

*Ana Paula Dias*

**Colonização de *Streptococcus mutans*  
e avaliação da ação antimicrobiana  
da clorexidina em bráquetes metálicos  
autoligados e convencionais.**

São Luís (MA)

2015

*Ana Paula Dias*

**Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade CEUMA com área de concentração em Ortodontia, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Leticia Machado Gonçalves

Co-orientador:

Prof. Dr. Marco Aurélio Benini Paschoal

São Luís (MA)

2015

D541a Dias, Ana Paula.

Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais / Ana Paula Dias. São Luís: UNICEUMA, 2015.

62 p.: il.

Monografia (Mestrado) – Curso de Mestrado em Odontologia. Universidade CEUMA, 2015.

1. Biofilme. 2. Bráquetes autoligados. 3. Bráquetes ortodônticos. 4. Clorexidina. 5. *Streptococcus mutans*. I. Gonçalves, Letícia Machado (Orientadora). II. Título.

CDU: 616.314-089.23



UNIVERSIDADE DO CEUMA - UNICEUMA  
REITORIA  
Gerência de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Mestrado em Odontologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada e defendida por  
Ana Paula Dias  
E aprovada pela comissão julgadora em  
13/07/2015

Prof. Dr. Alex Luiz Pozzobon Pereira  
Instituição pertencente Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Rudys Rodolfo De Jesus Tavares  
Instituição pertencente Universidade do CEUMA

Profa. Dra. Leticia Machado Gonçalves  
Presidente da Banca e orientadora  
Instituição pertencente Universidade do CEUMA

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto  
Gerente de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

# *Ana Paula Dias*

## **DADOS CURRICULARES**

Nascimento	10 de julho de 1969 – Belo Horizonte - MG
Filiação	Marcos Antônio Dias Maria da Conceição Dias
1988-1992	Graduação em Odontologia Universidade Federal de Minas Gerais
1997-1999	Aperfeiçoamento em Ortodontia e Ortopedia Facial pela UFMG
2013-2015	Mestrado acadêmico em Odontologia com área de concentração em Ortodontia pela Universidade CEUMA
Associações	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

# *Dedicatória*

Com amor...

Dedico este trabalho à minha família.

Aos meus pais, Marcos e Conceição,  
pelo amor e apoio em todos os momentos da vida.

Ao meu filho, Marcos,  
por me fazer um ser humano melhor.

Ao meu marido, João Vicente,  
companheiro fiel neste caminho que trilhamos juntos.

Em especial,  
dedico ao meu irmão único, Cláudio Tadiello, grande  
incentivador por toda vida.

# *Agradecimentos*

Agradecer não é tarefa fácil nem justa. Sou grata a todos que passaram pela minha vida e, de alguma forma, contribuíram para a construção de quem sou hoje.

A Deus, sempre a manifestar sua bondade infinita.

Ao meu marido, João Vicente, por todo o incentivo, carinho, compreensão, amizade e companheirismo durante o período dedicado ao mestrado.

Ao meu filho, Marcos, por seu amor e acolhimento, por ser a luz que alumia minha vida e me faz seguir adiante com fé e determinação!

Aos meus amados pais, pelo dom da vida! Marcos e Conceição, agradeço por terem proporcionado tudo o que tenho de mais valioso. Vocês foram imprescindíveis em todas as minhas conquistas! Mãe, Çãozinha querida, sua força, seu amor, sua sabedoria e paciência foram fundamentais em toda minha caminhada. E sempre será! Pai, Marcos, seu carinho, seu altruísmo, sua garra e determinação são ensinamentos que trago sempre comigo.

Ao meu irmão, Cláudio Tadiello, pelo incentivo, pela paciência, pelos conselhos e pela eterna parceria! Obrigada por seu amor incondicional! Você é, sem dúvida, um grande exemplo de homem e um profissional que muito orgulha e dignifica a nossa Odontologia.

À querida cunhada, Sara, pelo seu carinho e positividade, sempre tão inspiradores.

Aos meus sobrinhos, Maria e João, brilhantes companheirinhos de aventuras, por fazer de meus dias sempre os melhores possíveis!

À minha amiga e entusiasta Maria Célia Laurentys, grande incentivadora e sábia conselheira. Obrigada pela convivência e paciência até hoje.

Aos amigos e amigas, longe ou perto, sempre presentes iluminando meu caminho!

À Universidade CEUMA, na pessoa do Reitor Prof. Marcos Barros e Silva e Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Prof. Dr. Valério Monteiro Neto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Matheus Coelho Bandeca e do vice-coordenador Prof. Dr. Marcos André dos Santos Silva.

À orientadora Profa. Dra. Leticia Machado Gonçalves, admirável pela capacidade técnica e dedicação à instituição. Agradeço pelas oportunidades oferecidas, pela amizade, confiança e conselhos.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Benini Paschoal, co-orientador, pelo acolhimento no *lab* de microbiologia, repleto de possibilidades e desafios.

À Profa. Dra. Meire Coelho Ferreira, especialmente importante no delineamento da pesquisa. Obrigada pelos seus ensinamentos.

Especial agradecimento aos professores da Ortodontia, Prof. Fausto Silva Bramante, Júlio de Araújo Gurgel, Profa. Dra. Célia Regina Maio Pinzan Vercelino e aos da Integrada, Prof. Dr. Rudys Rodolfo de Jesus Tavares, Prof. Dr. Marcos André dos Santos da Silva, Prof. Dr. Etevaldo Matos Maia Filho, Prof. Dr. Sílvio Monteiro e Profa. Dra. Elizabeth Soares Fernandes que tanto admiro pela dedicação e profissionalismo.

A todos os colegas de mestrado, Adricyla Teixeira Rocha, Anna Claudia Dias Pereira, Grace Castelo Branco Freitas, Iara Regina Serra Campos, João Batista Medeiros Filho, Petrus Levid Barros Madeira, Reidson Stanley Soares dos Santos, Washington Luis Machado dos Reis, com quem compartilhei experiências, agradeço a amizade e solidariedade durante esta jornada.

Às colegas de laboratório, Camilla, Hadda, Salma e técnica do Laboratório de Microbiologia, Margareth, pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, sempre amigos e prestativos, especialmente à Erymônica, pela paciência e colaboração.

*“Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor.”*

*Albert Einstein*



## *Abreviações*

*S. mutans* – *Streptococcus mutans*

CLX – Clorexidina a 12%

PBS – Phosphate Buffer Saline, Solução tampão fosfatado

LC – Bráquetes ortodônticos de ligadura convencional

CL – Conventional Ligature orthodontic brackets

AL – Bráquetes autoligados

SL – Self-ligating brackets

CLXt – Teste de imersão em clorexidina

PBSt – Teste de imersão em PBS

BHI – Brain Heart Infusion

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

CFU – Colony-forming units

ANOVA – Análise de Variância

MF – Microscopia de fluorescência

FM – Fluorescence microscopy

# Sumário

<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>CAPÍTULO 1:</b> Colonization of <i>Streptococcus mutans</i> and evaluation of the chlorhexidine antimicrobial action in self-ligating and conventional metal brackets.....	13
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
<b>RESULTADOS</b> .....	18
<b>DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>CONCLUSÕES</b> .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>APÊNDICES</b>	
APÊNDICE A- TRADUÇÃO DO ARTIGO PARA PORTUGUÊS .....	27
APÊNDICE B- METODOLOGIA DETALHADA .....	42
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO I: NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA.....	55

## Resumo

Dias AP. **Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais.** [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Universidade CEUMA; 2015.

Os objetivos deste trabalho foram investigar se os bráquetes de Ligadura Convencional (LC) e Autoligados (AL) apresentam diferença na adesão de *S. mutans* e avaliar o efeito da clorexidina a 0,12% (CLX) sobre o biofilme de *S. mutans* cultivado nestes dois tipos de bráquetes.

MÉTODOS: A amostra foi composta de bráquetes ortodônticos metálicos (n=48) divididos em 2 grupos: AL, Bráquete Autoligado (n=24) e LC, Bráquete de Ligadura Convencional acrescido de ligadura elástica (n=24). Biofilme monoespécie *S. mutans* foi cultivado na superfície de bráquetes por 96 horas. Os dois grupos foram submetidos de forma randomizada a dois testes: CLXt, imerso em clorexidina (PerioGard sem álcool, Colgate-Pamolive) por 1 minuto, e PBSt, mergulhado em Salina Tampão Fosfatado por 1 minuto. O efeito antibacteriano da CLX e a comparação da adesão de biofilme foram avaliados através de contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC), n=36, e Microscopia de Fluorescência (MF), n=12. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). RESULTADOS: Em ambos os grupos, AL e LC, submetidos à CLXt houve redução significativa na viabilidade de *S. mutans* comparada ao controle. AL apresentou contagem UFC significativamente menor que LC. CONCLUSÃO: O biofilme *S. mutans* foi susceptível à clorexidina em ambos os grupos estudados e apresentou diferença significativa comparada ao grupo controle. Os bráquetes autoligados apresentaram menor adesão de *S. mutans* que os convencionais.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme. Bráquetes autoligados. Bráquetes ortodônticos. Clorexidina. *Streptococcus mutans*.

## *Abstract*

Dias AP. **Colonization of *Streptococcus mutans* and evaluation of the chlorhexidine antimicrobial action in self-ligating and conventional metal brackets.** [Dissertation]. São Luís: CEUMA University; 2015.

The objectives of this study were to assess whether the brackets of Conventional Ligature (CL) and self-ligating (SL) have difference in adherence of *S. mutans* and evaluate the bacterial viability on the *S. mutans* biofilm cultivated in these two types of brackets underwent to 0.12% chlorhexidine (CHX). METHODS: The sample consisted of 48 metallic orthodontic brackets divided randomly in two groups: CL, Conventional Ligature (Roth Ligth Mini, Morelli, BR) (n=24); and SL, Self-Ligating (Roth SLI-Autoligado Interativo, Morelli, BR) (n=24), Biofilm *S. mutans* was cultured in the bracket surface for 96 hours and groups underwent to 2 tests: CHXt, samples were immersed in 0.12% Chlorhexidine for 1 minute; or PBSt, samples were immersed in 0.9% Phosphate-Buffer Saline (PBS) for 1 minute. Both groups have experienced the same tests by triplicate in 3 times. Results were assessed by counting Colony Forming Units (CFU) and Fluorescence Microscopy (FM). The results were analyzed using ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). RESULTS: In both groups submitted to CHXt significant reduction in the viability of *S. mutans* was found compared to PBSt, they were statistically similar, indicating antimicrobial activity of CHX for SL and CL. When comparing CFU counting between groups there were significant difference in formation of *S. mutans* colonies. CONCLUSIONS: colonies of *S. mutans* were susceptible to chlorhexidine in SL and CL groups equally. Self-ligating brackets promote lower colonization of *S. mutans* when compared with conventional brackets.

### KEY WORDS:

Biofilm. Chlorhexidine. Orthodontic Brackets. Self-ligating brackets. *Streptococcus mutans*.

# *Capítulo 1*

**Colonization of *Streptococcus mutans* and  
evaluation of the chlorhexidine antimicrobial action in  
self-ligating and conventional metal brackets**

## ABSTRACT

The objectives of this study were to assess whether the brackets of Conventional Ligature (CL) and self-ligating (SL) have difference in adherence of *S. mutans* and evaluate the bacterial viability on the *S. mutans* biofilm cultivated in these two types of brackets underwent to 0.12% chlorhexidine (CHX). METHODS: The sample consisted of 48 metallic orthodontic brackets divided randomly in two groups: CL, Conventional Ligature (Roth Ligth Mini, Morelli, BR) (n=24); and SL, Self-Ligating (Roth SLI-Autoligado Interativo, Morelli, BR) (n=24), Biofilm *S. mutans* was cultured in the bracket surface for 96 hours and groups underwent to 2 tests: CHXt, samples were immersed in 0.12% Chlorhexidine for 1 minute; or PBSt, samples were immersed in 0.9% Phosphate-Buffer Saline (PBS) for 1 minute. Both groups have experienced the same tests by triplicate in 3 times. Results were assessed by counting Colony Forming Units (CFU) and Fluorescence Microscopy (FM). The results were analyzed using ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). RESULTS: In both groups submitted to CHXt significant reduction in the viability of *S. mutans* was found compared to PBSt, they were statistically similar, indicating antimicrobial activity of CHX for SL and CL. When comparing CFU counting between groups there were significant difference in formation of *S. mutans* colonies. CONCLUSIONS: colonies of *S. mutans* were susceptible to chlorhexidine in SL and CL groups equally. Self-ligating brackets promote lower colonization of *S. mutans* when compared with conventional brackets.

### KEY WORDS:

Biofilm. Chlorhexidine. Orthodontic Brackets. Self-ligating brackets. *Streptococcus mutans*.

## INTRODUCTION

Biofilm was outlined in 1978 (1) to describe structure that adheres to hard surfaces, such as enamel, from the sucrose metabolism. The bacterium *Streptococcus mutans* plays a significant role in this cariogenic process (2). Dental caries is the most prevalent biofilm-associated oral infection in the world (3) leading to a significant negative impact on the quality of life of millions of people (4). This microbial aggregation also occurs in orthodontic appliances (5) due to establishment of new retention sites around their fixed components, such as bands, wires and brackets, causing changes in oral pH, increasing colonization of *S. mutans* and favoring the occurrence of enamel demineralization, caries, gingivitis and periodontal disease(6).

The diverse morphological characteristics of brackets currently available can directly influence biofilm formation (2, 7, 8). Among the metallic devices, self-ligating brackets (SL) differ by the use of a metal clip for retaining the orthodontic arch wire instead of elastomeric ligatures used in conventional brackets (CL) (9). According to some studies, self-ligating are less susceptible to bacterial colonization due to their shape and the absence of metallic or elastomeric ligatures (6, 10, 11) promoting better hygiene (9, 12, 13). Despite these technological advances the problem of biofilm formation over the brackets persists in the daily orthodontic practice (14).

The prevention of caries and periodontal disease depends on the disorganization of biofilm primarily. Many studies describe the efficacy of the mechanical removal of biofilm by brushing and flossing performed by the individual or professional cleaning (2, 15) since it runs daily and systematically (16). However, chemical control should be carried out for addition when the mechanical control cannot be performed properly. Literature presents numerous antimicrobial substances for chemical control prophylactic or therapeutic, differing in chemical nature, mechanism of action, clinical presentation and efficacy (17).

The chlorhexidine (CHX) proved to be effective (18, 19) and selected as standard chemical therapeutic agent for this purpose (20-22). The chlorhexidine mouthwash is a solution containing 0.12% chlorhexidine gluconate. The active ingredient is hydrosoluble and dissociates quickly at physiological pH, releasing

positively charged chlorhexidine. The mechanism of action is related to its cationic charge, which links to microbial cell walls and other complex, altering the osmotic balance of the organism, leading to cell death. Chlorhexidine is an antiseptic appropriated for gram-positive, gram-negative microorganisms and some yeasts. Although there are many evidences about the application of chlorhexidine, there are few studies discussing its use in different designs of orthodontic brackets and comparing chemical antimicrobial action on cariogenic biofilm, useful information for orthodontic community.

