

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Vinícius Costa Nacif

**AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM PACIENTES FISSURADOS
SUBMETIDOS À EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA**

Belo Horizonte

2014

Vinícius Costa Nacif

**AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM PACIENTES FISSURADOS
SUBMETIDOS À EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares

Coorientador: Prof. Dr. Dauro Douglas Oliveira

Belo Horizonte

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

N124a

Nacif, Vinícius Costa

Avaliação de microrganismos em pacientes fissurados submetidos à expansão rápida da maxila / Vinícius Costa Nacif. Belo Horizonte, 2014. 46 f. : il.

Orientador: Rodrigo Villamarim Soares

Coorientador: Dauro Douglas Oliveira

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Lábio leporino. 2. Fenda palatina. 3. Microorganismos. 4. Técnicas de expansão palatina. 5. Cirurgia Doença periodontal. I. Soares, Rodrigo Villamarim. II. Oliveira, Dauro Douglas. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Vinícius Costa Nacif

**AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM PACIENTES FISSURADOS
SUBMETIDOS À EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Ortodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota – UFMG
- 2- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 27 de novembro de 2014

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 20 de janeiro de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
Orientador

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

AGRADECIMENTOS

A Deus que esteve ao meu lado durante todos os momentos da minha caminhada.

A Daiana, pelo companheirismo, amor e dedicação durante todos esses anos. Você é a maior responsável por este momento em minha vida, muito obrigado!

Aos meus pais, Tânia e Rogério, pelo amor e carinho.

Ao meu irmão, Michel, pelo exemplo de dedicação, persistência e perseverança.

Ao Sander, pela convivência, amizade e respeito.

Aos demais familiares, pelo carinho e por compreenderem a minha ausência em momentos especiais.

Ao meu orientador Rodrigo Villamarim Soares, pela orientação e confiança. Agradeço a disponibilidade mesmo em momentos difíceis.

Ao meu coorientador, Prof. Dauro Oliveira, por sua grande contribuição não somente em relação a este trabalho, mas também na minha formação como ortodontista.

Ao Prof. Fernando de Oliveira Costa e Prof. José Roberto Cortelli pelo apoio, disponibilidade e por viabilizar a análise microbiológica do nosso estudo.

A FAPEMIG pelo auxílio financeiro fundamental para a realização deste Curso.

A associação dos ex-alunos do COP (ORTOCOP), pelo apoio incondicional na busca da excelência dos alunos e ex-alunos e pelos momentos de confraternização.

Ao professor Dr. Hélio, pelo exemplo de pessoa e profissional a ser seguido.

Ao professor José Eymard pela confiança e dedicação.

Ao professor Ildeu Andrade Jr. pelo exemplo de profissional e ensinamentos.

Aos demais professores do Mestrado em Ortodontia, Armando Lima, Bernardo Souki, Flávio Almeida, Heloísio Leite, José Mauricio Vieira e Tarcísio Junqueira pelos valiosos ensinamentos, incentivo e dedicação com a profissão.

Aos amigos da Turma XIV, Gabriela, Lis, Marcel, Natália, Paula e Pedro pela convivência harmoniosa, companheirismo e amizade.

Aos alunos do COP, Turmas XII, XIII, XV e XVI, em especial o Gabriel Couto, pela amizade e respeito.

Aos funcionários da PUC Minas, pela amizade, atenção e dedicação.

Ao Alcides, pela contribuição nesse estudo e por ser sempre prestativo durante todo o período que esteve conosco.

Ao Marcinho, meu sincero agradecimento por sua disponibilidade e dedicação na reta final deste estudo.

Finalmente, aos pacientes do Mestrado em Ortodontia da PUC Minas, pelo convívio ao longo destes anos. Especial agradecimento aos pacientes do CENTRARE, que tiveram grande importância nesse trabalho, obrigado pela confiança depositada aos alunos e professores do Mestrado em Ortodontia da PUC Minas.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar microrganismos na cavidade oral em pacientes com fissura labiopalatina (FLP) antes e após a expansão rápida da maxila (ERM). A amostra foi composta de 28 pacientes portadores de FLP unilateral com atresia maxilar e faixa etária variando de 8 a 15 anos. ERM foi realizada com disjuntor Hyrax e Mini-Hyrax Invertido. Os microrganismos avaliados foram: *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis* e Primer Universal. As coletas dos microrganismos foram feitas em dois sítios específicos e a análise microbiológica foi realizada através de PCRRT. Os pacientes foram avaliados antes da cimentação do disjuntor (T0) e após a ERM (T1). Para análise estatística, foram ajustadas regressões marginais log-lineares. O nível de significância foi de 5%. Os resultados em relação a carga total bacteriana, intra-grupos revelou que D2 no gênero masculino de T0 para T1 e naqueles que utilizaram Hyrax exibiu um aumento significativo. Na análise inter-grupos foi observado que D1 apresentava uma carga total significativamente maior que D2 no gênero masculino em T0, e também, naqueles que utilizaram Hyrax. *S.oralis*, na análise inter-grupos, considerando o tempo, D1 apresentou valores significativamente menores que D2 em T0. Adicionalmente, a análise estratificada também revelou que D1 em T0 em ambos os gêneros, faixa etária de 8 a 11 anos, e naqueles que usaram Mini Hyrax Invertido apresentavam valores significativamente menores que D2. Considerando *A. naeslundii*, intra-grupos D2 apresentou um aumento significativo de T0 para T1, considerando o tempo, gênero feminino, faixas etárias e os disjuntores. Uma redução significativa desta bactéria de T0 para T1 em D2 foi observada no gênero masculino. A análise inter-grupos, revelou uma quantidade significativamente maior em D1 em comparação a D2 em T0, considerando tempo, gêneros, faixas etárias e disjuntores. *Porphyromonas gingivalis* foi detectada em poucos sítios avaliados limitando os resultados observados. Embora a ERM conduzida com o disjuntor Hyrax e Mini Hyrax Invertido em crianças e adolescentes portadores de FLP não tenha alterado de forma significativa a carga total bacteriana em sítios próximos da fissura e nos sítios controle, mudanças em relação a quantidade de *S. oralis* e *A. naeslundii* foram observadas, sugerindo que a ERM promoveu modulação de populações bacterianas específicas.

