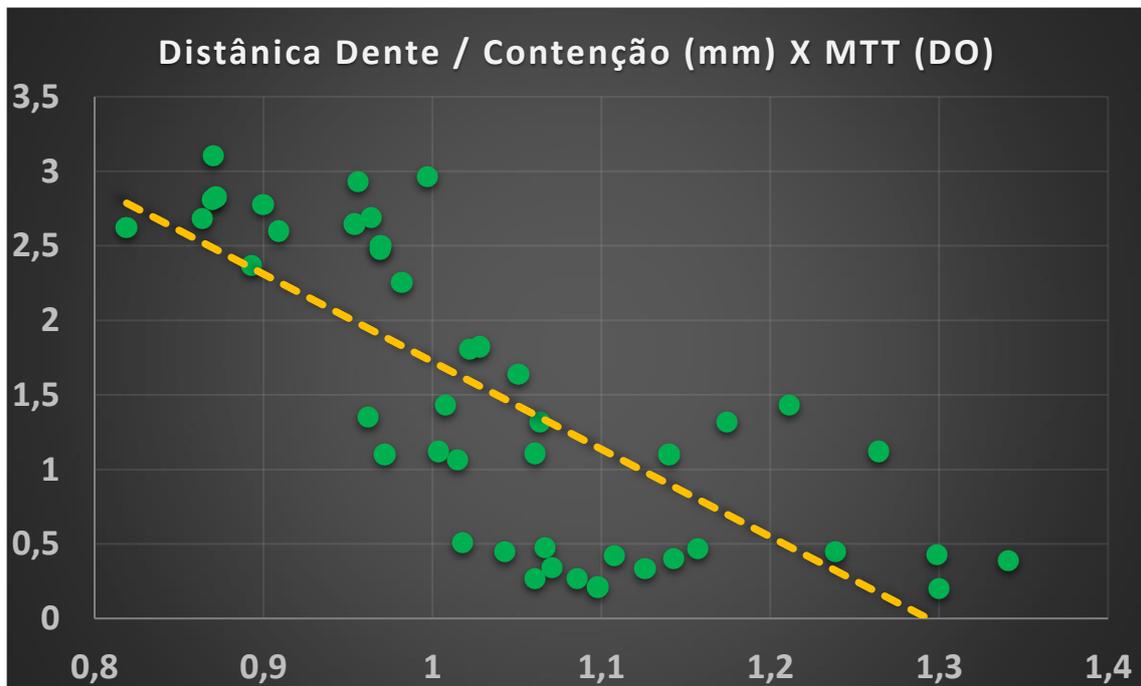


Gráfico 3 – Gráfico de dispersão mostrando a correlação entre o acúmulo de biofilme (MTT) e a distância entre as estruturas dentárias. Correlação de Pearson ($r_s = -0.79$, $p < 0.05$).



3.3 CORRELAÇÃO ENTRE O ACÚMULO DE BIOFILME E O COMPRIMENTO DO FIO ORTODÔNTICO

A correlação entre o comprimento do fio ortodôntico e a formação de biofilme ativo foi significativa, porém fraco positivo ($r_s = 0,33$, $p = 0,0287$).

4 DISCUSSÃO

Essa é a primeira pesquisa que incluiu a CAH no grupo teste, talvez por se tratar de um desenho de contenção relativamente recente e devido ao limitado número de publicações.[16–18] Para nosso conhecimento, até o presente momento, nenhuma pesquisa *in vitro* foi realizada com foco no acúmulo de biofilme em diferentes desenhos de contenção fixa. Nossos resultados corroboram os achados relacionados ao menor acúmulo de biofilme na CR quando comparada com a CAV.[35,36] Resultados igualmente observados na opinião da maioria dos periodontistas e ortodontistas, que afirmam que o menor acúmulo de biofilme acontece na CR quanto comparado ao CAV.[9] Entretanto, neste estudo, o terceiro grupo (CAH) apresentou acúmulo de *S. mutans* (biofilme) significativamente menor que os outros desenhos (CR e CAV). Ademais, esse é o primeiro trabalho que levanta a hipótese de que a distância entre o dispositivo e a superfície dentária pode ser relevante na diminuição do acúmulo de biofilme na contenção ortodôntica com forte associação ($r_s = -0.79$, $p < 0.05$).