The objectives of this study were to assess, *in vitro*, whether the brackets of Conventional Ligature (CL) and self-ligating (SL) have difference in adherence of *S. mutans* and evaluate the bacterial viability on biofilm cultivated in these two types of brackets underwent to 0.12% chlorhexidine (CHX).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Sample of orthodontic brackets:**

Conventional Ligature Orthodontic brackets Morelli prescription Roth Light for lower incisors using elastomeric ligature attached and Self-ligating Orthodontic brackets Morelli Prescription Roth SLI – Self-Ligating Interactive for lower incisors.

### **Microbiological samples:**

Standard strains of *S. mutans* UA159 are provided by the CEUMA University Microbiology Laboratory. Bacterial suspension at the same cell concentration ( $1 \times 10^6$  cells/mL) was achieved by proceeding optical density adjustment to prepare the inoculum (0.5 McFarland standard at 540nm).

### **Experimental situation:**

0.12% Chlorhexidine mouthwash (PerioGard alcohol free, Colgate-Palmolive) was used for testing the inhibition of monoculture biofilm *s. mutans*, *in vitro*, cultured over two types of metal brackets. Solubilization of biofilm in PBS was used to assess the difference in adherence of *S. mutans* between the groups. 48 orthodontic brackets was divided randomly in two groups, Conventional Ligature (CL), n=24, conventional brackets elastomeric ligation



attached; and Self-Ligating (SL), n=24, self-ligating brackets and submitted to the same tests by triplicate in 3 times. 16 brackets each triplicate randomly underwent to 2 tests, described as CHXt (n=4 per group), which the samples were subjected to treatment with 0.12% Chlorhexidine for 1 minute; or control PBSt (n=4 per group), which samples were immersed in 0.9% Phosphate-Buffer Saline (PBS) for 1 minute.

#### ***In vitro* biofilm formation:**

Sterilized brackets were transferred into 24-well plate and incubated with 1000 $\mu$ L microorganism suspension BHI with 1% glucose at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL and the plates were incubated anaerobically at 37°C as a static culture for 24h for biofilm formation (23). Biofilm maturation process followed transferring the brackets each 24h for a new cell containing 1000 $\mu$ L of BHI with 1% sucrose and incubated during 96h.

#### **Counting Colony Forming Units (CFU)**

After the tests application, CHXt or PBSt, immediately the brackets were submitted to solubilization in a Falcon tube with 5ml of buffer for collect the microorganisms for analysis. 100 $\mu$ L of the medium were stirred and transferred to an Eppendorf with 900 $\mu$ L of buffer for ten-fold serial dilution. Bipartite Petri dishes with Blood-Agar were seeded by spreading 25 $\mu$ L in each part. Microaerophilia atmosphere was obtained. The plates were incubated in bacteriological incubator at 37°C for 48 hours.

#### **Fluorescence microscopy**

For FM analysis two brackets of each group was carefully washed twice with PBS after being subjected to experimental situation. The biofilm attached was preserved. The viability of bacteria within the biofilms was determined by staining the biofilms with LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) which includes two fluorescent nucleic acids stains: green-SYTO 9 and red-propidium iodide. The biofilms were treated according to the manufacturer's instructions, being stained immediately after the treatments, kept in the dark and protected from light during 20min at 35°C

for analysis. Stained biofilms were examined with a fluorescence microscope (Axio Imager Z2; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using specific filters, 488/507 nm for detection of SYTO 9 and 503/615 nm for the detection of propidium iodide and examined at 63.4 X magnification. Green cells indicated viability, red were dead cells.

### **Statistical analysis**

The assays were performed in triplicate for each group and the procedure was repeated three times on different days (n=9). The mean and the standard deviation (SD) of the numbers of CFU for each treatment were calculated. CFUs were transformed into logarithmical scale ( $\log_{10}$ ) in order to reduce variance heterogeneity. A two way ANOVA test followed by Tukey test were used to verify the differences among all the studied groups. The cut off level of significance was set at 5%.

## **RESULTS**

After the experiment in SL and CL, the adhered biofilm was solubilized, serially diluted, seeded plates Agar-blood, incubated for 48 hours.

### **Effect of the antimicrobial chlorhexidine 0.12%**

When comparing the brackets SL and CL immersed for 1 minute in CLX the groups submitted to the control PBS for 1 minute was found significant reduction in the viability of *S. mutans* in brackets for both groups receiving CHX. The results were statistically similar between groups indicating positive antimicrobial activity of CLX for both SL and CL (Figure 1, b)

### **Biofilm adhesion in SL and CL**

When comparing CFU counts between SL and CL groups significant difference was observed in the number of *S. mutans* colonies, where the CL group had lower scores than the SL group, indicating a lower adhesion cariogenic biofilm in SL than in CL (Figure 1, A and B).

## Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy images showed more red cells, which underwent cell death in both SL and CL who underwent CLXt, indicating the antimicrobial effect CLX (Fig.2).

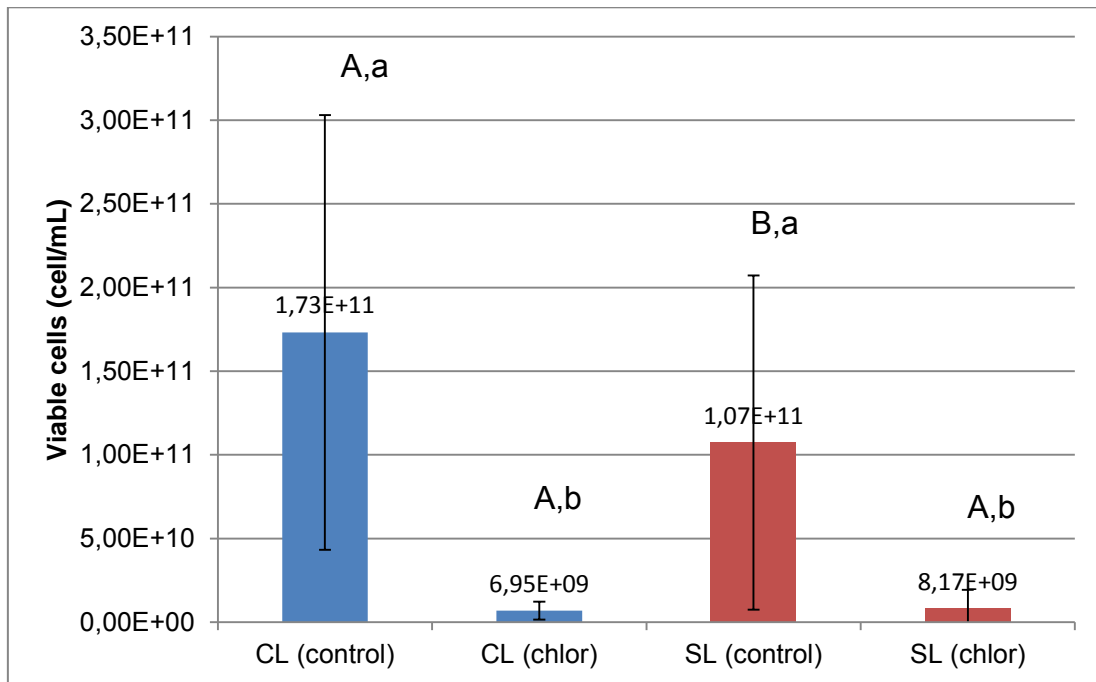


Figure 01. Viable cells after treatment in CL or SL. A and B indicate significant differences between the brackets, a and b indicate significant difference between treatments (ANOVA, Tukey  $p < 0.05$ ).

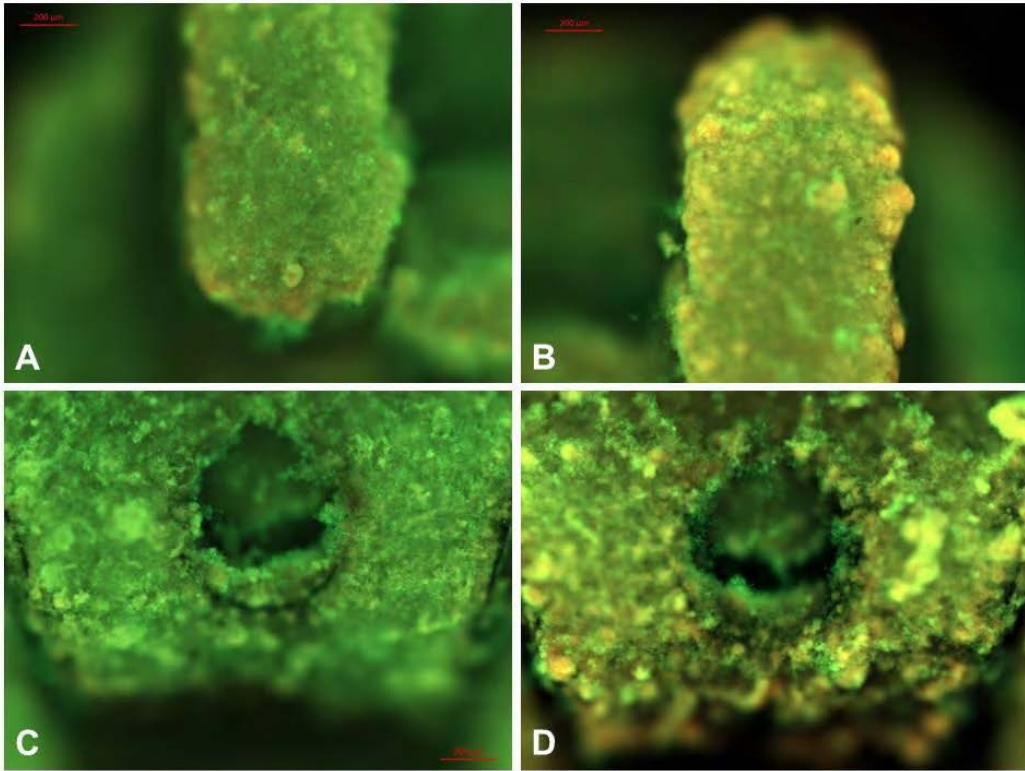


Figure 02. Viable cells after treatments in CL or SL brackets. A- CL after PBSt; B- CL after CLXt; C- SL after PBSt; D- SL after CLXt

## DISCUSSION

Orthodontic treatment for functional rehabilitation and facial aesthetic is highly popular due to the high prevalence of malocclusion (24), which is based on deviations from harmonious craniofacial growth and its implications in the eruption and correct implantation of teeth in their bone bases (25). Patients undergoing fixed orthodontic therapy experience ecological changes in the oral environment that put them at risk for the oral health (5, 19).

Brackets create many areas that harbor dental biofilm and make much harder to clean teeth adequately. The acids produced by these bacteria can not only cause caries, but in the absence of cavities can still cause unsightly White Spot Lesions, areas of demineralized enamel surrounding the brackets. This means that while teeth become straight they may be irreparably discolored when the brackets are removed.

This is a relevant fact, considering that between 50-75% of the Western population has orthodontic treatment needs objective and/or subjective (25, 26) and new white spot lesions developing on the maxillary front teeth during orthodontic therapy remain a frequent undesired side effect, affecting 60.9% of patients and threatening our efforts for clinical excellence(14).

This study aimed to evaluate two types of metal orthodontic brackets, widely used around the world (9, 26), conventional, which has consolidated its use, and self-ligating, which show a trend among clinical orthodontists seeking to offer a differentiated treatment (13). Emphasis was given to biofilm adhesion and susceptibility to antimicrobial chlorhexidine. The selection of *S. mutans* as microorganism-test was based on its importance in the etiology of dental caries (2), due to several factors of virulence, as acidogenesis, high adaptability to environment, the presence of cell surface adhesins and production of extracellular polysaccharides (1, 5, 7).

The orthodontic patient usually has difficulty hygiene, causing a greater accumulation of biofilm and qualitative changes in the local flora (5, 6, 27). Regarding to conventional and self-ligating brackets some authors suggest that there is higher adherence of *s. mutans* in brackets with elastomeric ligatures (9, 28); others claim the opposite (29), apart from those who found no significant differences on this aspect (27, 30, 31).

This study found differences in the number of *s. mutans* colonies between SL and CL. There were found higher adherence in brackets with elastomeric ligatures CL when compared to the SL. According to some studies the self-ligating brackets allow better hygiene (9, 12) and they are less susceptible to bacterial colonization due to their shape and lack of wire or elastomeric ligatures (13).

Two methods were used to observe this biofilm, CFU counting and MF. CFU provided a quantitative analysis that was able to detect cell viability of the biofilm on orthodontic brackets and a comparative analysis between SL and CL adhesion of *s. mutans*. Fluorescence microscopy, an imaging technique used to study the dynamics of living and dead cells, had proved that CHX decreased the amount of living bacteria on the surface of the bracket. The results indicated that the CHX has an inhibitory effect on *S. mutans* biofilm in both SL and CL groups. The application of CHX for one minute did not lead to complete eradication of *s. mutans*; however, the inhibitory effect reached statistically significant levels indicating the benefits of this prescription as an adjuvant for biofilm control in patients who use orthodontic brackets. Despite this, in accordance with the literature, which recommends CHX as a standard chemical control (32), it is worth pointing out that the long-term use stains teeth and tongue, besides affecting the taste sensation. It is suggested to study other antimicrobial agents.

The monospecies biofilm model was used to evaluate the antimicrobial effect of CHX on orthodontic brackets. This method presents as a limitation, however, factors inherent to the oral microbiota should be minimized for a better understanding of each phenomenon (33). The absence of conditions that simulate those found in the oral cavity, such as the presence of saliva, is considered as another limitation. Saliva decreases the affinity of *S. mutans* to orthodontic brackets, therefore, in further studies it is suggested to use artificial saliva (34).

In light of this discussion, the orthodontist must, after all, properly inform this special population of the potential risks of treatment and emphasize caries control programs, especially the importance of oral hygiene, not only aiming to create fresh breath. The patient must be motivated to perform more

intensive oral hygiene, using electric toothbrush in combination with fluoridated toothpaste and effective antimicrobial antibacterial mouthwash.

Presently metallic brackets are the most widely used (35, 36), regardless of model or prescription. Although the concept does not characterize a novelty in orthodontics, the Self-Ligating (SL) system was widespread in the early twenty-first century (12, 37) by stating the low friction as differential, which facilitates the start of tooth movement by decreasing the initial resistance to movement. This has aroused great interest among orthodontists, since the reduction of friction levels during orthodontic treatment promises faster treatment and less number of visits to the orthodontist. Despite claims about the different performance of SL over CL, lack evidence (36). The shortened chair time (13) and slightly lower incisor proclination (38) appear to be the only significant advantage of self-ligating systems compared to conventional systems which have support in the literature. The choice of the bracket system and its prescription should be guided by the judgment of professional, permeated by their clinical experience and an individualized diagnosis. This decision should include biological and biomechanical concepts and be supported by scientific evidence.

Other studies by changing the exposure time to CHX, comparing different therapies and other chemical agents may be desirable. Additionally, it is inferred that this study model can be effectively used to assess orthodontic brackets of different compositions, comparison of commercial brands, as well as studying the action of other antimicrobial agents in the future.

## **CONCLUSIONS**

The present study supports that in both groups submitted to CHX significant reduction in the viability of *s. mutans* was found compared to PBS, they were statistically similar, indicating antimicrobial activity of CHX for SL and CL. When comparing CFU count between groups there was significant difference in number of *s. mutans* colonies, where SL group had lower scores than the CL group, indicating a SL clinical advantage over CL related to the adhesion of cariogenic biofilm. More evidences on clinical trials are necessary to explain the results obtained.