Palavras-chave: Fissura palatina. Técnica de expansão palatina. Microrganismos.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate microorganisms in the oral cavity in patients with cleft fissure (PLF) before and after rapid maxillary expansion (RME). **Materials and methods:** The sample consisted of 28 patients with unilateral FLP with maxillary atresia and age range 8-15 years. RME was performed with Hyrax and Inverted Mini-Hyrax. The microorganisms were: Universal Primer, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii* and *Porphyromonas gingivalis*. The collections of microorganisms were made in two specific sites and microbiological analysis was performed by PCRRT. Patients were evaluated before cementing expander (T0) and after RME (T1). For statistical analysis, log-linear regressions were adjusted marginal. The significance level was 5%. **Results:** The results regarding total bacterial load, revealed that intra-group D2 in males from T0 to T1 and those using Hyrax showed a significant increase. In inter-group analysis showed that D1 had a significantly higher total load D2 in males at T0, and also those using Hyrax. *S.oralis* in inter-group analysis, considering the time, D1 showed significantly lower values than D2 at T0. In addition, stratified analysis also revealed that D1 at T0 in both genders, aged 8-11 years and those who used Mini Hyrax Inverted had significantly lower values than D2. Considering *A. naeslundii*, intra-groups D2 showed a significant increase from T0 to T1, considering the time, female gender, age and expander. A significant reduction of this bacterium from T0 to T1 in D2 was observed in males. The inter-groups analysis revealed a significantly greater amount in D1 versus D2 in T0, given time, gender, age and expanders. *Porphyromonas gingivalis* was detected in a few sites evaluated what limit his analysis. **Conclusion:** RME conducted with the expander Hyrax and Inverted Mini- Hyrax in children and adolescents with FLP has not changed significantly the total bacterial load in sites near the cleft and control sites, changes in the relative amount of *S. oralis* and *A. naeslundii* were observed, suggesting that RME promoted modulation of specific bacterial populations.

Keywords: Cleft palate. Palatal expansion technique. Microorganisms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CENTRARE – Centro de Tratamento e Reabilitação de Fissuras Labiopalatais e Deformidades Craniofaciais do Hospital da Baleia.

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa.

ERM – Expansão Rápida da Maxila.

PFLP – Portador de Fissura Lábiopalatina.

FLP – Fissura Lábiopalatina.

PUC Minas – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

D1 – Superfície distal do primeiro dente mesial a fenda.

D2 – Superfície mesio-vestibular do dente anterior ao dente bandado.

TO – Antes da cimentação do disjuntor.

T1 – Após ERM.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Amostra.....	20
3.1.1 <i>Critérios de inclusão</i>	20
3.1.2 <i>Critérios de exclusão</i>	20
3.2 Avaliação e procedimentos clínicos iniciais.....	21
3.3 Coleta dos microrganismos	21
3.3.1 <i>Superfícies dentárias selecionadas para a coleta</i>	21
3.3.2 <i>Amplificação do DNA</i>	22
3.3.3 <i>Extração do DNA</i>	22
3.3.4 <i>Obtenção do DNA</i>	23
3.4 Procedimentos ortodônticos.....	24
3.5 Expansão maxilar	26
3.6 Análise estatística	26
4 ARTIGO	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

As fissuras labiopalatinas (FLP) são as deformidades faciais mais frequentes em todas as raças e grupos étnicos (MOSSEY, 2011). Elas nem sempre se manifestam isoladamente, podendo estar associadas a síndromes ou outras anomalias. Essas fissuras afetam aproximadamente um em cada 700 indivíduos nascidos vivos e comprometem a qualidade de vida de mais de 7,5 milhões de crianças ao redor do mundo (IPDTC, 2011).

Além das alterações no desenvolvimento da face média, crianças portadoras de fissuras labiopalatais apresentaram maior prevalência de gengivite e periodontite, fruto de pior higiene oral do que crianças sem FLP (PERDIKOGIANNI et al., 2009).

A deficiência transversa da maxila, principalmente em sua região anterior (SILVA FILHO et al., 1998), torna a expansão rápida da maxila (ERM) frequentemente necessária para a correção da atresia maxilar em pacientes com FLP (TINLUND; RYGH; BOE, 1993; HAZZA'A et al., 2011). A ERM pode ser obtida com diferentes abordagens clínicas (SANDIKÇIOGLU; HAZAR, 1997), que incluem o uso de disjuntores tradicionais, como os do tipo Haas (HAAS, 1961) e Hyrax (BIEDERMAN, 1968), assim como outros disjuntores especialmente desenvolvidos para portadores de FLP, tais como o Haas borboleta e Mini-Hyrax Invertido (OLIVEIRA et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2014).

Apesar dos benefícios que esses disjuntores trazem aos pacientes portadores de FLP, seu uso dificulta ainda mais a remoção adequada da placa bacteriana (MARCHISIO; ESPÓSITO; GENOVESI, 2010). A microbiota da placa dentária é diversa e complexa, sendo composta por mais de 300 espécies bacterianas (MOORE et al., 1987). No entanto, alguns microrganismos específicos são descritos como principais agentes etiológicos de doenças periodontais, incluindo: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *actinomycetemcomitans actinomycetemcomitans* e *Treponema denticola* (ASIKAINEN et al., 1987).

Análises microbiológicas realizadas em indivíduos com FLP mostraram maior prevalência de espécies de bactérias tais como: *Streptococcus spp*, *Veillonella spp*, *Actinomyces.spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella intermedia/nigrescens* e *Parvimonas micra* (PERDIKOGIANNI et al., 2009).

A fim de determinar se a maior prevalência de doença periodontal em portadores de FLP decorre de fatores de risco microbiológicos específicos ou de uma higiene bucal deficiente com presença contínua de grande quantidade de placa bacteriana não específica, um estudo prévio caracterizou a microbiota isolada da fissura residual e de sítios periodontais de dentes adjacentes ao defeito (MOBELLI; BRAGGER; LANG, 1992). A frequência de sangramento gengival durante a amostragem foi significativamente maior no grupo sem manutenção preventiva. Não foram observadas diferenças em relação aos microrganismos anaeróbios Gram negativos entre os grupos. Entretanto, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella melaninogenica* e *P. intermedia* foram encontrados com maior frequência no grupo de pacientes que não receberam profilaxia periódica. As espiroquetas e bacilos móveis raramente foram observados no grupo que realizou profilaxia, sendo comuns no outro grupo.