Dispositivos instalados na lingual dos dentes alteram a fala e o conforto oral[37,38], sendo que dispositivos com menor perfil apresentam alterações menos pronunciadas.[37] A CR é descrita como sendo mais confortável que a CAV. [9,35,36] Devido ao maior perfil da CAH, acredita-se que este desenho de contenção apresente maior alteração na fala e no conforto que os demais desenhos (CR e CAV). Entretanto, alterações na fala e conforto são maiores no momento da instalação[37,38] com diminuição significativa nas primeiras 24h de uso.[37]

Acredita-se que o conforto da CAH seja semelhante ao do esporão lingual, que mostra adaptação com uma semana ou menos, além de boa aceitação. [39] O esporão lingual é utilizado para o tratamento da mordida aberta anterior com notável estabilidade após 3 anos.[40] Portanto, devido à semelhança entre o perfil do esporão e da CAH, este desenho de contenção pode apresentar ação similar à do esporão atuando na manutenção da postura e função da língua, inclusive potencializando a estabilidade da correção da mordida aberta anterior.

A função primordial das contenções ortodônticas é a manutenção da posição dentária após o término do tratamento ortodôntico. Recente metanálise mostra que as contenções, removíveis e fixas, são eficazes para essa finalidade, entretanto, as contenções fixas são mais eficientes do que as removíveis.[41]

Contudo, visto que as contenções fixas são utilizadas por longos períodos ou mesmo indefinidamente,[5–9] pela ótica da periodontia, esses dispositivos são fatores de retenção de biofilme. A contenção ortodôntica fixa dificulta o uso de fio dental, favorece o desenvolvimento da cárie e a presença de cálculo periodontal.[3,4,42,43] A CR, colada em todos os dentes, apresenta difícil acesso do fio dental na região interproximal, mas permite acesso no interior do sulco gengival. A CAV evidencia livre acesso na região interproximal[15] embora não no interior sulco gengival.[36] A CAH é o único desenho que possibilita acesso do fio dental tanto na região interproximal quanto no interior do sulco gengival.[16,18]

Embora distintos estudos, incluindo revisões sistemáticas e metanálise, afirmem que o uso de contenção fixa não apresenta efeito negativo na condição periodontal do paciente,[13,42] diferentes desenhos de contenção apresentam quantidades distintas de acúmulo de biofilme.[11,31,35,36] De acordo com a correlação de Pearson, quanto menor a distância entre fio e a superfície dentária, maior será o acúmulo de biofilme ($r_s = -0,79$) conforme observado neste estudo (CR e CAV). A CAH permanece distante da superfície dentária, o que dificulta a adesão bacteriana e permite que, tanto o profissional quanto o próprio paciente, façam a completa remoção do tártaro e biofilme aderidos ao redor do dispositivo.[16,18]

O maior comprimento do fio é associado ao maior acúmulo de cálculo na contenção.[9,35,36] Neste estudo, apesar de estatisticamente significativa, a correlação entre o comprimento do fio e acúmulo de biofilme (MTT) foi fraca, o que pode representar significado clínico irrelevante. Portanto, são necessários futuros estudos clínicos para esclarecer esse ponto.

Por se tratar de ambiente altamente controlado, nosso estudo permitiu a eliminação de fatores confundidores como: a utilização de um único modelo, quantidade padronizada de resina utilizada em cada dente, mesma espessura do fio e presença de grupo normalizador (sem contenção). A escolha da

espessura do fio utilizado se deve ao fato de que fios com menor espessura não apresentam efeito significativo na saúde periodontal.[44] A presença do grupo controle sem contenção foi utilizada em estudo clínico para eliminação de fatores confundidores,[45] de maneira semelhante, neste estudo, ocorreu com a inclusão de grupo normalizador com resina e sem contenção. Dessa forma, os resultados observados podem ser atribuídos apenas à diferença entre os desenhos de cada contenção.