## REFERENCES

1. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Scientific American*. 1978 Jan;238(1):86-95. PubMed PMID: 635520.
2. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of periodontology*. 1965 May-Jun;36:177-87. PubMed PMID: 14296927.
3. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndaye C. The global burden of oral diseases and risk to oral health. In: Organization WH, editor.: *Bull World Health Organization*; 2005. p. 661-9.
4. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American journal of dentistry*. 2009 Feb;22(1):3-8. PubMed PMID: 19281105.
5. Rego RO, Oliveira CA, dos Santos-Pinto A, Jordan SF, Zambon JJ, Cirelli JA, et al. Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. *American journal of dentistry*. 2010 Dec;23(6):317-23. PubMed PMID: 21344829.
6. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1991 Jul;100(1):35-7. PubMed PMID: 2069145.
7. Theilade E. The experimental gingivitis studies: the microbiological perspective. *Journal of dental research*. 1996 Jul;75(7):1434-8. PubMed PMID: 8876594.
8. Shelley WB. Gingival hyperplasia from dental braces. *Cutis*. 1981 Aug;28(2):149-50. PubMed PMID: 7285623.
9. Shivapuja PK, Berger J. A comparative study of conventional ligation and self-ligation bracket systems. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1994 Nov;106(5):472-80. PubMed PMID: 7977187.
10. Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. *Journal of dental research*. 1970 Mar-Apr;49(2):320-4. PubMed PMID: 5264596.
11. Forsberg CM, Brattstrom V, Malmberg E, Nord CE. Ligation wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. *European journal of orthodontics*. 1991 Oct;13(5):416-20. PubMed PMID: 1748191.
12. Damon DH. The rationale, evolution and clinical application of the self-ligating bracket. *Clinical orthodontics and research*. 1998 Aug;1(1):52-61. PubMed PMID: 9918646.
13. Paduano S, Cioffi I, Iodice G, Rapuano A, Silva R. Time efficiency of self-ligating vs conventional brackets in orthodontics: effect of appliances and ligating systems. *Progress in orthodontics*. 2008;9(2):74-80. PubMed PMID: 19350061.
14. Enaia M, Bock N, Ruf S. White-spot lesions during multibracket appliance treatment: A challenge for clinical excellence. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2011 Jul;140(1):e17-24. PubMed PMID: 21724067.
15. Vermaire JH, van Loveren C, Brouwer WB, Krol M. Value for money: economic evaluation of two different caries prevention programmes compared with standard care in a randomized controlled trial. *Caries research*. 2014;48(3):244-53. PubMed PMID: 24526078.
16. Costa MR, Silva VC, Miqui MN, Sakima T, Spolidorio DM, Cirelli JA. Efficacy of ultrasonic, electric and manual toothbrushes in patients with fixed orthodontic appliances. *The Angle orthodontist*. 2007 Mar;77(2):361-6. PubMed PMID: 17319775.
17. Kocak MM, Ozcan S, Kocak S, Topuz O, Erten H. Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of *streptococcus mutans* in saliva.



European journal of dentistry. 2009 Jan;3(1):57-61. PubMed PMID: 19262732. Pubmed Central PMCID: 2647960.

18. Ullsfoss BN, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rolla G, Afseth J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study. *Scandinavian journal of dental research*. 1994 Apr;102(2):109-12. PubMed PMID: 8016555.

19. Lundstrom F, Krasse B. Caries incidence in orthodontic patients with high levels of *Streptococcus mutans*. *European journal of orthodontics*. 1987 May;9(2):117-21. PubMed PMID: 3472889.

20. Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Journal of dentistry*. 2010 Jun;38 Suppl 1:S16-20. PubMed PMID: 20621239. Pubmed Central PMCID: 2954231.

21. Grossman E, Meckel AH, Isaacs RL, Ferretti GA, Sturzenberger OP, Bollmer BW, et al. A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *Journal of periodontology*. 1989 Aug;60(8):435-40. PubMed PMID: 2689627.

22. Lakade LS, Shah P, Shirol D. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the *Mutans streptococcus* count in plaque. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 2014 Apr-Jun;32(2):91-6. PubMed PMID: 24739906.

23. Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral microbiology and immunology*. 2008 Jun;23(3):206-12. PubMed PMID: 18402606.

24. Angle EH. Classification of malocclusion. *Dent Cosmos*. 1899 Mar;41(3):16.

25. Petrovic D, Vukic-Culafic B, Ivic S, Djuric M, Milekic B. Study of the risk factors associated with the development of malocclusion. *Vojnosanitetski pregled Military-medical and pharmaceutical review*. 2013 Sep;70(9):817-23. PubMed PMID: 24266308.

26. Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation--a potential public health threat? *Clinical oral investigations*. 2014 Sep;18(7):1711-8. PubMed PMID: 24728529.

27. Pejda S, Varga ML, Milosevic SA, Mestrovic S, Slaj M, Repic D, et al. Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. *The Angle orthodontist*. 2013 Jan;83(1):133-9. PubMed PMID: 22765511.

28. Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA, Jr., Maier T, et al. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2009 Apr;135(4):426 e1-9; discussion -7. PubMed PMID: 19361723.

29. do Nascimento LE, Pithon MM, dos Santos RL, Freitas AO, Alviano DS, Nojima LI, et al. Colonization of *Streptococcus mutans* on esthetic brackets: self-ligating vs conventional. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2013 Apr;143(4 Suppl):S72-7. PubMed PMID: 23540639.

30. Pandis N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *European journal of orthodontics*. 2010 Feb;32(1):94-9. PubMed PMID: 19474229.

31. Buck T, Pellegrini P, Sauerwein R, Leo MC, Covell DA, Jr., Maier T, et al. Elastomeric-ligated vs self-ligating appliances: a pilot study examining microbial colonization and white spot lesion formation after 1 year of orthodontic treatment. *Orthodontics : the art and practice of dentofacial enhancement*. 2011 Summer;12(2):108-21. PubMed PMID: 21935504.

32. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*. 1986 Jun;57(6):370-7. PubMed PMID: 3522851.
33. Halawany HS, Abraham NB, Siddiqui YM, Balto HA, Jacob V. Antimicrobial Efficacy of *Salvadora persica* Extracts on a Monospecies Biofilm on Orthodontic Brackets In Vitro. *Oral health & preventive dentistry*. 2015 Mar 18. PubMed PMID: 25789362.
34. Eliades T, Eliades G, Brantley WA. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1995 Oct;108(4):351-60. PubMed PMID: 7572846.
35. Othman SA, Mansor N, Saub R. Randomized controlled clinical trial of oral health-related quality of life in patients wearing conventional and self-ligating brackets. *Korean journal of orthodontics*. 2014 Jul;44(4):168-76. PubMed PMID: 25133131. Pubmed Central PMCID: 4130912.
36. Johansson K, Lundstrom F. Orthodontic treatment efficiency with self-ligating and conventional edgewise twin brackets: a prospective randomized clinical trial. *The Angle orthodontist*. 2012 Sep;82(5):929-34. PubMed PMID: 22397386.
37. Castro RM, Neto PS, Horta MC, Pithon MM, Oliveira DD. Comparison of static friction with self-ligating, modified slot design and conventional brackets. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2013 Jul-Aug;21(4):314-9. PubMed PMID: 24037069. Pubmed Central PMCID: 3881893.
38. Pandis N, Polychronopoulou A, Eliades T. Self-ligating vs conventional brackets in the treatment of mandibular crowding: a prospective clinical trial of treatment duration and dental effects. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2007 Aug;132(2):208-15. PubMed PMID: 17693371.

## **Apêndice A - Tradução do artigo para Português**

*Ana Paula Dias*

**Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade CEUMA com área de concentração em Ortodontia, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Leticia Machado Gonçalves

Co-orientador:

Prof. Dr. Marco Aurélio Benini Paschoal

São Luís (MA)

2015

## Resumo

Dias AP. **Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais.** [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Universidade CEUMA; 2015.

**INTRODUÇÃO:** Os objetivos deste trabalho foram investigar se os bráquetes de Ligadura Convencional (LC) e Autoligados (AL) apresentam diferença na adesão de *S. mutans* e avaliar o efeito da clorexidina a 0,12% (CLX) sobre o biofilme de *S. mutans* cultivado nestes dois tipos de bráquetes. **MÉTODOS:** A amostra foi composta de bráquetes ortodônticos metálicos (n=48) divididos em 2 grupos: AL, Bráquete Autoligado (n=24) e LC, Bráquete de Ligadura Convencional acrescido de ligadura elástica (n=24). Biofilme monoespécie *S. mutans* foi cultivado na superfície de bráquetes por 4 dias (96 horas). Os dois grupos foram submetidos de forma randomizada a dois testes: CLXt, imerso em clorexidina (PerioGard sem álcool, Colgate-Pamolive) por 1 minuto, e PBSt, mergulhado em Salina Tampão Fosfatado por 1 minuto. O efeito antibacteriano da CLX e a comparação da adesão de biofilme foram avaliados através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC), n=36, e da Microscopia de Fluorescência (MF), n=12. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). **RESULTADOS:** Em ambos os grupos, AL e LC, submetidos à CLXt houve redução significativa na viabilidade de *S. mutans* comparada ao controle. AL apresentou contagem UFC significativamente menor que LC. **CONCLUSÃO:** O biofilme *S. mutans* foi susceptível à clorexidina em ambos os grupos estudados e apresentou diferença significativa comparada ao grupo controle. Os bráquetes autoligados apresentaram menor adesão de *S. mutans* que os convencionais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biofilme. Bráquetes autoligados. Bráquetes ortodônticos. Clorexidina. *Streptococcus mutans*.

## Abstract

Dias, AP. **Colonization of *Streptococcus mutans* and evaluation of the antimicrobial action of chlorhexidine in metal brackets, self-ligating and conventional.** [Dissertation]. São Luís: CEUMA University; 2015.

**INTRODUCTION:** Self-ligating brackets replace elastomeric ligatures by metal clip to hold the archwire in place. This characteristic can influence the biofilm formation directly and *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) plays an important role in this bacterial adherence. The objective of this study was to investigate, *in vitro*, if self-ligating brackets have advantage over conventional on biofilm formation of *S. mutans* and assess the effect of 0.12% chlorhexidine (CHX) on the bacterial viability, cultivated in two types of metal brackets, Conventional Ligature (CL) and Self-Ligating (SL).

**METHODS:** The sample consisted of 48 metallic orthodontic brackets divided randomly in two groups: CL, Conventional Ligature (Roth Ligth Mini, Morelli, BR) (n=24); and SL, Self-Ligating (Roth SLI-Autoligado Interativo, Morelli, BR) (n=24). Biofilm *S. mutans* was cultured in the bracket surface for 4 days (96 hours). Groups underwent for two tests: CHXt, where samples were immersed in 0.12% Chlorhexidine for 1 minute or PBSt, samples were immersed in 0.9% Phosphate-Buffer Saline (PBS) for 1 minute. The tests were performed in triplicate in 3 different times. Results were assessed by counting Colony Forming Units (CFU) and Fluorescence Microscopy (FM). The results were analyzed using ANOVA and Tukey test (p<0.05).

**RESULTS:** In both groups underwent to CHXt significant reduction in the viability of *S. mutans* was found compared to PBSt; they were statistically similar, indicating antimicrobial activity of CHX for SL and CL. When comparing CFU count between groups there were significant difference in number of *S. mutans* colonies, where SL group had lower formations than the CL group.

**CONCLUSIONS:** colonies of *S. mutans* were susceptible to chlorhexidine in SL and CL groups equally. Self-ligating brackets promote lower colonization of *S. mutans* when compared with conventional brackets.

**KEY WORDS:** *Streptococcus mutans*. Chlorhexidine. Orthodontic Brackets. Self-ligating brackets.

# Introdução

O Biofilme foi descrito em 1978 (1) para conceituar a estrutura que se adere a superfícies duras, como esmalte, a partir do metabolismo da sacarose. Em seu processo de formação no ambiente bucal a bactéria *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) desempenha um importante papel (2). A cárie dentária é a infecção oral mais prevalente associada ao biofilme no mundo (3) com impacto negativo significativo sobre a qualidade de vida de milhões de pessoas (4). Esta agregação microbiana também ocorre em aparelhos ortodônticos (5) devido ao estabelecimento de novos locais de retenção em torno de seus componentes fixos, como bandas, fios e braquetes, causando alterações no pH bucal e aumentando a colonização de *S. mutans*, que favorecem a ocorrência da desmineralização do esmalte, cáries, gengivite e doença periodontal (6).

As diversas características morfológicas dos bráquetes disponíveis atualmente para o ortodontista podem influenciar diretamente a formação do biofilme (2, 7, 8). Entre os bráquetes metálicos, os bráquetes autoligados (AL) diferem-se por possuírem um clipe de metal para fixar o fio do arco enquanto os bráquetes de ligadura convencionais (LC) usam elásticos ou amarrilhos de aço para manter o arco (9). De acordo com alguns estudos, AL é menos suscetíveis a colonização bacteriana devido à sua forma e a ausência de ligaduras (6, 10, 11) favorecendo uma melhor higiene (9, 12, 13). Mesmo com esses avanços tecnológicos o problema de formação de biofilme sobre os bráquetes persiste na prática ortodôntica diária (14).

A prevenção da cárie e da doença periodontal depende principalmente da desorganização do biofilme por ação mecânica e/ou química. Alguns estudos têm mostrado que a remoção mecânica da placa dentária, realizada por escovação e uso de fio dental pelo indivíduo ou pela limpeza profissional (2, 15) é eficaz, desde que executado diariamente e sistematicamente (16). No entanto, o controle químico de biofilme deve ser realizado adicionalmente quando o controle mecânico não pode ser realizado adequadamente. A literatura apresenta inúmeras substâncias antimicrobianas para o controle

químico, profilático ou terapêutico, diferindo na natureza química, mecanismo de ação, a apresentação clínica e eficácia (17).

A clorexidina provou ser eficaz (18, 19) selecionada como agente químico padrão para biofilme (20-22). O antisséptico bucal a base de clorexidina é uma solução contendo Gluconato de clorexidina 0,12% (CLX), cujo nome químico é bis 1,1-hexametileno (5-p-clorofenil biguanida) D-di-gluconato. O ingrediente ativo é hidrossolúvel e dissocia-se rapidamente em pH fisiológico liberando clorexidina carregada positivamente. O mecanismo de ação está relacionado com a sua carga catiônica, que se liga à parede celular microbiana e a outros complexos alterando o equilíbrio osmótico do organismo, conduzindo à morte celular.

A clorexidina é um antisséptico apropriado para bactérias gram-positivas, gram-negativas e algumas leveduras. Embora existam muitas evidências sobre a aplicação de clorexidina, há poucos estudos que discutem a sua utilização em diferentes modelos de bráquetes ortodônticos e comparando ação química antimicrobiana em biofilmes cariogênicos, informações que podem ser úteis para a comunidade ortodôntica.

O objetivo deste trabalho foi investigar se os bráquetes de Ligadura Convencional (LC) e Autoligados (AL) apresentam diferença na adesão de *S. mutans* e avaliar o efeito da clorexidina a 0,12% (CLX) sobre o biofilme de *S. mutans* cultivado nestes dois tipos de bráquetes.

# *Materiais e Métodos*

## **Amostra de bráquetes ortodônticos**

Bráquetes ortodônticos de ligadura convencional Morelli prescrição Roth Light para incisivos inferiores acrescidos de ligaduras elásticas e bráquetes autoligados Morelli prescrição Roth SLI para incisivos inferiores.