Considerando que a ERM é parte fundamental do tratamento ortodôntico da maioria dos portadores de FLP e, portanto, em sua reabilitação multidisciplinar, o controle de biofilme é particularmente importante nestes indivíduos, também durante essa etapa, pois os disjuntores ortodônticos dificultam a higienização adequada. Além disso, não existem estudos analisando a microbiota quando esses pacientes são submetidos a ERM com diferentes disjuntores. Dessa forma, este estudo teve como objetivo detectar, quantificar e comparar possíveis variações de microrganismos em pacientes com FLP em relação ao tempo, faixa etária, gênero e tipo de disjuntor (Hyrax e Mini-Hyrax Invertido).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar microrganismos em sítios específicos de dentes em pacientes portadores de FLP.

2.2 Objetivos específicos

Comparar se existe diferença qualitativa e quantitativa de carga bacteriana total, *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii* em sítios específicos de dentes em pacientes com FLP ao longo do tempo (antes e após ERM), entre gêneros (feminino e masculino), faixas etárias (8 a 11 e 12 a 15 anos) e tipos de disjuntores (Hyrax e Mini-Hyrax Invertido).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (CAAE: 08456012.4.0000.5137). Antes de se iniciar o experimento, todos os participantes e seus responsáveis legais receberam por escrito todos os esclarecimentos necessários sobre a realização da pesquisa. Ambos também assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de sua inclusão no estudo.

Os portadores de FLP foram selecionados no ano de 2013 e avaliados por alunos e professores do Mestrado Profissionalizante em Ortodontia da PUC Minas. Um cálculo amostral baseado na prevalência da FLP (IPDTCO, 2011) determinou a necessidade de 14 pacientes na condução do estudo considerando-se um poder de 80%. A amostra foi composta por um total de 28 pacientes com FLP, 17 do gênero masculino, 11 do gênero feminino com idade entre 8 e 15 anos (média de 11,75 anos), provenientes do Centro de Tratamento e Reabilitação de Fissuras Labiopalatais e Deformidades Craniofaciais do Hospital da Baleia (CENTRARE).

3.1.1 Critérios de inclusão

- a) pacientes com idade entre 08 e 15 anos;
- b) presença de FLP unilateral;
- c) presença de atresia maxilar, com necessidade de ERM.

3.1.2 Critérios de exclusão

- a) presença de síndromes;
- b) problemas de ordem sistêmica que contra indicassem o tratamento proposto;
- c) tratamento ortodôntico prévio.

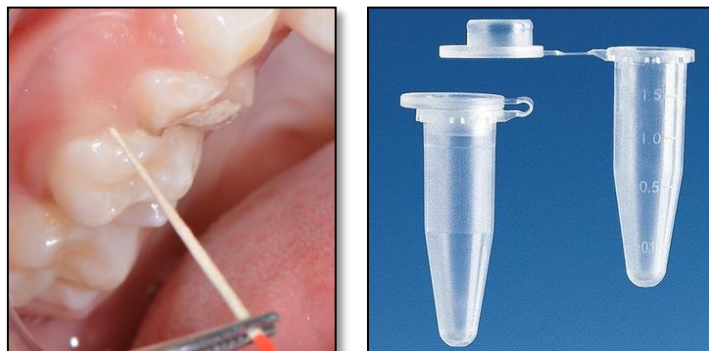
3.2 Avaliação e procedimentos clínicos iniciais

- a) anamnese;
- b) orientação do ortodontista quanto à higiene bucal;
- c) polimento coronário para eliminar biofilme prévio padronizando a amostra.

3.3 Coleta dos microrganismos

A coleta dos microrganismos foi feita com um cone de papel absorvente Tanari nº 20 (Tanariman Industrial LTDA, Manaus, AM, Brasil). Cada cone foi aplicado por 60 segundos em um sítio específico. Após a coleta, o cone absorvente foi colocado dentro de um tubo de 1,5 ml e congelado a uma temperatura de - 80° C para processamento posterior.

Figuras 1 e 2: Coleta do biofilme subgengival e armazenamento.



Fonte: Arquivo do próprio autor.

3.3.1 Superfícies dentárias selecionadas para a coleta

- a) Sítio distal do primeiro dente mesial a fenda (D1);
- b) Sítio mesiovestibular do dente anterior ao dente bandado (D2).

As coletas dos microrganismos foram realizadas em T0 e T1.

3.3.2 Amplificação do DNA

A técnica do PCR em tempo real consiste na quantificação e qualificação do DNA bacteriano por meio de curvas padrão construídas de sequências conhecidas. Essas sequências ou *primers* variarão de acordo com o tipo de cepa bacteriana que se pretende estudar. Neste estudo foram utilizados *primers* para cepa bacteriana (Universal) e para três bactérias específicas: *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus oralis* e *Porphyromonas gingivalis*

Tabela 1. Primers específicos.