Outros materiais são uma alternativa para contenções fixas como: fio trançado e compósitos reforçados com fibra de vidro. Ainda que os fios trançados apresentem fácil confecção e baixo custo, devido a rugosidade de superfície, apresentam maior índice de placa quando comparado ao fio de aço liso.[46] Os compósitos reforçados com fibra de vidro são bem indicados para paciente alérgicos ao Níquel e por ser uma opção estética. Outra vantagem está relacionada ao uso de nanotecnologia nesse tipo de contenção pois permite a incorporação de nanohidroxiapatita[47] e partículas de prata[48] em sua composição, acrescentando propriedade antimicrobiana à contenção.[48] Entretanto, a escovação promove desgastes e compromete mecanicamente os compósitos reforçados com fibra de vidro, quando comparado a contenções metálicas. Ademais, contenções de aço inoxidável são mais flexíveis e permitem movimentos de maior magnitude que os compósitos reforçados com fibra de vidro. [49]

Como limitação desse estudo, podemos citar avaliação apenas *in vitro*. O *S. mutans* é um modelo frequentemente utilizado para o estudo da adesão/acúmulo de biofilme[50] e, portanto, deve mostrar diferenças no acúmulo de biofilme nos diferentes desenhos de contenção. Embora não seja possível a extrapolação dos nossos resultados para situações *in vivo*, esse estudo lança a hipótese de que os resultados obtidos a partir de futuro estudo clínico randomizado, serão ainda mais robustos devido a possibilidade de higienização *in vivo*. Outra limitação foi a utilização de um único material para confecção das contenções. Fios trançados e Compósitos reforçados com fibra de vidro poderiam ter sido utilizados para avaliar também o acúmulo de *S. mutans* em diferentes materiais. Entretanto, os dois tipos de contenção citados, apresentam desenho semelhante à CR, o que impossibilita o acesso do fio dental no interior

do sulco e apresentam maior proximidade com a superfície dentária, resultando em provável aumento no acúmulo de biofilme, conforme observado neste estudo. Ademais, recente estudo microbiológico avaliou o acúmulo de biofilme em diferentes desenhos de bráquetes com rugosidades distintas e concluiu que o desenho do bráquete pode sobrepor a rugosidade da superfície,[51] o que reforça nossos achados. Contudo, estudos futuros são necessários para avaliar o comportamento dos distintos materiais frente ao acúmulo de biofilme.

Os dados dessa pesquisa podem ser utilizados com cunho didático para auxiliar tanto o paciente quanto o clínico na escolha do desenho de contenção em relação ao acúmulo de *S. mutans* (biofilme), bem como, quanto à importância da higiene bucal nessa região. O que é corroborado por estudo clínico que mostra que a manutenção de adequada higiene bucal melhora a condição periodontal.[45]

A literatura é inconclusiva a respeito do desenho ideal para a contenção ortodôntica[2] bem como qual abordagem universal ideal.[8,19,20] Portanto, este trabalho fornece dados relevantes para futuro ensaio clínico randomizado. A partir da tabela 1 foi calculado o tamanho do efeito e, em seguida, utilizando o programa GPower 3.1,[52] foi obtido o n total de 36 para $\alpha=5\%$ e força de 80%. Acrescentando 10% de perda, tem-se n total igual a 40. Ou seja, para ensaio clínico randomizado, o n necessário em cada um dos 3 grupos do estudo é de 14 indivíduos com força de 81,72%.

5 CONCLUSÃO

A hipótese nula foi rejeitada visto que os três desenhos de contenção apresentaram quantidades distintas de *S. mutans in vitro*, sendo que, a CAH mostrou acúmulo de *S. mutans* significativamente menor que os demais desenhos. A redução no acúmulo de biofilme na CAH mostrou forte significância estatística devido à maior distância entre o fio ortodôntico e a superfície dentária. Ademais, este estudo apresentou dados relevantes para futuro estudo clínico randomizado a fim de aferir os resultados obtidos *in vitro*.