## **Amostras microbiológicas**

Cepas padrão de *S. mutans* UA159 foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade CEUMA, suspensões bacterianas padronizadas na mesma concentração de células ( $1 \times 10^6$  cél/mL) foram obtidas procedendo a método de ajuste da densidade óptica para preparar o inóculo, com o comprimento de onda de 540nm do espectrofotômetro.

## **Situação experimental**

O enxagatário bucal de clorexidina a 0,12% (Periogard sem álcool, Colgate-Palmolive) foi utilizado para testar a inibição da monocultura do biofilme *S. mutans*. A solubilização do biofilme em PBS foi usada para avaliar a diferença na adesão de *S. mutans* entre os grupos. 48 bráquetes ortodônticos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, Ligadura Convencional (LC), n=24, bráquetes convencionais acrescidos de ligaduras elásticas; e Autoligados (AL), n=24, bráquetes autoligados. Em seguida, eles foram submetidos aos mesmos testes por triplicata em 3 momentos. 16 bráquetes de cada triplicata foram submetidos aleatoriamente a dois testes, descritos como CLXt (n=4 por grupo), cujas amostras foram submetidas ao tratamento com clorexidina a 0,12% durante 1 minuto, ou controle PBSt (n=4 por grupo), cujas amostras foram imersas em 0,9% de tampão fosfato salino (PBS) durante 1 minuto.

## **Formação de biofilme *in vitro***

Bráquetes esterilizados foram transferidos para placa de 24 poços com 1000µL de suspensão do inóculo com BHI com 1% de glicose a uma concentração de  $1 \times 10^6$  cél/ml e incubou-se anaerobicamente a 37°C como uma cultura estática

durante 24 horas para a aderência inicial (23). Processo de maturação do biofilme seguiu transferindo-se os bráquetes a cada 24 horas para uma nova célula contendo 1000 µL de BHI com 1% de sacarose e incubadas durante 96 h. Imediatamente após este período todos os grupos foram submetidos aos respectivos testes e avaliados por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) ou Microscopia de Fluorescência (MF).

### **Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)**

Após a aplicação dos testes, CLXt ou PBSt, imediatamente os bráquetes foram submetidos à solubilização num tubo Falcon com 5 ml de PBS para coleta dos microrganismos para análise. 100 µL do meio foram agitados e transferidos para um Eppendorf com tampão para 10 diluições em série. Placas de Petri bipartidas com ágar sangue foram semeadas, espalhando 25 µL em cada parte. Atmosfera microaerofílica foi obtida e as placas foram incubadas na incubadora bacteriológica a 37 °C durante 48 horas.

### **Microscopia de fluorescência**

Para análise de microscopia de fluorescência (Axio Imager Z2; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), dois bráquetes de cada grupo, depois de submetido à situação experimental, foi cuidadosamente lavado duas vezes com PBS. O biofilme aderido foi preservado. As amostras foram coradas com SYTO-9 e iodeto de propídio, com um kit de viabilidade Live/Dead BacLight (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), em seguida, elas foram incubadas durante 20 minutos a 35 °C, protegidas da luz. Biofilmes corados foram examinados com um microscópio de fluorescência (Axio Imager Z2; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), utilizando filtros específicos, 488/507 nm para detecção de SYTO 9 e 503/615 nm para a detecção de iodeto de propídio e examinadas em ampliação de 63,4 X.



# Resultados

Após aplicação dos testes em AL e LC, o biofilme aderido foi solubilizado, diluído em série, semeado em placas de Ágar-sangue, incubado por 48 horas.

## **Efeito antimicrobiano da clorexidina 0,12%**

Ao compararem-se os bráquetes AL e LC imersos em CLX por 1 minuto com os grupos submetidos ao controle PBS por 1 minuto foi encontrada redução significativa na viabilidade de *S. mutans* nos bráquetes para ambos os grupos submetidos à CHX. Os resultados foram estatisticamente semelhantes indicando positiva atividade antimicrobiana de CLX para SL e CL (fig.1, a e b).

## **Adesão do biofilme em AL e LC**

Ao comparar contagem de UFC entre os grupos AL e LC houve diferença significativa no número de colônias de *S. mutans*, onde o grupo AL teve contagens mais baixas do que o grupo LC, indicando uma menor adesão de biofilme cariogênico em AL do que em LC (fig.1, A e B).

## **Microscopia de fluorescência**

Imagens de microscopia de fluorescência mostraram mais células vermelhas, que sofreram morte celular, em ambos os AL e LC que foram submetidos à CLXt, indicando o efeito antimicrobiano da CLX (Fig.2).

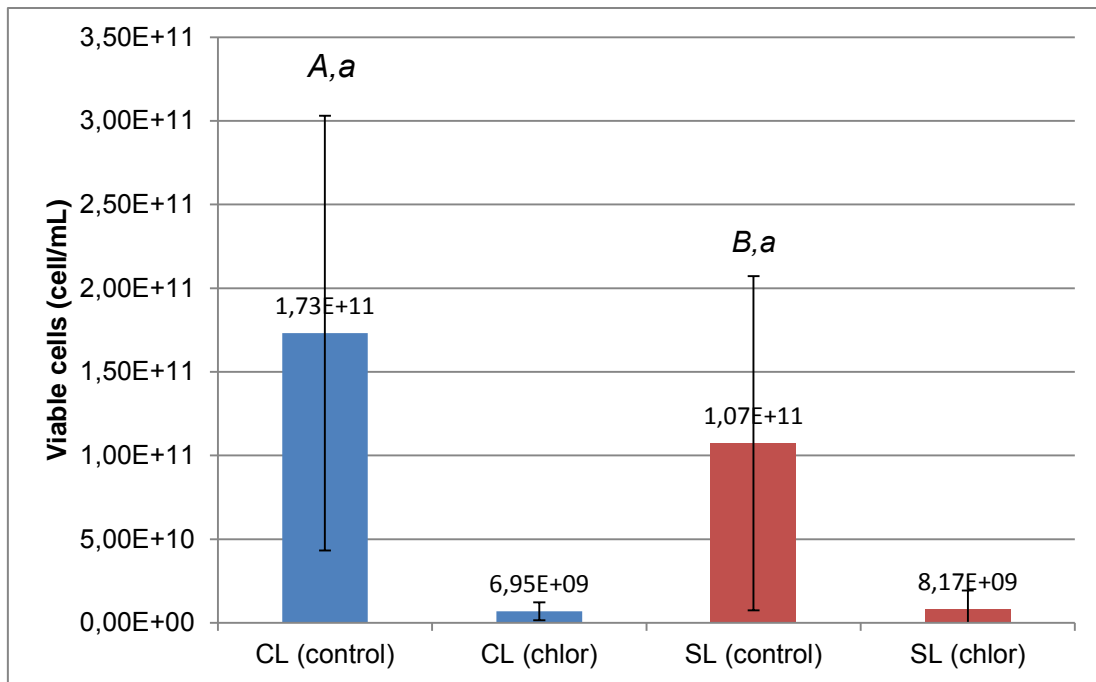


Figura 01. Células viáveis após tratamentos em CL ou SL. A e B indicam diferença significativa entre os bráquetes, a e b indicam diferença significativas entre os tratamentos (ANOVA, Tukey  $p < 0,05$ ).

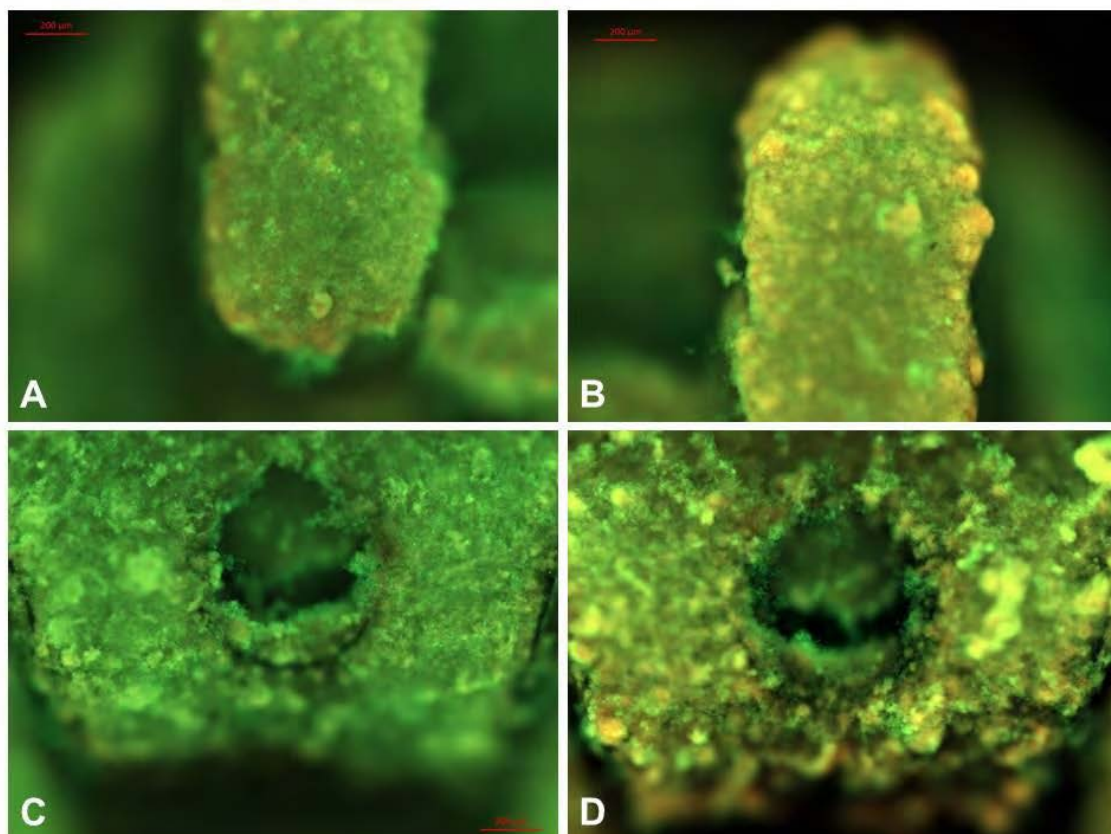


Figura 02. Células viáveis após tratamentos em LC e AL. A-LC após PBSt; B- LC após CLXt; C- AL após PBSt; D- AL após CLXt

## Discussão

O tratamento ortodôntico para a reabilitação funcional e estética facial é muito popular devido à alta prevalência de má oclusão (24), que é baseada no desvio do crescimento harmonioso craniofacial e suas implicações na erupção e implantação correta dos dentes em suas bases ósseas (25). Os pacientes submetidos à terapia ortodôntica fixa experimentam mudanças ecológicas no ambiente oral que os colocam em risco com a saúde oral (5, 19).

Bráquetes criam muitas áreas que abrigam o biofilme dental, tornando muito mais difícil limpar os dentes adequadamente. Os ácidos produzidos por estas bactérias podem não só causar cáries como podem ainda causar inestéticas lesões de mancha branca, áreas de esmalte desmineralizado em torno dos bráquetes. Isto significa que, enquanto os dentes tornam-se alinhados, podem ser irreparavelmente manchados quando os bráquetes são removidos.

Este é um fato relevante, considerando-se que entre 50-75% da população ocidental tem necessidade de tratamento ortodôntico objetivo e / ou subjetivo (25, 26) e o desenvolvimento de novas lesões de mancha branca sobre os dentes anteriores superiores continua a ser um efeito colateral indesejável frequente, afetando 60,9% dos pacientes (14).

Este estudo teve como objetivo avaliar dois tipos de bráquetes ortodônticos metálicos, os convencionais, que tem sua utilização consolidada (9, 26), e os autoligados, que se mostram uma tendência entre ortodontistas clínicos em busca de oferecer um tratamento diferenciado (13). Ênfase foi dada à diferença na adesão de biofilme sobre os bráquetes e sua susceptibilidade à ação antimicrobiana da clorexidina. A seleção de *S. mutans* como microrganismo de teste baseou-se da sua importância na etiologia da cárie dentária (2); seus vários fatores de virulência, como acidogênese e acidúria; maior adaptabilidade ao meio ambiente; presença de adesinas da superfície celular e a produção de matriz extracelular de polissacarídeos (1, 5, 7), dentre outras.

O paciente ortodôntico geralmente apresenta algumas alterações periodontais como efeitos colaterais causados pela dificuldade de higiene, induzindo a um maior acúmulo de biofilme e mudanças qualitativas na flora local (5, 6, 27). Comparando os bráquetes convencionais e autoligados alguns autores sugerem haver maior aderência dos *S. mutans* em braquetes com ligaduras elásticas (9, 28), outros afirmam o contrário (29), além daqueles que não encontram diferenças significativas quanto a este aspecto (27, 30, 31).

Neste estudo houve diferença significativa quanto ao número de colônias *S. mutans* entre AL e LC, sendo que a contagem UFC foi maior em bráquetes com ligaduras elásticas LC do que em AL. De acordo com alguns estudos, os bráquetes autoligados permitem uma melhor higiene (9, 12) e são menos suscetíveis a colonização bacteriana devido à sua forma e ausência de ligaduras elásticas ou amarelo metálico (13).

Dois métodos foram usados para observar este biofilme, contagem de UFC e MF. UFC forneceu uma análise quantitativa que foi capaz detectar a viabilidade das células do biofilme em bráquetes ortodônticos e uma análise comparativa da adesão de *s. mutans* entre AL e LC. A microscopia de fluorescência, uma técnica de imagem utilizada para estudar a dinâmica das células vivas e mortas, mostrou que CLX diminuiu a quantidade de bactérias que vivas na superfície dos bráquetes. Os resultados indicaram que a CLX tem efeito inibidor sobre biofilme *s. mutans* em ambos os grupos AL e LC. A aplicação de CLX durante um minuto não levou à completa erradicação de *s. mutans*, no entanto, o efeito inibitório atingiu níveis significativos estatisticamente indicando os benefícios da presente prescrição como um adjuvante para o controle de biofilmes em pacientes que utilizam os bráquetes ortodônticos apresentados. Embora a literatura recomende a CLX como controle químico padrão (32), é importante ressaltar que seu uso em longo prazo mancha os dentes e língua, além de afetar a sensação gustativa. Sugere-se também o estudo de outros antimicrobianos e agentes anticariogênicos de uso contínuo.

O modelo de biofilme monoespécie foi utilizado para avaliar o efeito antimicrobiano da CLX nas amostras estudadas. Este modelo apresenta-se como uma limitação. No entanto, os fatores inerentes à microbiota oral devem ser minimizados para uma melhor compreensão de cada fenômeno (33). A

ausência de condições que simulem aquelas encontradas na cavidade oral, tal como a presença de saliva, é considerada outra limitação, pois a saliva diminui a afinidade de *S. mutans* aos bráquetes ortodônticos. Portanto, em novos estudos, sugere-se a utilização de saliva artificial (34).

Vale ressaltar que o ortodontista deve informar adequadamente ao paciente sobre os riscos potenciais do tratamento e enfatizar programas preventivos, especialmente a importância da higiene oral. O paciente deve ser motivado a realizar um controle mais intensivo da higiene bucal, usar escova de dente elétrica em combinação com dentífricos fluoretados e enxaguatório antimicrobiano eficaz, não apenas visando a criação de um hálito fresco (14, 16).