Bactéria	Sequências dos Primers (5'- 3')
<i>Primer Universal</i>	AGA GTTTGATCCTGGCTCAG GGC TACCTTGTTACG ACTT
<i>Streptococcus oralis</i>	ATT CCC GCC GTT GGA CCA TTC CCG ACA AAG ACC ATT CCA TCTC
<i>Actinomyces naeslundii_WVA 963</i>	TCGCCGAGTCCTACAAGC ACACCATCCTCAACCAGAA
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC ACGTCATCCCCACCTTCCTC

Fonte: Elaborado pelo autor

3.3.3 Extração do DNA

A extração do DNA genômico bacteriano foi realizada com a utilização do Kit *PureLink™ Genomic DNA Purification Kit* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante e Cortelli et al. (2012). Para tal, após o descongelamento, as amostras de cada paciente foram suspendidas com 200 µL de água ultra pura e homogeneizadas no agitador mecânico de soluções (Vortex AP - 56, Phoenix Luferco, Araraquara, SP) por 15 segundos. De cada amostra foi removido 100 µL e colocado em microtubos separados, totalizando 400 µL de cada paciente. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por três minutos,

formando assim um precipitado. O sobrenadante foi desprezado e ao Pellet resultante foi adicionado 180 μL de Tampão de Lise com lizozima, para a quebra da parede bacteriana, homogeneizado por 10 s e levado em “banho Maria” a 37° C, por trinta minutos. Acrescentou-se 20 μL de Proteinase K e 200 μL de PureLink™ Genomic lysis/Binding Buffer, com o produto sendo colocado novamente em banho Maria a 55° C por duas horas. Após esse procedimento, 200 μL de etanol foi adicionado e homogeneizado e o conteúdo resultante (cerca de 700 μL) foi transferido para uma coluna sílica acoplada a um tubo de coleta.

Realizado esses procedimentos, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por um minuto e realizou-se as lavagens do produto presente na membrana de sílica da coluna. Primeiro adicionou-se 500 μL de Wash Buffer 1 e centrifugou-se a 12.000 rpm por um minuto e em seguida foi adicionado Wash Buffer 2 e centrifugou-se a 12.000 rpm por três minutos. Foi adicionado 30 μL de PureLink™ Genomic Elution Buffer e após a última centrifugação a 12.000 rpm por um minuto, finalizamos a extração do DNA genômico bacteriano das amostras. Essas foram armazenadas a -20° C para análise posterior.

3.3.4 Obtenção do DNA

O processo de extração do DNA foi confirmado pela técnica de PCR tempo real e para isso utilizou-se um *primer* universal que amplifica a sequência 16 s rDNA bacteriano. Após a confirmação de cada amostra, foi colhido 2 μL de DNA e adicionado 18 μL de uma mistura contendo água, sonda, *primer* específico para a cepa estudada, tampão, bases livres e a enzima TAQ DNA Polimerase. Essas foram acondicionadas em uma microplaca e levada ao Termociclador (7500 Fast Real-Time PCR System. Applied Biosystems/Life Technologies do Brasil LTDA, São Paulo) (Fig. 3) que através de alternâncias de temperatura, resultaram na amplificação do DNA estudado. Após quarenta ciclos, o gráfico da amplificação do DNA foi registrado pelo software Primer 3. Com isso pudemos confirmar a presença ou não do tipo específico de bactéria e quantificá-la de forma exponencial.

Figura 3: Mini placa com amostras no Termociclador.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

3.4 Procedimentos ortodônticos

- a) O disjuntor Hyrax foi confeccionado utilizando um parafuso disjuntor ortodôntico de 9 mm (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP), que foi posicionado com seu centro coincidente com a sutura palatina mediana. Dois segmentos de fio de aço inoxidável 0.9 mm (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP) foram dobrados de forma a acompanhar o contorno palatino das coroas dos primeiros e segundos pré-molares e/ou primeiros e segundos molares decíduos. As bandas foram instaladas nos primeiros molares permanentes e os braços do parafuso foram unidos aos dois segmentos por meio de solda de prata (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP) (Fig. 4A).

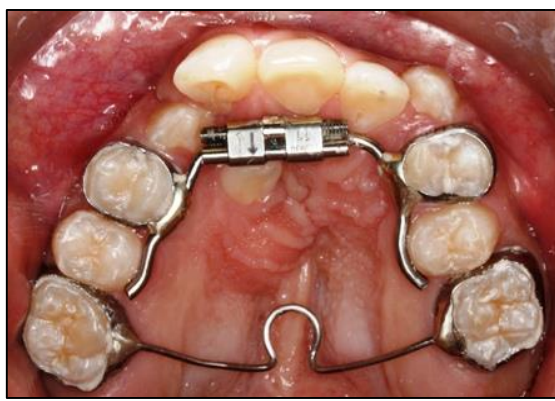
Figura 4A: Disjuntor Hyrax



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

- b) O disjuntor Mini-Hyrax Invertido foi confeccionado utilizando um parafuso de 12 mm (Variety Expander, Dynaflex, Sait Ann, MO, EUA), posicionado na região de caninos superiores. As extensões distais provenientes do parafuso foram cuidadosamente dobradas de forma a contornarem a superfície palatina dos dentes posteriores até as bandas presentes nos primeiros pré-molares. Uma barra transpalatina fixa de aço inoxidável 0.9 mm (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP) foi cimentada aos primeiros molares superiores para evitar a expansão posterior. (Fig. 4B).

Figura 4B: Mini-Hyrax Invertido



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

O protocolo de ativação dos disjuntores utilizado foi de $\frac{1}{4}$ de volta por dia até que a sobrecorreção fosse obtida. A contenção foi por um período de 3 meses com o próprio aparelho disjuntor. Todos os disjuntores foram confeccionados pelo autor.

3.5 Expansão maxilar

A expansão foi finalizada quando a cúspide palatina do primeiro molar permanente superior passou a ocluir com a ponta da cúspide vestibular do primeiro molar permanente inferior.

3.6 Análise estatística

Nas comparações de microrganismos presentes no sítio distal do primeiro dente mesial a fenda (D1), e no sítio mesiovestibular do dente anterior ao dente bandado (D2) ao longo do tempo, considerando as interações por gênero, idade e tipo de disjuntor, foram ajustadas regressões marginais log-lineares e realizados os devidos contrastes. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5%. O software utilizado na análise foi o R versão 3.0.3 (www.R-project.org).

4 ARTIGO

Microorganisms assessment in cleft patients undergoing rapid maxillary expansion

Artigo a ser submetido ao periódico American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics (Qualis A1), cujas normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico: <http://www.ajodo.org/authorinfo>.