6 REFERENCIAS

1. Littlewood SJ, Dalci O, Dolce C, Holliday LS, Naraghi S. Orthodontic retention: what's on the horizon? *Br Dent J*. 2021; 230(11): 760–764.
2. Littlewood SJ, Kandasamy S, Huang G. Retention and relapse in clinical practice. *Aust Dent J*. 2017; 62; 51–57.
3. Tsiopas N, Nilner M, Bondemark L, Bjerklin K. A 40 years follow-up of dental arch dimensions and incisor irregularity in adults. *Eur J Orthod*. 2013; 35(2): 230–235.
4. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod*. 1967; 53(10): 721–745
5. Littlewood SJ, Millett DT, Doubleday B, Bearn DR, Worthington H v. Orthodontic retention: A systematic review. Vol. 33, *Journal of Orthodontics*. 2006; 33(3); 205–212.
6. Knierim R. Invisible Lower cuspid to cuspid retainer. *Knierim* 1973. *Angle Orthodontist*. 1973; 43(2): 218–220.
7. Little RM, Wallen TR, Riedel RA. Stability and relapse of mandibular anterior alignment-first premolar extraction cases treated by traditional edgewise orthodontics. *Am J Orthod*. 1981; 80(4): 349–365.
8. Littlewood SJ, Millett DT, Doubleday B, Bearn DR, Worthington H v. Retention procedures for stabilising tooth position after treatment with orthodontic braces. Vol. 2016, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016; 1: CD002283. doi: 10.1002/14651858.CD002283.pub4.
9. COSTA RSM da, VEDOVELLO SAS, FURLETTI-GÓES VF, CUSTODIO W, VENEZIAN GC. Orthodontist and periodontist's knowledge, attitudes and aspects of clinical practice, regarding fixed lower orthodontic retainers. *Dental Press J Orthod [Internet]*. 2021; 26(4): 2119276. doi: 10.1590/2177-6709.26.4.e2119276.oar.
10. Geramy A, Retrouvey JM, Sobuti F, Salehi H. Anterior Teeth Splinting After Orthodontic Treatment: 3D Analysis Using Finite Element Method. *J Dent (Tehran)*. 2012; 9(2): 90–98.
11. Beckett HA, Evans RD, Gilmour AG. Permanent retention in orthodontic patients with reduced levels of bone support: A pin stabilised resin bonded splint. *Br Dent J*. 1992; 173(8): 272–274.
12. Moda LB, da Silva Barros ALC, Fagundes NCF, Normando D, Maia LC, dos Anjos Mendes SM. Lower fixed retainers: Bonded on all teeth or only on canines? A systematic review. *Angle Orthodontist*. 2020; 90(1): 125–143.
13. Jedliński M, Grocholewicz K, Mazur M, Janiszewska-Olszowska J. What causes failure of fixed orthodontic retention? – systematic review and meta-analysis of clinical studies. *Head and Face Medicine*. BioMed Central Ltd; 2021; 17: 32. doi: 10.1186/s13005-021-00281-3.
14. Lew kkk. Directed bonded lingual retainer. *Journal of Clinical Orthodontics* . 1989; 23(7): 490–491.