Os bráquetes metálicos são atualmente os mais utilizados (35, 36), independentemente do modelo ou prescrição. Embora o conceito não caracterize uma novidade em ortodontia, o sistema autoligado foi mais difundido no início do século XXI (12, 37) ao afirmar a baixa fricção como diferencial, o que facilita o início do movimento dentário por diminuir a resistência inicial ao movimento. Isso tem despertado grande interesse entre os ortodontistas, uma vez que a redução dos níveis de atrito durante o tratamento ortodôntico pode promover um tratamento mais rápido e menor número de visitas ao ortodontista. Apesar das afirmações sobre as vantagens de bráquetes autoligados são poucas as evidências (36). O tempo de cadeira ligeiramente encurtado (13) e vestibularização dos incisivos inferiores (38) parecem ser as únicas vantagens significativas de sistemas autoligados em comparação com os sistemas convencionais que têm suporte na literatura.

Quanto à adesão de biofilme, abordada neste estudo, mesmo que os resultados apontem uma vantagem para AL, isto não é consenso entre os pesquisadores. A escolha do sistema de bráquetes e sua prescrição devem ser norteadas pelo julgamento do profissional, permeada pela sua experiência clínica e por um diagnóstico individualizado. Sua decisão deve contemplar conceitos biológicos e biomecânicos e ser suportada por evidências científicas. Outros estudos alterando o tempo de exposição à CLX, comparando diferentes terapias e outros agentes químicos são aconselháveis.

Adicionalmente, infere-se que este modelo de estudo pode ser eficazmente utilizado para avaliar bráquetes ortodônticos de diferentes

composições, comparação de tipos comerciais, bem como estudar a ação de outros antimicrobianos no futuro.

## *Conclusões*

Em ambos os grupos submetidos à CLXt foi encontrada redução significativa e estatisticamente semelhante na viabilidade de *S. mutans* em comparação com PBSt, indicando a positiva atividade antimicrobiana de CLX para o AL e LC. Ao comparar contagem de UFC entre os grupos houve diferença significativa no número de colônias de *S. mutans*, onde o grupo AL tiveram contagens mais baixas do que o grupo LC, indicando uma vantagem de AL sobre LC relacionada à formação de biofilme cariogênico.

# References

1. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Scientific American*. 1978 Jan;238(1):86-95. PubMed PMID: 635520.
2. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of periodontology*. 1965 May-Jun;36:177-87. PubMed PMID: 14296927.
3. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndaye C. The global burden of oral diseases and risk to oral health. In: Organization WH, editor.: *Bull World Health Organization*; 2005. p. 661-9.
4. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American journal of dentistry*. 2009 Feb;22(1):3-8. PubMed PMID: 19281105.
5. Rego RO, Oliveira CA, dos Santos-Pinto A, Jordan SF, Zambon JJ, Cirelli JA, et al. Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. *American journal of dentistry*. 2010 Dec;23(6):317-23. PubMed PMID: 21344829.
6. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1991 Jul;100(1):35-7. PubMed PMID: 2069145.
7. Theilade E. The experimental gingivitis studies: the microbiological perspective. *Journal of dental research*. 1996 Jul;75(7):1434-8. PubMed PMID: 8876594.
8. Shelley WB. Gingival hyperplasia from dental braces. *Cutis*. 1981 Aug;28(2):149-50. PubMed PMID: 7285623.
9. Shivapuja PK, Berger J. A comparative study of conventional ligation and self-ligation bracket systems. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1994 Nov;106(5):472-80. PubMed PMID: 7977187.
10. Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. *Journal of dental research*. 1970 Mar-Apr;49(2):320-4. PubMed PMID: 5264596.
11. 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*. *European journal of orthodontics*. 1991 Oct;13(5):416-20. PubMed PMID: 1748191.
12. Damon DH. The rationale, evolution and clinical application of the self-ligating bracket. *Clinical orthodontics and research*. 1998 Aug;1(1):52-61. PubMed PMID: 9918646.
13. Paduano S, Cioffi I, Iodice G, Rapuano A, Silva R. Time efficiency of self-ligating vs conventional brackets in orthodontics: effect of appliances and ligating systems. *Progress in orthodontics*. 2008;9(2):74-80. PubMed PMID: 19350061.
14. Enaia M, Bock N, Ruf S. White-spot lesions during multibracket appliance treatment: A challenge for clinical excellence. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2011 Jul;140(1):e17-24. PubMed PMID: 21724067.
15. Vermaire JH, van Loveren C, Brouwer WB, Krol M. Value for money: economic evaluation of two different caries prevention programmes compared with standard care in a randomized controlled trial. *Caries research*. 2014;48(3):244-53. PubMed PMID: 24526078.

16. Costa MR, Silva VC, Miqui MN, Sakima T, Spolidorio DM, Cirelli JA. Efficacy of ultrasonic, electric and manual toothbrushes in patients with fixed orthodontic appliances. *The Angle orthodontist*. 2007 Mar;77(2):361-6. PubMed PMID: 17319775.
17. Kocak MM, Ozcan S, Kocak S, Topuz O, Erten H. Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of streptococcus mutans in saliva. *European journal of dentistry*. 2009 Jan;3(1):57-61. PubMed PMID: 19262732. Pubmed Central PMCID: 2647960.
18. Ullsfoss BN, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rolla G, Afseth J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study. *Scandinavian journal of dental research*. 1994 Apr;102(2):109-12. PubMed PMID: 8016555.
19. Lundstrom F, Krasse B. Caries incidence in orthodontic patients with high levels of Streptococcus mutans. *European journal of orthodontics*. 1987 May;9(2):117-21. PubMed PMID: 3472889.
20. Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Journal of dentistry*. 2010 Jun;38 Suppl 1:S16-20. PubMed PMID: 20621239. Pubmed Central PMCID: 2954231.
21. Grossman E, Meckel AH, Isaacs RL, Ferretti GA, Sturzenberger OP, Bollmer BW, et al. A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *Journal of periodontology*. 1989 Aug;60(8):435-40. PubMed PMID: 2689627.
22. Lakade LS, Shah P, Shirol D. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the Mutans streptococcus count in plaque. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 2014 Apr-Jun;32(2):91-6. PubMed PMID: 24739906.
23. Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on Streptococcus mutans biofilms. *Oral microbiology and immunology*. 2008 Jun;23(3):206-12. PubMed PMID: 18402606.
24. Angle EH. Classification of malocclusion. *Dent Cosmos*. 1899 Mar;41(3):16.
25. Petrovic D, Vukic-Culafic B, Ivic S, Djuric M, Milekic B. Study of the risk factors associated with the development of malocclusion. *Vojnosanitetski pregled Military-medical and pharmaceutical review*. 2013 Sep;70(9):817-23. PubMed PMID: 24266308.
26. Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation--a potential public health threat? *Clinical oral investigations*. 2014 Sep;18(7):1711-8. PubMed PMID: 24728529.
27. Pejda S, Varga ML, Milosevic SA, Mestrovic S, Slaj M, Repic D, et al. Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. *The Angle orthodontist*. 2013 Jan;83(1):133-9. PubMed PMID: 22765511.
28. Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA, Jr., Maier T, et al. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2009 Apr;135(4):426 e1-9; discussion -7. PubMed PMID: 19361723.
29. do Nascimento LE, Pithon MM, dos Santos RL, Freitas AO, Alviano DS, Nojima LI, et al. Colonization of Streptococcus mutans on esthetic brackets: self-ligating vs conventional. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2013 Apr;143(4 Suppl):S72-7. PubMed PMID: 23540639.
30. Pandis N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *European journal of orthodontics*. 2010 Feb;32(1):94-9. PubMed PMID: 19474229.



31. Buck T, Pellegrini P, Sauerwein R, Leo MC, Covell DA, Jr., Maier T, et al. Elastomeric-ligated vs self-ligating appliances: a pilot study examining microbial colonization and white spot lesion formation after 1 year of orthodontic treatment. *Orthodontics : the art and practice of dentofacial enhancement*. 2011 Summer;12(2):108-21. PubMed PMID: 21935504.
32. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*. 1986 Jun;57(6):370-7. PubMed PMID: 3522851.
33. Halawany HS, Abraham NB, Siddiqui YM, Balto HA, Jacob V. Antimicrobial Efficacy of *Salvadora persica* Extracts on a Monospecies Biofilm on Orthodontic Brackets In Vitro. *Oral health & preventive dentistry*. 2015 Mar 18. PubMed PMID: 25789362.
34. Eliades T, Eliades G, Brantley WA. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1995 Oct;108(4):351-60. PubMed PMID: 7572846.
35. Othman SA, Mansor N, Saub R. Randomized controlled clinical trial of oral health-related quality of life in patients wearing conventional and self-ligating brackets. *Korean journal of orthodontics*. 2014 Jul;44(4):168-76. PubMed PMID: 25133131. Pubmed Central PMCID: 4130912.
36. Johansson K, Lundstrom F. Orthodontic treatment efficiency with self-ligating and conventional edgewise twin brackets: a prospective randomized clinical trial. *The Angle orthodontist*. 2012 Sep;82(5):929-34. PubMed PMID: 22397386.
37. Castro RM, Neto PS, Horta MC, Pithon MM, Oliveira DD. Comparison of static friction with self-ligating, modified slot design and conventional brackets. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2013 Jul-Aug;21(4):314-9. PubMed PMID: 24037069. Pubmed Central PMCID: 3881893.
38. Pandis N, Polychronopoulou A, Eliades T. Self-ligating vs conventional brackets in the treatment of mandibular crowding: a prospective clinical trial of treatment duration and dental effects. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2007 Aug;132(2):208-15. PubMed PMID: 17693371.

# APÊNDICE B

## METODOLOGIA DETALHADA DE EXPERIMENTO MICROBIOLÓGICO

Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais.



Ana Paula Dias

Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade CEUMA  
Área de concentração em Ortodontia

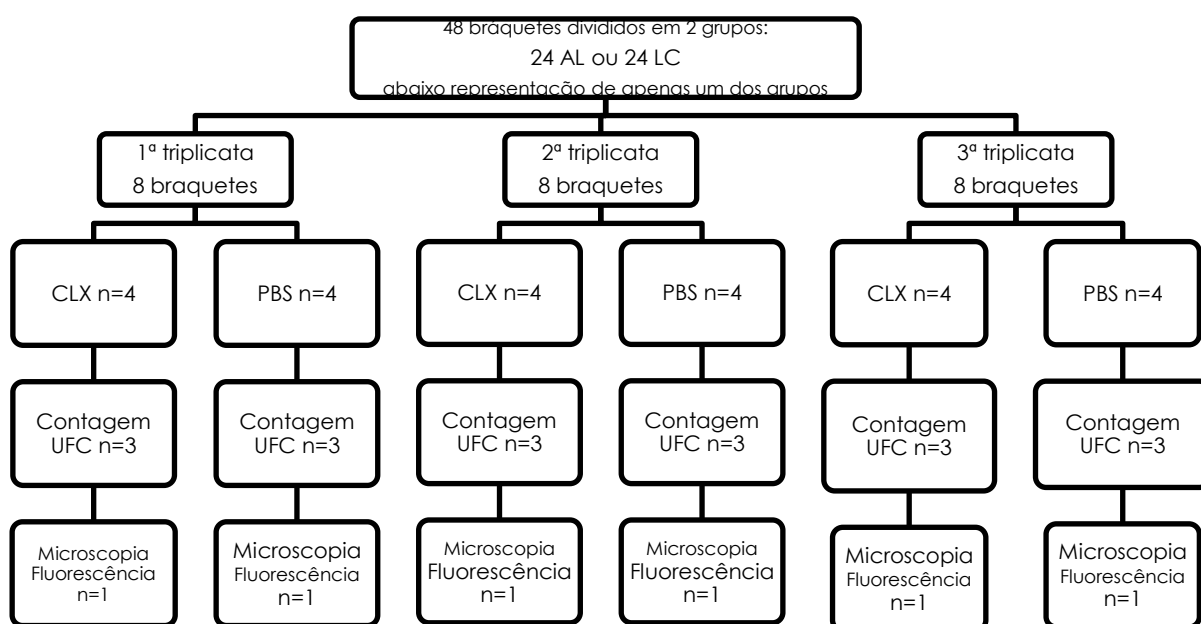
São Luís - 2015

## PROPOSIÇÃO

Este trabalho “METODOLOGIA DETALHADA DE EXPERIMENTO MICROBIOLÓGICO” é parte da dissertação “Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais”, de autoria de Ana Paula Dias, e tem o propósito de descrever detalhadamente os procedimentos realizados neste estudo laboratorial desenvolvido em meu projeto de mestrado em Odontologia da Universidade CEUMA. Contém 13 páginas e 25 ilustrações.

## OBJETIVOS DO ESTUDO

Os objetivos deste trabalho foram investigar se os bráquetes de Ligadura Convencional (LC) e Autoligados (AL) apresentam diferença na adesão de *S. mutans* e avaliar o efeito da clorexidina a 0,12% (CLX) sobre o biofilme de *S. mutans* cultivado nestes dois tipos de bráquetes. MÉTODOS: A amostra foi composta de bráquetes ortodônticos metálicos (n=48) divididos em 2 grupos: AL, Bráquete Autoligado (n=24) e LC, Bráquete de Ligadura Convencional acrescido de ligadura elástica (n=24). Biofilme monoespécie *S. mutans* foi cultivado na superfície de bráquetes por 4 dias (96 horas). Os dois grupos foram submetidos de forma randomizada a dois testes: CLXt, imerso em clorexidina (PerioGard sem álcool, Colgate-Pamolive) por 1 minuto, e PBSt, mergulhado em Salina Tampão Fosfatado por 1 minuto. O efeito antibacteriano da CLX e a comparação da adesão de biofilme foram avaliados através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC), n=36, e da Microscopia de Fluorescência (MF), n=12. Os testes foram realizados em triplicata.



## MATERIAIS

### **Amostras microbiológicas:**

Cultura de *S. mutans* (Cepa UA159) preservada em BHI e conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  com nitrogênio líquido (Fig.1).