Microorganisms assessment in cleft patients undergoing rapid maxillary expansion

Vinícius Costa Nacif,^a Dauro Douglas Oliveira,^b Fernando de Oliveira Costa,^c José Roberto Cortelli,^d Rodrigo Villamarim Soares^e

^aMestrando em Ortodontia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^bCoordenador e Professor do Programa de Mestrado, Departamento de Ortodontia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^cProfessor do Departamento de Periodontia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^dProfessor do Departamento de Periodontia, Universidade de Taubaté- SP, São Paulo, Brasil

^eProfessor do Departamento de Periodontia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Correspondence to the author:

Rodrigo Villamarim Soares, DDS, Ms

Av. Dom José Gaspar, 500, Building 46 - Room 1011

Telephone: 55-31-8852-5238

E-mail: soaresrv@pucminas.br

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to evaluate microorganisms in the oral cavity in patients with cleft fissure (PLF) before and after rapid maxillary expansion (RME).

Material and methods: The sample consisted of 28 patients with unilateral FLP and maxillary atresia with age range 8-15 years. MRE was performed with Hyrax and Inverted Mini-Hyrax. The microorganisms were: Universal Primer, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii* and *Porphyromonas gingivalis*. The collections of microorganisms were made in two specific sites and microbiological analysis was performed by PCRRT. Patients were evaluated before cementing expander (T0) and after RME (T1). For statistical analysis, log-linear marginal regressions were adjusted. The significance level was 5%. **Results:** The results regarding total bacterial load, revealed that intra-group D2 in males from T0 to T1 and those using Hyrax showed a significant increase. In inter-group analysis showed that D1 had a significantly higher total load D2 in males at T0, and also those using Hyrax. *S.oralis* in inter-group analysis, considering the time, D1 showed significantly lower values than D2 at T0. In addition, stratified analysis also revealed that D1 at T0 in both genders, aged 8-11 years and those who used Mini Hyrax Inverted had significantly lower values than D2. Considering *A. naeslundii*, intra-groups D2 showed a significant increase from T0 to T1, considering the time, female gender, age and expander. A significant reduction of this bacterium from T0 to T1 in D2 was observed in males. The inter-groups analysis revealed a significantly greater amount in D1 versus D2 in T0, given time, gender, age and expanders. *Porphyromonas gingivalis* was detected in a few sites evaluated what limit this analysis. Although **Conclusion:** ERM conducted with the expander Hyrax and Inverted Mini- Hyrax in children and adolescents with FLP has not changed significantly the total bacterial load in sites near the cleft and control sites, changes in the relative amount of *S. oralis* and *A. naeslundii* were observed, suggesting that RME promoted modulation of specific bacterial populations.

Keywords: Cleft palate. Palatal expansion technique. Microorganisms.

INTRODUCTION

Cleft lip and palate (CLP) are the most frequent facial deformities in all races and ethnic groups¹. They do not always manifest themselves in isolation, may be associated with syndromes or other abnormalities. CLP occurs in approximately 1 in every 700 live births, compromising the quality of life of more than 7.5 millions of children in the world². Besides the changes in the development of the middle face, children with cleft lip and palate had a higher prevalence of gingivitis and periodontitis, the result of poor oral hygiene, than children without FLP.³

The transverse maxillary deficiency, especially in its anterior⁴, makes rapid maxillary expansion (RME) often needed for the correction of maxillary atresia in patients with FLP.^{5,6} ERM can be obtained with different clinical approaches, that⁷ include the use of traditional appliance, such as the Haas⁸ type and Hyrax,⁹ or alternative, especially developed for people with FLP, such as the Mini-Hyrax Inverted, which was recently described in literatura.^{10,11}

Despite the benefits of these breakers bring to patients with FLP, its use further complicates the proper removal of biofilme.¹² The microbiota of these biofilms is diverse and complex, consisting of more than 300 types of bactérias.¹³ However, only a few selected microorganisms seem to be able to be identified as the main etiologic agents of periodontal disease, including: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *actinomycetncomitans actinomycetemcomitans e Treponema denticola*.¹⁴

Microbiological analyzes performed in individuals with CLP showed a higher prevalence of bacterial species, such as: *Streptococcus spp*, *Veillonella spp*, *Actinomyces. spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella intermedia / nigrescens e Parvimonas micra*.³

Whereas the ERM is a fundamental part of the orthodontic treatment of most patients with FLP and therefore in its multidisciplinary rehabilitation, biofilm control is particularly important in these individuals. In addition, there are no studies analyzing microbiota when these patients undergo ERM with different breakers. Thus, this study aimed to detect, quantify and compare possible variations of microorganisms in patients with CLP in relation to time, age group, gender and type of circuit breaker (Hyrax and Mini Hyrax Inverted).

MATERIALS AND METHODS

Sample

This study was approved by the Research Ethics Committee (COEP) of the Pontifical Catholic University of Minas Gerais (CAAE: 08456012.4.0000.5137). Before starting the experiment, all participants and their legal guardians received all the necessary explanations about the research. The inclusion of the participants in this study obeyed the following criteria: presence of unilateral CLP, maxillary atresia in need of rapid palatal expansion, absence of syndromes and systemic problems of orders that contraindicated the proposed treatment, as well as previous orthodontic treatment.

A sample calculation based on the prevalence of FLP² determined the need of 14 patients in conducting the study considering a power of 80%. A total of 28 PFLP were selected, 17 males and 11 females, aged 8 and 15, from the Baleia Hospital Treatment and Rehabilitation Center of Craniofacial Deformities clefts lip and palate (CENTRARE).

Collection of microorganisms

The collection of microorganisms was made with an absorbent paper cone Tanari n0 20 (Tanariman LTDA Industrial, Manaus, AM, Brazil). Each cone was maintained for a time period of 60 seconds in one of the following sites: (1) the distal site of the first tooth mesial gap (D1); (2) mesial buccal site of previous tooth to tooth banded (D2). The collections of microorganisms were performed before the breaker cementation (T0) and after 3 months of ERM's contention (T1). After collection, the absorbent cone was placed within a 1.5 ml tube and frozen at a temperature of - 80 C for further processing.

DNA amplification

Real-time PCR technique is the quantification and qualification of bacterial DNA using standard curves generated from known sequences. These sequences and primers will vary according to the type of bacterial strain to be studied. This study

used a primer Universal and others specific to three bacterial species: *Actinomyces Naeslundii*, *Streptococcus oralis* e *Porphyromonas gingivalis*.