15. Bicalho JS, Bicalho KT. Descrição do método de contenção fixa com o livre acesso do fio. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*. 2001; 6(5): 97–104.
16. Curado M de M, Queiroz KL de, Guimarães MAC, Suzuki H, Garcez Segundo AS. Novo desenho para a contenção ortodôntica 3x3 fixa. *Orthoscience Practice*. 2015; 8(32): 542–551.
17. de Castro Ribeiro TT, Garib DG, de Medeiros Alves AC, Carvalho Lauris R de CM, Raveli DB. Contenção ortodôntica fixa lingual inferior 3x3 com V-bend. *Rev. Clínica Orto. Dental Press*. 2016; 15(1): 91–97.
18. Curado M de M, Maia AP de M, Minervino BLM. Acúmulo de biofilme na contenção Curado. *Orthod. Sci. Pract.* 2017; 10(40):66–75.
19. César Neto JB, Régio MRS, Martos J, Spautz F, Moraes GB de. Analysis of the periodontal status of patients with mandibular-bonded retainers. *Revista Odonto Ciência (Online)*. 2010; 25(2): 132–136.
20. Padhraig S. Fleming and Simon J. Littlewood. Orthodontic retention - a final frontier. 2021 littlewood. *Br Dent J*. 2021; 230(11): 685. doi: 10.1038/s41415-021-3017-9.
21. Joss-Vassalli I, Grebenstein C, Topouzellis N, Sculean A, Katsaros C. Orthodontic therapy and gingival recession: A systematic review, *Orthodontics and Craniofacial Research*. 2010; 13(3): 127–141.
22. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology Principles of microbial ecology. 2005; 38: 135–187. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x.
23. Goodson JM, Hartman ML, Shi P, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, et al. The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0170437.
24. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113(6): E791-800. doi: 10.1073/pnas.1522149113.
25. Achtman M, Zhou Z. Metagenomics of the modern and historical human oral microbiome with phylogenetic studies on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2020; 375(1812): 20190573.
26. Wang BY, Alvarez P, Hong J, Kuramitsu HK. Periodontal pathogens interfere with quorum-sensing-dependent virulence properties in *Streptococcus mutans*. *J Periodontal Res*. 2011; 46(1): 105–110.
27. Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *Journal of Conservative Dentistry*. 2014; 17(4): 301–304.
28. Santiago MC, Gomes-Cornélio AL, de Oliveira LA, Tanomaru-Filho M, Salles LP. Calcium silicate-based cements cause environmental stiffness and show diverse potential to induce osteogenesis in human osteoblastic cells. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 16784. doi: 10.1038/s41598-021-96353-0.

29. Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod.* 2012; 38(7): 971–976.
30. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2017; 50(1): 39–47.
31. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials.* 1997; 13(4): 258–259.
32. Bragança A, Simões F, Gomes M, Minervinom B, Curado M. Estudo *in vitro* da rugosidade superficial de resina acrílica na orto. *Rev Clín Ortod Dental Press.* 2020; 19(1): 72–80.
33. Levin L, Samorodnitzky-Naveh GR, Machtei EE. The Association of Orthodontic Treatment and Fixed Retainers With Gingival Health. *J Periodontol.* 2008; 79(11): 2087–2092. doi: 10.1902/jop.2008.080128.
34. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1–2): 55–63.
35. Lukiantchuki M, Hayacibara R, Ramos A. Comparação de parâmetros periodontais após utilização de contenção Ortodôntica com fio trançado e contenção. *Dental Press J Orthod.* 2011; 16(4): 44e1–7.
36. Shirasu BK, Hayacibara RM, Ramos AL. Comparação de parâmetros periodontais após utilização de contenção convencional 3x3 plana e contenção modificada. *Maringá.* 2007; 12(1): 41–47.
37. Hohoff A, Stamm T, Goder G, Sauerland C, Ehmer U, Seifert E. Comparison of 3 bonded lingual appliances by auditive analysis and subjective assessment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2003; 124(6): 737–745.
38. Khattab TZ, Farah H, Al-Sabbagh R, Hajeer MY, Haj-Hamed Y. Speech performance and oral impairments with lingual and labial orthodontic appliances in the first stage of fixed treatment. *Angle Orthodontist.* 2013; 83(3): 519–526.
39. Canuto LFG, Janson G, de Lima NS, de Almeida RR, Caçado RH. Anterior open-bite treatment with bonded vs conventional lingual spurs: A comparative study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2016; 149(6): 847–855.
40. Dias FA, Oltramari PVP, Almeida MR de, Conti AC de CF, Almeida RR de, Fernandes TMF. Stability of early anterior open bite treatment: a 2-year follow-up randomized clinical trial. *Braz Dent J.* 2021; 32(3): 116–26.
41. Giudice A lo, Isola G, Rustico L, Ronsivalle V, Portelli M, Nucera R. The Efficacy of Retention Appliances after Fixed Orthodontic Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Applied Sciences (Switzerland).* MDPI AG; 2020; 10(9): 3107.
42. Salvesen BF, Grytten J, Rongen G, Koldslund OC, Vandevska-Radunovic V. Periodontal status in long-term orthodontic retention patients up to 10 years after treatment—a