Fig.1

### **Amostra de braquetes ortodônticos:**

Braquetes ortodônticos Morelli prescrição Roth Ligth (Fig.2) para incisivos inferiores

Ligadura elástica Morelli tipo bengala incolor

Braquetes ortodônticos Morelli Prescrição Roth SLI - Autoligado Interativo (Fig.3) para incisivos inferiores

### **Materiais de consumo:**

Água destilada

Meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI),

Solução de glicose a 10%

Solução de sacarose a 10%

Solução salina a 0,9%

PBS solução

Solução bucal à base de Gluconato de Clorhexidina a 0,12% (Periogard, Colgate)

Meio de cultura Ágar Sangue (Blood Base Agar)

Sangue de carneiro desfibrinado

Placas de Petri descartáveis 90 X 15 mm lisa/bipartida

Rodinhos (Espalhadores de célula tipo L) para semeadura em ágar

Tubos Falcon de 15ml

Tubos Falcon de 50ml

Ponteiras descartáveis para micropipeta (azuis, brancas e amarelas) (Fig.4)

Microtubos tipo Eppendorf graduados (2,0 mL)

Placa de orifícios com 24 cavidades de fundo chato estéril

Velas ou Sonrisal para criar meio de microaerofilia (5%  $\text{CO}_2$ )

Acendedor Bic

Caneta marcadora para plástico e vidro

Filme plástico PVA

Papel alumínio

### **Instrumentos permanentes:**

Proveta graduada

Béquer graduado

Erlenmeyer graduado

Micropipetas de 1-20 $\mu\text{L}$ , 20-100  $\mu\text{L}$ , 100-1000 $\mu\text{L}$ , 1000-5000 $\mu\text{L}$  (Fig.4)

Bico de Bunsen

Alça para semeadura de microrganismos

Balança de precisão

Jarras para anaerobiose (meio de microaerofilia)

Rack para tubos de ensaio/Suporte para Eppendorf

Garrafas de vidro autoclaváveis para armazenagem de soluções (fig.5)

### **Equipamentos**

Autoclave vertical

Estufa de cultura

Câmara de fluxo laminar vertical

Centrífuga para tubos de ensaio Falcon

Vórtex (Fig.6)

Agitador magnético

Espectrofotômetro

Sonicador



Fig.2



Fig.3

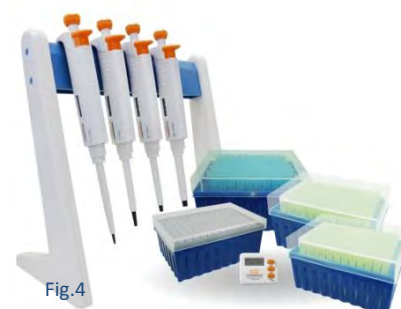


Fig.4

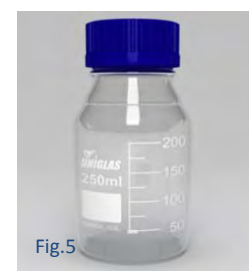


Fig.5



Fig.6

## MATERIAIS MICROBIOLÓGICOS

1. SOLUÇÃO SALINA A 0,9% ou SOLUÇÃO PBS
2. BHI (BRAIN HEART INFUSION)
3. SOLUÇÃO GLICOSADA A 10%
4. SOLUÇÃO DE SACAROSE A 10%
5. BHI + SACAROSE A 1%
6. BHI + GLICOSE A 1%
7. PLACAS DE AGAR SANGUE
8. SOLUÇÃO DE ERITROSINA NA CONCENTRAÇÃO DE 17 µG/ML

## PREPARO DO INÓCULO

### INSTRUMENTAIS E MATERIAIS:

- 3 tubos Falcon de 15 ml (fig.7)
- 2 alças de inoculação
- 1 espalhador de células tipo L (rodinho descartável) (fig.8)
- Rack para tubos Falcon
- Suporte de tubos para jarra
- Jarra de microaerofilia
- Vela ou Sonrisal
- Acendedor
- Caneta marcadora
- Fita adesiva
- 3 placas de Agar Sangue (fig.8)
- 30 ml de BHI + glicose 1%
- Solução Salina
- Recipiente para descarte de materiais contaminados
- Hipoclorito a 1% para o descarte



Fig.7



Fig.8

## PRESERVAÇÃO DA CEPA

Cepas padrão de *S. mutans* (UA159) são estocadas em um freezer a -85°C e fornecido pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade CEUMA e são armazenadas em Eppendorf com meio de cultura BHI acrescido de glicerol a 20%.

## ORGANOGRAMA DA ROTINA DIÁRIA

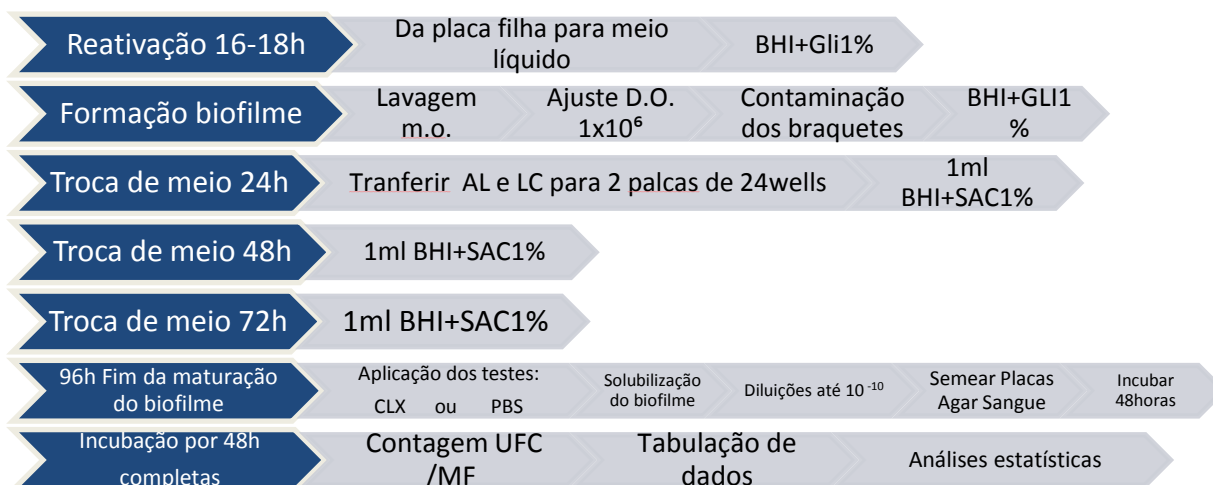


Fig.9 – rotina organizada por dia

## REATIVAÇÃO

Os microrganismos utilizados devem ser descongelados e repicados em meio de cultura e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (fig.10).

Usar Câmara de Fluxo Laminar Vertical higienizada

Preparar 3 tubos Falcon com 10 ml de BHI 1% Glicosado

Degelar o Eppendorf congelado

Pipetar 100-300µL da solução congelada (2X)

Transferir para 2 tubos Falcon preparados

2 tubos = contaminados com *s. mutans* (irão se turvar após incubação)

1 tubo = controle negativo (não deve crescer bactérias após incubação)

Ascender uma vela e acomodá-la dentro da jarra de microaerofilia

Colocar os tubos em suportes de isopor à meia-rosca dentro da jarra de microaerofilia

Fechar a jarra e armazenar em estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> por 18-24 horas

Após este período verificar o turvamento dos tubos e o controle negativo (fig.13).

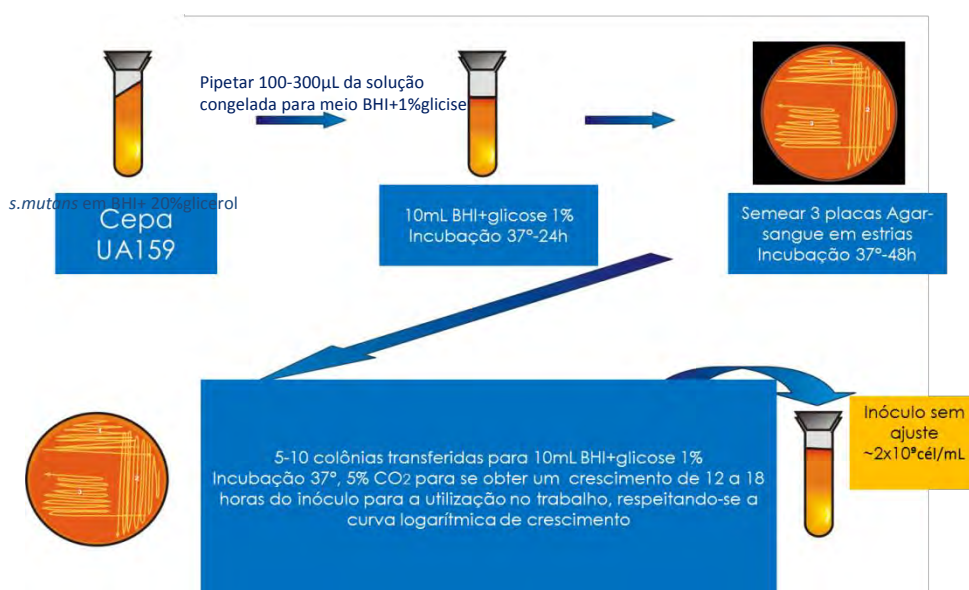


Fig.10



## REPIQUE DE MICRORGANISMOS

Após a incubação e verificação do crescimento microbiológico por meio da turvação do meio de cultura, deve-se semear em estrias (fig.12) em placas de Petri contendo o meio Ágar Sangue e incubadas a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas.

- 2 tubos Falcon já incubados
- 2 Placas de Petri Agar Sangue (fig.11)
- Vórtex
- Ponteiras descartáveis amarelas
- Pipeta de 10-100 µL
- 2 alças de inoculação (fig.11)
- 2 espalhadores de células tipo L (rodinho descartável)
- Rack para tubos Falcon
- Jarra de microaerofilia
- Vela ou Sonrisal
- Acendedor
- Caneta marcadora
- Fita adesiva

Usar Câmara de Fluxo Laminar Vertical higienizada

Homogeneizar os tubos Falcon no Vórtex

Transferir os microrganismos do meio líquido contido nos 2 tubos Falcon com o auxílio de alça de inoculação fazendo estrias na placa de Agar Sangue.

Armazenar em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas.

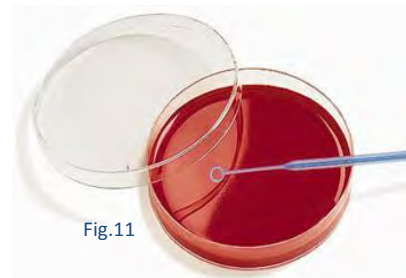


Fig.11

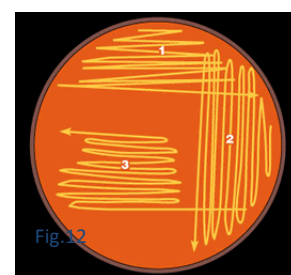


Fig.12

### 1ª GERAÇÃO: DA PLACA DE AGAR PARA MEIO LÍQUIDO BHI 1% GLICOSADO

Será preparado o inóculo das bactérias *S. mutans* adicionando suspensão de bactérias da placa de Agar incubada anteriormente para o meio BHI+1% glicose para se obter um crescimento de 12 a 18 horas do inóculo para a utilização no trabalho, respeitando-se a curva logarítmica de crescimento.

Os microrganismos utilizados no experimento devem ser sempre de origem de um REPIQUE DE PLACA e não do tubo estocado a -80°C. As placas devem estar dentro do período de 1 mês de produzidas e estocadas em geladeira.

Iniciar o procedimento após planejar o horário de lavagem dos m.o. e ajuste de Densidade Óptica para 16 horas depois, que é quando se atinge a curva logarítmica ideal testada para este experimento (1X10<sup>6</sup> células/mL).

Utilizar as placas de Agar incubadas anteriormente

Realizar o procedimento em "Fluxo"

Encaixar 3 tubos Falcon no rack (2 inoculados e um controle)

Pipetar 9 ml de BHI e 1 ml de glicose (9:1) nos 3 tubos de 15ml

Agitar com o vórtex, identificar e datar (2 *S. mutans* e 1 controle).

Retirar de 5-10 colônias da placa de Agar com a alça de inoculação

Flambar o tubo que receberá as colônias e passar a alça no meio de cultura

Tampar e agitar no vórtex

Incubar os tubos, à meia-rosca, em jarra de anaerobiose ou diretamente em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>

A 37°C durante 16 a 20 horas (curva logarítmica deste experimento é **16 horas**)

Ao final do período, verificar crescimento (meio turvo) e o controle (meio límpido)

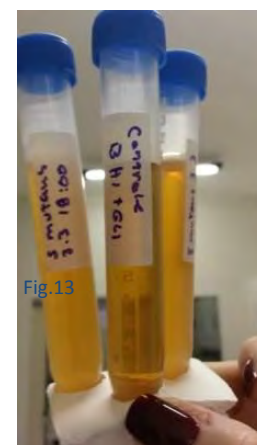


Fig.13

### 2ª GERAÇÃO: DA PLACA DE AGAR PARA MEIO LÍQUIDO BHI 1% GLICOSADO

É a que posso utilizar em experimentos. Fazer 3 placas e deixar até 15 dias em geladeira.

## AJUSTE DE DENSIDADE OPTICA

O objetivo desta etapa é obter suspensões bacterianas padronizadas em uma mesma concentração celular ( $1 \times 10^8$  células/mL).

### Lavagem Do Microrganismo

Homogeneíze no vórtex os dois tubos positivos.

Leve à centrifuga para tubos de 15ml os dois tubos. Encaixe-os em posições antagônicas e, em caso de utilizar somente 1 tubo, providencie um contrapeso.

Ajuste a centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos. Ligue (pressione 3 vezes a tecla "play"»)

Descarte sobrenadante cuidadosamente para que o *pellet* de bactérias (sedimentado) não se desloque do fundo do tubo. Ressuspensa em 10 mL de Solução Salina. Agite o tubo novamente, repita os mesmos passos de centrifugação e ressuspensa em Solução Salina.

Para a preparação do inóculo, ao descartar a solução salina ressuspensa um total de 10 mL de BHI+glicose 1%. A figura 13 mostra alguns detalhes deste processo. A figura 14 mostra uma câmara fluxo laminar preparada para o ajuste de D.O.

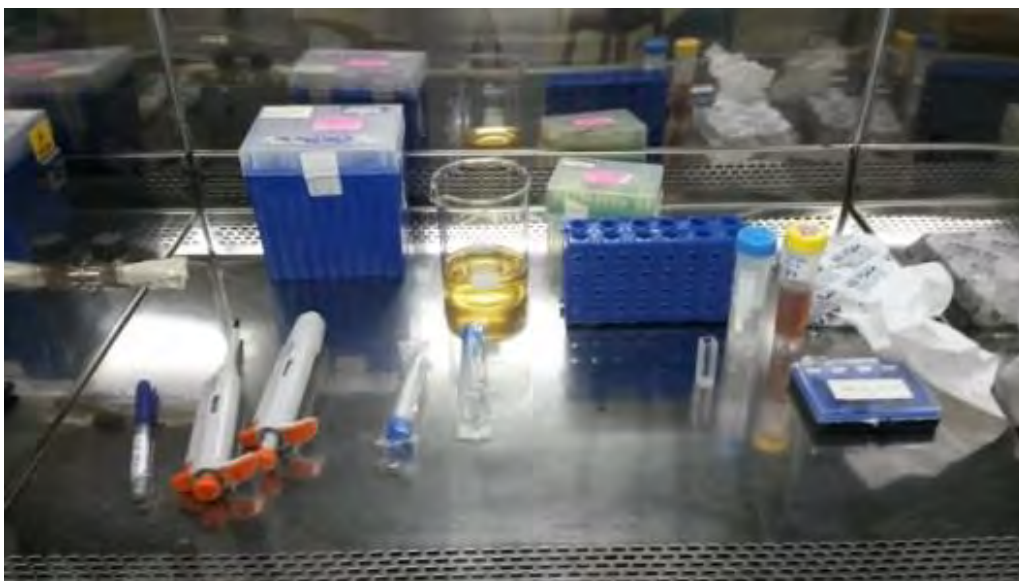


Fig.14



## Leitura do Espectrofotômetro

Tomar como referência o número chave da curva de crescimento:

16<sup>a</sup> hora.....1.24..... 2 X 10<sup>9</sup> bactérias/mL

Ajustar o espectrofotômetro para o comprimento de onda de 540 nm;

Separar uma cubeta e transferir de 2-3 mL de BHI + 1% glucose (1) – BLANK;

Após a lavagem do microrganismo, transferir de 2 mL do lavado para outra cubeta (2);

Colocar as duas cubetas nas gavetas 1 e 2. Após isso, apertar a tecla T com a cubeta BLANK (1) a 0%, logo em seguida apertar a tecla A a 100% (para branquear a amostra). Detalhes na figura 15.