DNA extraction

The extraction of bacterial genomic DNA was performed using the kit PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) following the instructions fabricante.¹⁵ After thawing, samples from each patient were suspended with 200 ml ultrapure water and homogenized in a mechanical stirrer solutions (Vortex AP - 56, Luferto Phoenix, Araraquara, SP) for 15 seconds. Each 100 µL sample was removed and placed in separate wells, totaling 400 µL of each patient. Then, the sample was centrifuged at 12,000 rpm for three minutes, thereby forming a precipitate. The supernatant was discarded and the resulting pellet was added 180 µL of lysis buffer with lysozyme to break the bacterial cell wall, are taken homogenized for 10 to "water bath" to 37 ° C for thirty minutes. Was added 20 µL of Proteinase K and 200 of PureLink™ Genomic Lysis / Binding Buffer, with the product being placed again on water bath at 55 ° C for two hours. After this procedure, 200 µL of ethanol was added and homogenised and the resulting content (700 µL) was transferred to a silica column coupled to a collection tube. The sample was centrifuged at 12,000 rpm for one minute and held the product of this washing the column silica membrane. First was added 500 µL of Wash Buffer 1 and centrifuged at 12,000 rpm for one minute and then was added Wash Buffer 2 and centrifuged at 12,000 rpm for three minutes. Was added 30 µL of PureLink™ Genomic Elution Buffer and after the last centrifugation at 12,000 rpm for one minute, completed the extraction of bacterial genomic DNA samples. These were stored at -20 ° C for analysis.

DNA Collection

The DNA extraction procedure was confirmed by real-time PCR that used a universal primer which amplifies the 16 S rDNA sequence. After confirmation of each sample, 2µL DNA was collected and added to 18 µL of a mixture satisfaction water probe primer specific for the strain studied, buffer, free bases and Taq DNA polymerase enzyme. These were placed in a microplate and taken to the thermal cycler (7500 Fast Real-Time PCR System. Applied Biosystems / Life Technologies of

Brazil LTDA, Brazil) than by temperature switches, resulting in the amplification of DNA studied. After forty cycles, DNA amplification graph was recorded by the software Primer 3. With that we confirm the presence or absence of the specific type of bacteria and quantifies it exponentially.

Orthodontic procedures

The initial procedures included anamnesis, guidance on how to maintain satisfactory oral hygiene and coronary polishing on all teeth.

The Hyrax breaker was made using a screw expander 9 mm (Orthodontics Morelli, Sorocaba, SP), which was positioned with its center coinciding with the sutures. Two stainless steel wire segments 0.9 mm (Orthodontics Morelli, Sorocaba, SP) were bent in order to follow and play the palatal surface of the crowns of the first and second premolars and / or first and second primary molars. Bands were installed in the first permanent molars and the screw arms were attached to the two segments by means of silver solder (Morelli Orthodontics, Sorocaba, SP) (Fig. 1A). The Mini Hyrax Inverted breaker was made with a 12 mm screw (Variety Expander, Dynaflex, Saint Ann, MO, USA) positioned in the region of upper canines. The distal extensions from the screw were neatly folded in order to circumvent and touch the palatal surface of the crowns of the posterior teeth to the bands of the first premolars. A fixed transpalatine bar stainless steel 0.9 mm (Orthodontics Morelli, Sorocaba, SP) was cemented to the first molars to prevent further expansion (Fig. 1B). The Breakers activation protocol was $\frac{1}{4}$ turn a day until the end of the palatal cusps of molars and / or premolars touched the tip of the cusps of the lower teeth. Containment of the ERM was made with the breakers own devices and kept for 3 months. All breakers made by the same prosthetic.

Statistical analysis

Comparisons of microorganisms present in the distal site of the first tooth mesial the slot (D1) and mesiobuccal site of previous tooth to tooth banded (D2) over time, considering the interactions by gender, age and type of expander, regressions marginal log-linear were adjusted and made the appropriate contrasts. The significance level used in this study was 5%. The software used in the analysis was the R version 3.0.3 (www.R-project.org).

RESULTS

Table I were presented as medians and interquartile ranges inter and intra-group for the universal primer (total bacterial load), *Streptococcus oralis*, and *Actinomyces naeslundii* *Porphyromonas gingivalis*. In Tables II and III were presented p values for multiple comparisons within and between groups, respectively. The Universal primer was used to estimate total bacterial load in the sites evaluated. The intra-group analysis (Tab. II) revealed that D2 in male participants from T0 to T1 and those who used the Hyrax breaker showed a significant increase ($p = 0.041$ and $p = 0.044$, respectively) in the total bacterial load. In the inter-group analysis (Table III) was observed that D1 had a total bacterial load significantly ($p = 0.024$) greater than D2 in males at T0, and the participants would use the Hyrax breaker ($p = 0.001$). Considering the bacterium *Streptococcus oralis* in intra-group evaluation (Tab. II), although a statistically significant difference in T0 to T1 D1 of the participants from 12 to 15 years has been observed, the value of medians and interquartile ranges found limits value of this result. In the inter-group analysis (Tab. III), considering the time alone, D1 values showed significantly ($p = 0.005$) lower this bacterium D2 at T0. Additionally, the stratified analysis also revealed that D1 at T0 in both genders, partakers of the lower age group (8-11 years), and those who would use the breaker Mini Hyrax Inverted had values significantly ($p < 0.05$) less than *S. oralis* than D2. In view of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* was detected in a few sites evaluated, the median and interquartile ranges observed limit value of the observed results.

Considering the bacterium *Actinomyces naeslundii*, the intra-group analysis (Tab. II) showed a significant ($p < 0.05$) this bacterium T0 to T1, the time considering both alone and in the stratified analyzes occurred in females in both age groups and in both circuit breakers to D2. In contrast, a significant reduction ($p = 0.000$) of this bacterium T0 to T1 D2 was observed in male participants. The inter-group analysis (Tab. III) showed a significant quantity ($p < 0.05$) increased this bacterium in comparison to D1 D2 T0, this time considering both alone and in the analyzes by gender, age and breakers.