- cross-sectional study. *Acta Odontol Scand.* 2021; 79(8): 623–629. doi: 10.1080/00016357.2021.1921842. Epub 2021 May 10.
43. Al-Moghrabi D, Pandis N, Fleming PS. The effects of fixed and removable orthodontic retainers: a systematic review. *Progress in Orthodontics.* Springer Berlin Heidelberg. 2016; 17(1): 24. doi: 10.1186/s40510-016-0137-x.
 44. Adanur-Atmaca R, Çokakoglu S, Öztürk F. Effects of different lingual retainers on periodontal health and stability. *Angle Orthodontist.* 2021; 91(4): 468–476.
 45. Juloski J, Glisic B, Vandevska-Radunovic V. Long-term influence of fixed lingual retainers on the development of gingival recession: A retrospective, longitudinal cohort study. *Angle Orthodontist.* 2017; 87(5): 658–664.
 46. Ferreira LA, Sapata DM, Provenzano MGA, Hayacibara RM, Ramos AL. Periodontal parameters of two types of 3x3 orthodontic retainer: A longitudinal study. *Dental Press J Orthod.* 2019; 24(3): 64–70.
 47. Khan AS, Alshaia A, Aldubayan A, Alarifi S, Alamri A, Aldossary H, et al. Preparation of Nano-Apatite Grafted Glass-Fiber-Reinforced Composites for Orthodontic Application: Mechanical and *In Vitro* Biofilm Analysis. *Materials.* 2022; 15(10): 3504. doi: 10.3390/ma15103504.
 48. Mirhashemi A, Bahador A, Sodagar A, Pourhajibagher M, Amiri A, Gholamrezayi E. Evaluation of antimicrobial properties of nano-silver particles used in orthodontics fixed retainer composites: An experimental in-vitro study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2021; 15(2): 87–93. doi: 10.34172/joddd.2021.015.
 49. Ohtonen J, Lassila L, Säilynoja E, Vallittu PK. The effect of material type and location of an orthodontic retainer in resisting axial or buccal forces. *Materials.* 2021; 14(9): 2319. doi: 10.3390/ma14092319.
 50. Oliveira DC, Thomson JJ, Alhabeil JA, Toma JM, Plecha SC, Pacheco RR, et al. *In vitro* *Streptococcus mutans* adhesion and biofilm formation on different esthetic orthodontic archwires. *Angle Orthodontist.* 2021; 91(6): 786–793. doi: 10.2319/121220-998.1.
 51. Barcellos Fernandes R, Bárbara Polo A, Novaes Rocha V, Willer Farinazzo Vitral R, Carolina Morais Apolônio A, José da Silva Campos M. Influence of orthodontic brackets design and surface properties on the cariogenic *Streptococcus mutans* adhesion. *Saudi Dental Journal.* 2022; 34(4): 321–327. doi: 10.1016/j.sdentj.2022.03.008.
 52. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007; 39(2): 175–191. doi: 10.3758/bf03193146.

7 PRESS RELEASE

O aparelho fixo usado nas costas dos dentes de frente de baixo (contenção) é frequentemente utilizado após o término do tratamento ortodôntico com a finalidade de evitar que os dentes entortem. Existem diferentes desenhos de contenção, e cada uma apresenta vantagens e desvantagens. Um problema comum com o uso das contenções é o acúmulo de restos de alimento e tártaro que podem comprometer a saúde bucal nessa região. Entretanto, não se sabe qual desenho de contenção apresenta menor acúmulo de restos de alimento e tártaro. O objetivo desse trabalho foi avaliar em laboratório (*in vitro*), qual dos três desenhos de contenção apresenta menor acúmulo de *S. mutans*, que é um microorganismo típico presente na cavidade bucal. Os resultados desta pesquisa mostram que existe diferença no acúmulo de *S. mutans* nos três desenhos de contenção, onde a CAH apresentou menor acúmulo devido a distância do fio para o dente. Ainda é necessário realizar estudo com pessoas utilizando esses desenhos de contenção para confirmar se os resultados observados em laboratório (*in vitro*) serão os mesmos. Contudo, nosso trabalho é mais uma ferramenta que auxilia o ortodontista e o paciente na escolha do desenho de contenção a ser utilizado.