Puxar a haste e realizar a leitura da amostra da cubeta 2. O valor que aparece no display deverá ser transferido para a primeira fórmula:

*Exemplo do cálculo:*

*Tome como exemplo que a cubeta 2 leu o valor de 0.5 (de D.O.);*

*Suponha que vá utilizar o volume de 10 ml para o experimento (poços ou biofilme):*

1.24..... 2 X 10<sup>9</sup> bactérias/mL

0.5 ..... X

X = 0.8 X 10<sup>9</sup> bactérias/mL

*Tomando como base que se quer ajustar o numero bacteriano para 1 X 10<sup>6</sup> bactérias /mL*

1 mL.....0.8 X 10<sup>9</sup>

Y.....1 X 10<sup>6</sup>

Y = 1.25 X 10<sup>-3</sup>mL

1000 µL.....1 mL

Z..... 1.25 X 10<sup>-3</sup>

Z = 1.25 µL

*Para preparar o volume de inóculo ajustado a 1x10<sup>6</sup> bactérias/mL proceder à regra:*

1.25 µL..... 1mL

W.....20mL

W=25 µL

*Preparar um tubo Falcon de 20 mL contendo BHI + 1% glucose com um volume de 20 mL.*

*Retirar dele 25 µL e completar a 20 ml (ou seja, adicionar 25 µL) de bactéria. A partir disso terá preparado um inóculo contendo o volume final de 20 mL com um número bacteriano ajustado a 1 X 10<sup>6</sup> bactérias /mL.*



Pelet e ressuspensão em BHI+glicose 1%



blank      2x10<sup>9</sup>cél/mL



Leitura do espectrofotômetro

Cálculos para ajuste

Encontrar volume total de inóculo para contaminar os bráquetes



1X10<sup>6</sup> células/mL

Ana Paula Dias, 2015

Obtenção de suspensões bacterianas padronizadas em uma mesma concentração celular (1X10<sup>6</sup> células/mL).

Fig.15

## SITUAÇÃO EXPERIMENTAL

A amostra composta de bráquetes ortodônticos metálicos (n=48) são divididos em 2 grupos:

AL: Bráquete Autoligado (Roth SLI - Autoligado Interativo, Morelli, BR) (n=24)

LC: Bráquete Ligadura Convencional (Roth Ligth Mini, Morelli, BR) acrescido de ligadura elástica (Morelli, BR) (n=24).

Biofilme monoespécie *S. mutans* cultivado na superfície de bráquetes por 4 dias (96 horas).

Os dois grupos submetidos de forma randomizada a dois testes:

CLXt: Bráquete imerso em clorexidina (PerioGard sem álcool, Colgate-Pamolive) por 1 minuto.

PBS: Bráquete imerso em Salina Tampão Fosfatado por 1 minuto.

Avaliação do efeito antibacteriano da CLX e a comparação da formação de biofilme em AL e LC:

UFC: Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (n=36)

MF: Microscopia de Fluorescência (n=12)

A figura 16 apresenta o fluxograma:

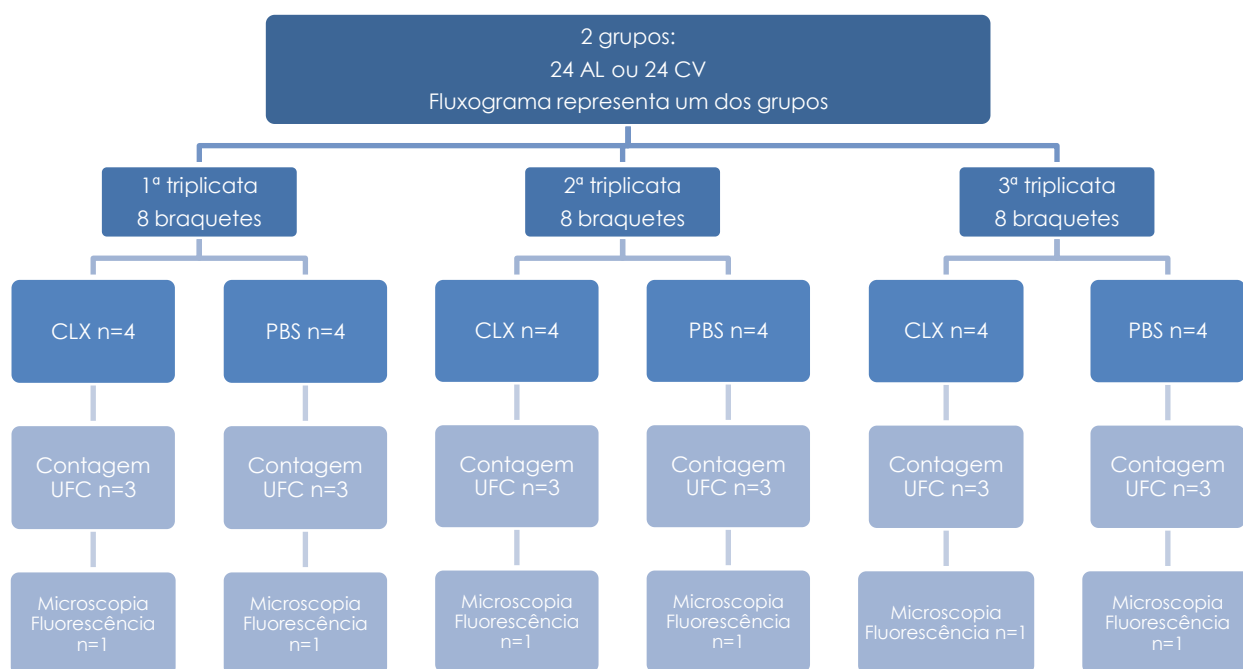


Fig.16 – Fluxograma do experimento

## FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DO BIOFILME

Esterilizar bráquetes em autoclave. Os braquetes convencionais devem estar com os elásticos adaptados no slot mimetizando a situação clínica.

Posicionar 4 bráquetes da triplicata em placa de 24 poços com 1000µL de suspensão de microrganismos em BHI com 1% de glicose à concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/ml (padrão 0,5 McFarland a 540nm) em cada poço.

Trabalhar no Fluxo laminar. Usar uma placa para cada grupo. Identificar.

A placa deve ser incubada em condições anaeróbias a 37°C, tal como uma cultura estática durante 24h para a formação de biofilme.

O processo de maturação de biofilme segue-se transferindo os bráquetes a cada 24 horas para uma nova célula contendo 1000µL de BHI com 1% de sacarose e incubadas até completar 96 horas (fig.17).

Imediatamente após este período todos os grupos estão prontos para testes.

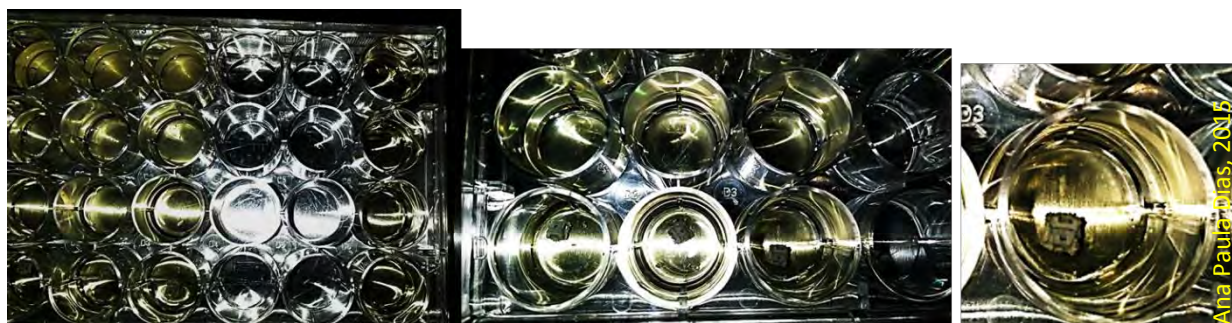


Fig.17 – Placa de 24 poços ao final das 96 horas de maturação do biofilme

Após os testes ou terapias os resultados serão analisados pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) realizadas por triplicata em 3 momentos (n=9 por grupo) e microscopia de fluorescência (n=3 por grupo).

## ANÁLISE DOS ACHADOS

### CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

#### Coleta dos microrganismos

Imediatamente após a aplicação das terapias, individualmente, os braquetes são transferidos para um tubo Falcon com 5 ml de PBS e submetidos ao sonicador fixado em suporte, ajustado na amplitude 40, por 3 pulsos de 15 segundos, com intervalos de 15 segundos, auxiliado pelo cronômetro. Ilustrado na figura 18.



Fig.18 – detalhes da solubilização do biofilme e Eppendorfs usados na diluição seriada.

## Diluição seriada

Agitar e transferir 100µL deste meio para um Eppendorf com 900µL de solução salina estéril e, então, diluir em série 10 vezes, até  $10^{10}$ , em Eppendorfs contendo 900µL de solução tampão PBS estéril. Isto é feito pipetando 100µL da diluição anterior, após agitá-la no Vórtex por 30 segundos.

Diluições as serem plaqueadas de cada terapia:

CLX: 3 – 4 – 5

PBS: 4 – 5 – 6

Serão usadas placas de Petri divididas (bipartidas). Semear cada placa com uma mesma diluição pipetando 25 µL em cada parte, espalhando com o rodinho L (fig.20) e identificar diluição, terapia e grupo. As placas serão levadas à estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia obtida pelo método do Sonrisal para análise da efetividade das terapias testadas (fig.21).

A figura 19 representa o desenho esquemático do processo.

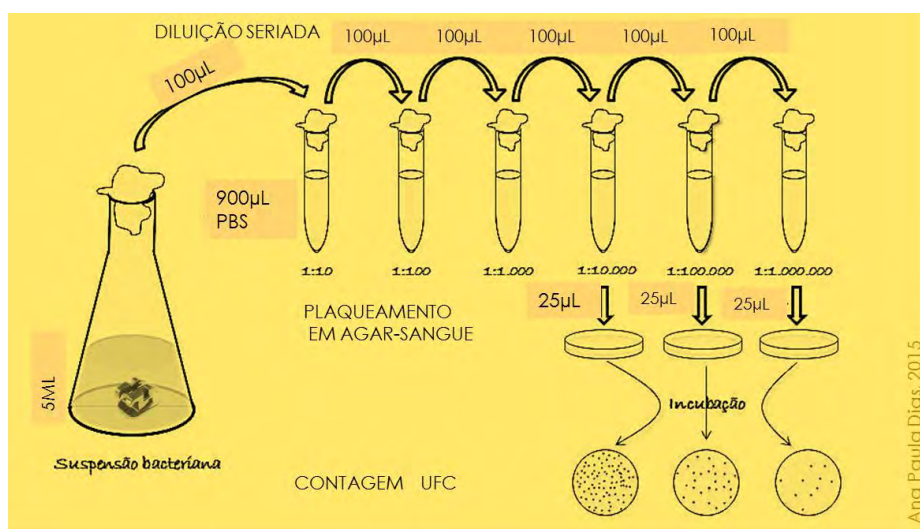


Fig.19 – Desenho esquemático da diluição seriada e plaqueamento



Fig.20



Fig.21



## MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

### MATERIAIS

Microscópio de fluorescência Axio Imager Z2; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha (fig.22).

kit de viabilidade Live/Dead BacLight (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) (fig.23).

PBS

### PROCEDIMENTOS:

Depois de submetido à situação experimental 1 bráquete de cada grupo (AL ou LC), por triplicata, contendo biofilme cuidadosamente preservado, é lavado duas vezes com PBS.

Colocar o bráquete em recipiente (pocinho da placa 24 wells) contendo 2mL dos corantes do kit Live/Dead:

SYTO-9

iodeto de propídio

Incubar as amostras durante 20 minutos a 35°C, protegidas da luz.

Levar o bráquete ao microscópio utilizando filtros específicos:

488/507nm para detecção de SYTO 9 e

503/615nm para a detecção de iodeto de propídio e

As amostras serão examinadas em ampliação de 63,4X.

Células verdes indicados viabilidade, vermelho eram as células mortas. A figura 24 exemplifica uma imagem de microrganismos corados com este processo.



Fig.22



Fig.23

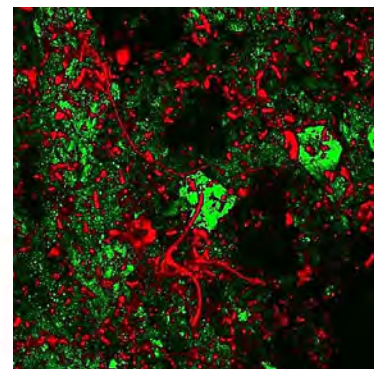


Fig.24

Abaixo o modelo da tabela de anotações da contagem de colônias (fig. 25).

1ª TRIPLICATA - RESULTADOS DA CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS/100µL – DATA:													
	AUTOLIGADO	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CLX	ALB1												
	ALB2												
	ALB3												
PBS	ALB1												
	ALB2												
	ALB3												
	CONVENCIONAL	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CLX	CVB1												
	CVB2												
	CVB3												
PBS	CVB1												
	CVB2												
	CVB3												

2ª TRIPLICATA - RESULTADOS DA CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS/100µL – DATA:													
	AUTOLIGADO	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CLX	ALB1												
	ALB2												
	ALB3												
PBS	ALB1												
	ALB2												
	ALB3												
	CONVENCIONAL	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CLX	CVB1												
	CVB2												
	CVB3												
PBS	CVB1												
	CVB2												
	CVB3												

3ª TRIPLICATA - RESULTADOS DA CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS/100µL – DATA:													
	AUTOLIGADO	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CLX	ALB1												
	ALB2												
	ALB3												
PBS	ALB1												
	ALB2												
	ALB3												
	CONVENCIONAL	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CLX	CVB1												
	CVB2												
	CVB3												
PBS	CVB1												
	CVB2												
	CVB3												

Fig. 25 - Tabela de anotações de resultados das contagens de UFC

ESTE TRABALHO REPRESENTA O ANEXO II DA PESQUISA “Colonização de *Streptococcus mutans* e avaliação da ação antimicrobiana da clorexidina em bráquetes metálicos autoligados e convencionais”.

Ana Paula Dias, Julho-2015 [ortoanapaula@gmail.com](mailto:ortoanapaula@gmail.com)

**INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

Missão, escopo e política de submissão

Apresentação do manuscrito

Características e formatação dos tipos de manuscritos

Termo de transferência de direitos autorais e declarações de responsabilidade

Exemplos de referências

**MISSÃO, ESCOPO E POLÍTICA DE SUBMISSÃO**

A Brazilian Oral Research - BOR (versão online ISSN 1807-3107) é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO (Divisão brasileira da International Association for Dental Research - IADR). A revista tem classificação B1 Qualis Capes (Odontologia), Fator de Impacto™ 0,774 (Institute for Scientific Information - ISI), é revisada por pares (sistema duplo-cego) e tem como missão disseminar e promover o intercâmbio de informações sobre as diversas áreas da pesquisa odontológica e com acesso aberto, modalidade dourada, sem embargo.

A BOR convida à submissão os seguintes tipos de artigos originais e de revisão, nas seguintes tipologias: Pesquisa Original (artigo completo ou Short Communication), Revisão Crítica da Literatura, Revisão Sistemática (e Meta-Análise), além de Cartas ao Editor. Todas as submissões deverão ser exclusivas à BOR.