DISCUSSION

Since there are no studies analyzing the microbiota of children and adolescents with CLP during the ERM, let alone comparing the possible effects of different circuit breakers, genders and age groups in this microbiota, it is necessary to further investigate this condition, as the ERM is required in most with CLP and being bulky devices, they could prevent adequate oral hygiene and cause changes in this microbiota. In this study, the breakers were used Hyrax and Mini Hyrax Inverted, respecting the indication of each breaker to avoid undesirable side effects. Recent studies showed that the Mini Hyrax Inverted associated with the use of a bar transpalatine the first permanent molars promotes anterior maxillary expansion without transverse increase posterior.^{10,11} Many with CLP need this differential expansion in the maxilla and even then there was no breaker proven effective for this indication. On the other hand, in patients who require expansion in the anterior region and in the later use of the circuit breaker is more Hyrax indicado.¹¹ The results of this study in relation to the total bacterial load close the gap site (D1), and the site control (D2), revealed an increase of the burden at T0 to T1 D2 in male participants, and those who used the Hyrax breaker. Additionally, D1 had higher total bacterial load than D2 in males at T0, and the participants would use the Hyrax breaker. Therefore, most of the intra and inter-group analysis showed no significant variation in the sites evaluated, indicating similarity in the total bacterial load between them before and after RME. An increase in the total bacterial load in the final MRE would be expected with the presence of the breakers during this period. This result may in part be derived from the collection technique, as well as the location of the same, given that both can affect the qualitative and quantitative analysis of microbes, although these observations have been made in a study evaluating the above-biofilm gengival.¹⁶ The results of this study in relation to the total bacterial load near the crack site (D1), and the control site (D2), revealed an increase of the burden at T0 to T1 D2 in male participants, and those who used the Hyrax breaker. Additionally, that D1 had higher total bacterial load than D2 in males at T0, and the participants would use the Hyrax breaker. Therefore, most of the intra and inter-group analysis showed no significant variation in the sites evaluated, indicating similarity in the total bacterial load between them before and after RME. An increase in the total bacterial load in the final MRE would be expected with the presence of the breakers during this period. This result

may in part be derived from the collection technique, as well as the location of the same, given that both can affect the qualitative and quantitative analysis of microbes, although these observations have been made in a study evaluating the above-biofilm gingival.¹⁶

The intra-group *S. oralis* analysis revealed no quantitative variations of these bacteria over time or with the gender, age or circuit breakers. In contrast, inter-group analysis revealed that initially T0 D1 had significantly lower levels in most D2 and analyzes conducted. Additionally, to the end of the ERM D1 and D2 showed no significant quantitative variations from this bacterium in all tests conducted. These results show differences between the site near the slot (D1) and control (D2) before the ERM, and similarities between them after collection for *S. oralis*. A higher proportion of *S. oralis* subgingival sites in subjects with periodontitis compared to healthy subjects has been reported previamente.¹⁷ Therefore, the similarity observed in T1 between D1 and D2 suggests that the MRE has similar implementation of an atypical site (D1) and a control. However, it should be mentioned that the amounts detected in *S. oralis* were low, a result that may have prevented the detection of other changes in the profile of this bacterium. While we use an accurate and sensitive method (RT-PCR) in the qualitative and quantitative assessment of *P. gingivalis* in 79% of the sites examined this bacteria was not observed. *P. gingivalis* is considered one of the main pathogens in periodontal disease adultos^{18,19} and is occasionally found in the oral cavity crianças.²⁰ However, in view of the presence of the cleft and consequently the presence of morphologically differentiated periodontal site, and reports that with CLP may be more susceptible to the occurrence of periodontal diseases, the ¹⁸ *P. gingivalis* evaluation was conducted in this study. Whereas the sample age range was 8-15 years, the low prevalence observed this bacterium, was similar to that described in studies conducted in children and adolescents without FLP samples that used protocols semelhantes.¹⁵ The intra-group of *A. naeslundii* revealed a significant increase review of this bacterium from T0 to T1 D2 occurred in most of the analyzes conducted. The evaluation showed inter-group in all analyzes conducted initially (T0) there most of these bacteria in D1 than D2, and that this difference did not exist after RME. Like *S. oralis*, a higher proportion of *A. naeslundii* subgingival sites in subjects with periodontitis compared to healthy subjects was also observed previamente.¹⁷ Therefore, the results observed showed that initially (T0) atypical site had higher amounts of this bacterium compared to control, and that the

conduct of ERM promoted an increase of *A. naeslundii* in the control site (D2), making the proportions of this bacterium similar among the evaluated sites. Because of its location and of morphology in principle a higher total bacterial load, as well as the possible presence of more virulent pathogens was expected in D1. Additionally, with the driving ERM, an increase in the total bacterial load, and changes in the proportions of microorganisms would be expected in view of the presence of the breakers that, in principle, should hinder hygiene by promoting accumulation of biofilm. The lack of increase in the total bacterial load may be partly derived from the collection position and dental technique as mentioned above, as well as the non-occurrence of an increase in plaque index (PI) of the participants (data not described here). In particular, the IP of the participants was low initially and held, which may in part be derived from the fact that they receive treatment and guidance in health institutions / education prior to and during the conduct of this study. The change in proportions of microorganisms (*S. oralis*; *A. naeslundii*) for ERM may indicate that although implemented analysis has not captured the change in the total bacterial load, this could detect changes in the number of these bacteria suggesting that ERM and breakers promoted light changes in the evaluated sites.

CONCLUSION

Although the ERM conducted with the breaker and Mini Hyrax Hyrax Inverted in children and adolescents with FLP has not significantly altered the total bacterial load in sites near the crack and control sites, changes regarding the amount of *S. oralis* and *A. naeslundii* were observed, suggesting that ERM promoted modulation of specific bacterial populations.