A submissão dos manuscritos, e de toda documentação relacionada, deve ser realizada exclusivamente pelo ScholarOne Manuscripts™, através do link de submissão online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>).

O processo de avaliação do conteúdo científico do manuscrito será iniciado somente após o atendimento dos requisitos descritos nestas Instruções aos Autores. O manuscrito em desacordo com estes requisitos será devolvido ao autor de correspondência para adequações.

Importante: Após ser aceito por seu mérito científico, todo manuscrito deverá ser submetido a uma revisão gramatical e estilística do idioma inglês; recomendamos as empresas abaixo. Os autores deverão encaminhar o texto revisado juntamente com o certificado de revisão fornecido pela empresa de edição escolhida. Não serão aceitas revisões linguísticas realizadas por empresas que não forneçam o certificado. Exceção a esta regra é feita quando o autor de correspondência é native English speaker.

<http://oficinadotexto.webnode.com.br>

[ncris.mart@uol.com.br](mailto:ncris.mart@uol.com.br) (NCristina Martorana Traduções S/C Ltda.)

[www.aje.com](http://www.aje.com)

[www.biomeditor.com](http://www.biomeditor.com)

[www.enago.com.br](http://www.enago.com.br)

[www.ic.com.br](http://www.ic.com.br)

[www.internationalscienceediting.com](http://www.internationalscienceediting.com)

[www.sciencedocs.com](http://www.sciencedocs.com)

[www.scientific-editor.com](http://www.scientific-editor.com)

[www.writescienceright.com](http://www.writescienceright.com)

## APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

O texto do manuscrito deverá estar redigido em inglês e fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).

Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Arquivos de vídeo poderão ser submetidos, respeitando as demais especificidades, inclusive o anonimato dos autores (para fins de avaliação) e respeito aos direitos dos pacientes.

Importante: o ScholarOne permite que o conjunto dos arquivos somem no máximo 10 MB. No caso de a inclusão do arquivo de vídeo acarretar em tamanho superior, é possível informar o link de acesso ao vídeo. Na reprodução de documentação clínica, o uso de iniciais, nomes e/ou números de registro de pacientes são proibidos. A identificação de pacientes não é permitida. Um termo de consentimento esclarecido, assinado pelo paciente, quanto ao uso de sua imagem deverá ser fornecido pelo(s) autor(es) quando solicitado pela BOR. Ao reproduzir no manuscrito algum material previamente publicado (incluindo textos, gráficos, tabelas, figuras ou quaisquer outros materiais), a legislação cabível de Direitos Autorais deverá ser respeitada e a fonte citada.

As seções do manuscrito devem ser apresentadas observando-se as características específicas de cada tipo de manuscrito: folha de rosto (Title Page), introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências.

Folha de rosto (Title Page; dados obrigatórios)

Indicação da especialidade\*, ou área de pesquisa, enfocada no manuscrito.

\*Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia - Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatrics; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.

Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.

Nomes completos e por extenso de todos os autores (os mesmos informados no Termo de Transferência de Direitos Autorais e nas Declarações de Responsabilidade), incluindo os respectivos números de telefone e endereços eletrônicos (email). Recomenda-se aos autores confrontar seus nomes anotados no Termo de Transferência com o perfil criado no ScholarOne™, de modo a evitar incompatibilidades.



A participação de cada um dos autores deverá ser justificada por escrito em folha separada (e fornecida num arquivo PDF), observando-se os critérios de autoria e co-autoria adotados pelo International Committee of Medical Journal Editors, disponíveis em <http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>

Dados de afiliação institucional/profissional de todos os autores, incluindo universidade (ou outra instituição), faculdade/curso, departamento, cidade, estado e país, apresentados de acordo com as normas internas de citação estabelecidas pela instituição de cada um dos autores. Verificar se as afiliações foram inseridas corretamente no ScholarOne.

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (mas sem sub-divisões em seções), contendo proposição do trabalho, metodologia, resultados e conclusões. No Sistema, utilizar a ferramenta Special characters para caracteres especiais, se aplicável.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <http://decs.bvs.br/> ou <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> (não serão aceitos sinônimos).

#### Texto Principal

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Nos manuscritos que envolvam radiografias, microrradiografias ou imagens de MEV, devem ser incluídas as seguintes informações: fonte de radiação, filtros e níveis de kV utilizados. Os manuscritos que relatem estudos em humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (World Medical Association, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Estudos observacionais devem seguir as diretrizes STROBE (<http://stroke-statement.org/>) e o check list deve ser submetido. Ensaios clínicos devem ser relatados de acordo com o protocolo padronizado da CONSORT Statement (<http://www.consort-statement.org/>), revisões sistemáticas e meta-análises deveriam seguir o PRISMA

(<http://www.prisma-statement.org/>" target="\_blank"><http://www.prisma-statement.org/>), ou Cochrane (<http://www.cochrane.org/>).

#### Ensaio Clínico

Os ensaios clínicos segundo as diretrizes CONSORT disponíveis em [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro da pesquisa serão publicados com o artigo.

Manuscritos que relatem a realização de estudos em animais devem também incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida de maneira ética, e o número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Caso a pesquisa envolva um registro gênico, antes da submissão, as novas sequências genéticas devem ser incluídas num banco de dados público, e o número de acesso deve ser fornecido à BOR. Os autores poderão utilizar as seguintes bases de dados:

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit>

EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>

DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

As submissões de manuscritos que incluam dados de microarray devem incluir a informação recomendada pelas diretrizes MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment - <http://www.mged.org/index.html>) e/ou descrever, na forma de itens, como os detalhes experimentais foram submetidos a uma das bases de dados publicamente disponíveis, tais como:

ArrayExpress: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção "Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou RTF.

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Conclusões: devem ser apresentadas concisamente e estar estritamente fundamentadas nos resultados obtidos na pesquisa. O detalhamento dos resultados, incluindo valores numéricos etc., não deve ser repetido.

Agradecimentos: as contribuições de colegas (por assistência técnica, comentários críticos etc.) devem ser informadas, e qualquer vinculação de autores com firmas comerciais deve ser revelada. Esta seção deve descrever a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa, incluindo os respectivos números de processo.

#### Plágio

A BOR emprega um sistema de detecção de plágio. Ao enviar o seu manuscrito para a Revista, este manuscrito poderá ser rastreado. Isto não tem relação com a simples repetição de nomes / filiações, mas envolve frases ou textos utilizados.

Referências: só serão aceitas como referências as publicações em periódicos revisados por pares. Não serão aceitos como referências manuscritos em processo de redação, dissertações, teses, ou resumos apresentados em congressos. Devem ser evitadas referências a livros.

As citações de referências devem ser identificadas no texto por meio de números arábicos sobrescritos. A lista completa de referências deve vir após a seção de "Agradecimentos", e as referências devem ser numeradas e apresentadas de acordo com o Estilo Vancouver, em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo International Committee of Medical Journal Editors, conforme apresentadas em Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o List of Journals Indexed in Index Medicus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). A correta apresentação das referências é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Grafia de termos científicos: nomes científicos (binômios de nomenclatura microbiológica, zoológica e botânica) devem ser escritos por extenso, bem como os nomes de compostos e elementos químicos, na primeira menção no texto principal.

Unidades de medida: devem ser apresentadas de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (<http://www.bipm.org> ou <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

Notas de rodapé no texto principal: devem ser indicadas por meio de asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Figuras: fotografias, micrografias e radiografias devem ter uma largura mínima de 10 cm, resolução mínima de 500 dpi, e devem ser fornecidas em formato TIFF. Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais devem ser fornecidos em formato PDF. Todas as figuras devem ser submetidas, individualmente, em arquivos separados (não inseridas no arquivo de texto). As figuras devem ser numeradas e citadas consecutivamente no corpo do texto, em algarismos arábicos. As legendas das figuras devem ser inseridas todas juntas no final do texto, após as referências.

## CARACTERÍSTICAS E FORMATAÇÃO DOS TIPOS DE MANUSCRITOS

### Pesquisa Original

Devem ser limitados a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Será aceito um máximo de 8 (oito) figuras e 40 (quarenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

### Formatação - Arquivos de Texto

Folha de rosto (Title Page)

Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)

Resumo - máximo de 250 palavras

Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais

Introdução

Metodologia

Resultados

Discussão

Conclusão

Agradecimentos

Tabelas

Referências - máximo de 40 referências

Legendas de figuras

### Formatação - Arquivos de figuras

Figuras - máximo de 8 (oito) figuras, conforme descrito acima, naquelas submissões onde o número de figuras exceder o máximo permitido, os autores devem incluir a justificativa na Cover Letter.

Resumo de Pesquisa Original (Short Communication)

Devem ser limitados a 10.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). É permitido um máximo de 2 (duas) figuras e 12 (doze) referências. O resumo deve conter, no máximo, 100 palavras.

Formatação - Arquivos de texto

Folha de rosto

Texto principal (10.000 caracteres incluindo espaços)

Resumo - máximo de 100 palavras

Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais

Introdução

Metodologia

Resultados

Discussão

Conclusão

Agradecimentos

Tabelas

Referências - máximo de 12 referências

Legendas de figuras

Formatação - Arquivos de figuras

Figuras - máximo de 2 (duas) figuras, conforme descrito acima, naquelas submissões onde o número de figuras exceder o máximo permitido, os autores devem incluir a justificativa na Cover Letter.

Revisão Crítica de Literatura

A submissão desse tipo de manuscrito será realizada apenas a convite da Comissão de Publicação da BOR. Todos os manuscritos serão submetidos à revisão por pares. Esse tipo de manuscrito deve ter um conteúdo descritivo-discursivo, com foco numa apresentação e discussão abrangente de questões científicas importantes e inovadoras, e ser limitado a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Incluir uma apresentação clara do objeto científico de interesse, argumentação lógica, uma análise crítica metodológica e teórica dos estudos e uma conclusão resumida. É permitido um máximo de 6 (seis) figuras e 50 (cinquenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação - Arquivos de texto

Folha de rosto

Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)

Resumo - máximo de 250 palavras

Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais

Introdução

Metodologia

Resultados

Discussão

Conclusão

Agradecimentos

Tabelas

Referências - máximo de 50 referências

Legendas de figuras

#### Formatação - Arquivos de figuras

Figuras - máximo de 6 (seis) figuras, conforme descrito acima, naquelas submissões onde o número de figuras exceder o máximo permitido, os autores devem incluir a justificativa na Cover Letter.

#### Carta ao Editor

Cartas devem incluir evidências que sustentem a opinião do(s) autor(es) sobre o conteúdo científico ou editorial da BOR, e ser limitadas a 500 palavras. Figuras ou tabelas não são permitidas.

#### TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS E DECLARAÇÕES DE RESPONSABILIDADE

O manuscrito submetido para publicação deve ser acompanhado do Termo de Transferência de Direitos Autorais e Declarações de Responsabilidade, disponível no sistema online e de preenchimento obrigatório.

#### TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS E DECLARAÇÕES DE RESPONSABILIDADE

À Comissão de Publicação da Brazilian Oral Research (BOR)

Os autores submetem o manuscrito original à Brazilian Oral Research - BOR, representada pela Comissão de Publicação do periódico, e atestam que o manuscrito ora submetido é original e não infringe patente, marca registrada, direito autoral, segredo comercial ou quaisquer outros direitos proprietários de terceiros.

Os Autores também declaram que, exceto quando explicitamente informado, não têm qualquer interesse financeiro ou acordo com qualquer entidade que possa ser percebido como tendo influência sobre a objetividade do manuscrito, a não ser que tal interesse financeiro ou acordo tenha sido revelado por escrito à BOR, em documento separado e firmado por todos os Autores, conforme diretrizes internacionais (<http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>).

Os Autores declaram ainda que o estudo, cujos resultados estão relatados no manuscrito, foi realizado observando-se as políticas, vigentes nas instituições às quais os Autores estão vinculados, relativas ao uso de humanos e/ou animais, e/ou material derivado de humanos ou animais (Aprovação em Comitê de Ética Institucional).

Os Autores concordam em indenizar a BOR e em eximi-la de quaisquer alegações, custos, honorários advocatícios, indenizações ou custos de licenças de utilização incorridos pela BOR em consequência de qualquer alegação, infração de direitos, ou não observância das determinações do Comitê de Ética Institucional ocasionadas pela publicação, em todo ou em parte, do Manuscrito.

#### "CHECKLIST" PARA SUBMISSÃO INICIAL

Arquivo de folha de rosto (Title Page, em formato DOC, DOCX ou RTF).

Arquivo do texto principal (Main Document, manuscrito), em formato DOC, DOCX ou RTF.

Tabelas, em formato DOC, DOCX ou RTF.

Declaração de interesses e de financiamento, submetida em um documento separado e em formato PDF. (se aplicável)

Justificativa para a participação de cada um dos autores, fornecida em um documento separado e em formato PDF.

Fotografias, micrografias e radiografias (largura mínima de 10 cm e resolução mínima de 500 DPI) em formato TIFF. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images/>)

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais em formato PDF.

Cada uma das figuras deve ser submetida em arquivos separados e individuais (não inseridas no arquivo de texto).

#### EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

## Periódicos

Coracci C, Tavares AU, Fabianelli A, Monticelli F, Raffaelli O, Cardoso PC, et al. The adhesion between fiber posts and root canal walls: comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. *Eur J Oral Sci.* 2004 Aug;112(4):353-61.

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics.* 2005;115(2 Suppl):519-617. DOI:10.1542/peds.2004-1441.

Usunoff KG, Itzev DE, Rolfs A, Schmitt O, Wree A. Nitric oxide synthase-containing neurons in the amygdaloid nuclear complex of the rat. *Anat Embryol (Berl).* 2006 Oct 27. Epub ahead of print. DOI: 10.1007/s00429-006-0134-9

Walsh B, Steiner A, Pickering RM, Ward-Basu J. Economic evaluation of nurse led intermediate care versus standard care for post-acute medical patients: cost minimisation analysis of data from a randomised controlled trial. *BMJ.* 2005 Mar 26;330(7493):699. Epub 2005 Mar 9.

### Artigos com Título e Texto em Idioma Diferente do Inglês

Li YJ, He X, Liu LN, Lan YY, Wang AM, Wang YL. [Studies on chemical constituents in herb of *Polygonum orientale*]. *Zhongguo Ahong Yao Za Zhi.* 2005 Mar;30(6):444-6. Chinese.

### Suplementos ou Edições Especiais

Pucca Junior GA, Lucena EHG, Cawahisa PT. Financing national policy on oral health in Brazil in the context of the Unified Health System. *Braz Oral Res.* 2010 Aug;24 Spec Iss 1:26-32.

### Periódicos Online

Barata RB, Ribeiro MCSA, De Sordi M. Desigualdades sociais e homicídios na cidade de São Paulo, 1998. *Rev Bras Epidemiol.* 2008;11(1):3-13 [cited 2008 Feb 23]. Available from: <http://www.scielosp.org/pdf/rbepid/v11n1/01.pdf>.

### Livros

Stedman TL. *Stedman's medical dictionary: a vocabulary of medicine and its allied sciences, with pronunciations and derivations.* 20th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961. 259 p.

### Livros Online

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

### Websites

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Brasília (DF): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010 [cited 2010 Nov 27]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>.

World Health Organization [homepage]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2011 Jan 17]. Available from: <http://www.who.int/en/>.