REFERENCES

1. Mossey PA, Shaw WC, Munger RG, Murray JC, Murthy J, Little J. Global oral health inequalities: challenges in the prevention and management of orofacial clefts and potential solutions. *Adv Dent Res* 2011;23:247-58.
2. IPDTC WG. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the international perinatal database of typical oral clefts. *Cleft Palate-Craniofac J*. 2011 Jan;48(1):66-81.
3. Perdikogianni H, Papaioannou W, Nakou M, Oulis C, Papagiannoulis L. Periodontal and microbiological parameters in children and adolescents with cleft lip and /or palate. *Int J Paediatr Dentist*. 2009 Sept;19(6):455-67.
4. Silva Filho OG, Castro Machado FM, Andrade AC, Souza Freitas JA, Bishara SE. Upper dental arch morphology of adult unoperated complete bilateral cleft lip and palate. *Am J Orthodont Dentofac Orthoped*. 1998 Aug;114(2):154-61.
5. Tindlund RS, Rygh P, Boe OE. Intercanine widening and sagittal effect of maxillary transverse expansion in patients with cleft lip and palate during the deciduous and mixed dentitions. *Cleft Palate-Craniofac J*. 1993 Mar;30(2):195-207.
6. Hazza'a AM, Rawashdeh MA, Al-Nimri K, Al Habashneh R. Dental and oral hygiene status in Jordanian children with cleft lip and palate: a comparison between unilateral and bilateral clefts. *Int J Dent Hyg*. 2011 Sept;9:30-6.
7. Sandikçioğlu M, Hazar S. Skeletal and dental changes after maxillary expansion in the mixed dentition, *Am J Orthodont Dentofac Orthoped*. 1997 May;111(3):321-7.
8. Haas AJ. Rapid expansion of the maxillary dental arch and nasal cavity by opening the midpalatal suture. *Angle Orthod*. 1961;31:73-89.
9. Biederman W. An hygienic appliance for rapid expansion. *J Pract Orthod*. 1968;2:67-70.
10. Oliveira DD, Bartolomeo FU, Cardinal L, Figueiredo DS, Palomo JM, Andrade I Jr. An Alternative Clinical Approach to Achieve Greater Anterior Than Posterior Maxillary Expansion in Cleft Lip and Palate Patients. *J Craniofac Surg*. 2014 Nov;25(6):e523-6.
11. Figueiredo DS, Bartolomeo FU, Romualdo CR, Palomo JM, Horta MC, Andrade I Jr et al. Dentoskeletal effects of 3 maxillary expanders in patients with clefts: A

- cone-beam computed tomography study. *Am J Orthodont Dentofac Orthoped.* 2014 July;146(1):73-81.
12. Marchisio O, Esposito MR, Genovesi A. Salivary pH level and bacterial plaque evaluation in orthodontic patients treated with Recaldent_products. *Int J Dent Hyg.* 2010 Feb;8:232-6.
 13. Moore LVH, Moore WEC, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Best AM, et al. The bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res.* 1987 May;66:989-95.
 14. Asikainen S, Jousimies-Somer H, Kanervo A, Summanen P. Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and matched controls. *J Periodontol.* 1987;58:224-30.
 15. Cortelli JR, Fernandes CB, Costa FO, Cortelli SC, Kajiya M, Howell SC, Kawai T. Detection of periodontal pathogens in newborns and children with mixed dentition. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Jun;31(6):1041-50.
 16. Haffajee AD, Teles RP, Patel MR, Song X, Yaskell T, Socransky SS. Factors affecting human supragingival biofilm composition. II. Tooth position. *J Periodontal Res.* 2009;44:520-8.
 17. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27:648-57.
 18. Huynh-Ba G, Brägger U, Zwahlen M, Lang NP, Salvi GE. Periodontal disease progression in subjects with orofacial clefts over a 25-year follow-up period. *J Clin Periodontol.* 2009;36(10):836-42.
 19. Su Z, Kong F, Wang S, Chen J, Yin R, Zhou C, et al. The rag locus of *Porphyromonas gingivalis* might arise from *bacteroides* via horizontal gene transfer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Abr;29:429-37.
 20. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol.* 2008;35:346-61, 2008.

TABLES AND FIGURES

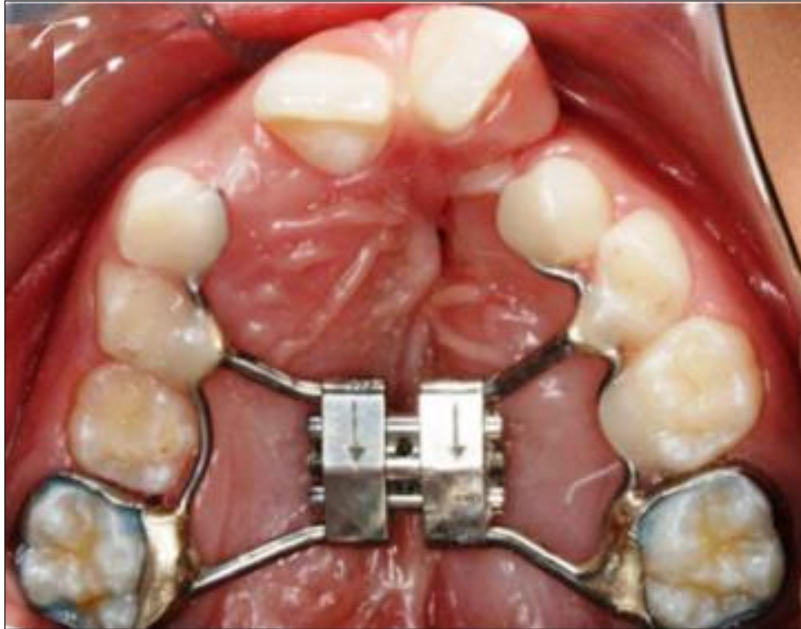


Fig 1A. Expander Hyrax



Fig 1B. Expander Mini-Hyrax Inverted

Table I. Median and interquartile range for bacterial strain: Universal, *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*.

variables		Universal*	<i>S. oralis</i> *	<i>P. gingivalis</i>	<i>A. naeslundii</i> *		
Times (N=28)	T 0	D1	724,62 [468,32 - 898,6]	0,08 [0,00 - 0,68]	0,00 [0,00 - 0,00]	71,42 [17,01 - 214,61]	
		D2	592,15 [447,75 - 885,13]	0,55 [0,00 - 3,75]	0,00 [0,00 - 9,81]	16,47 [2,72 - 78,35]	
	T 1	D1	619,42 [393,45 - 878,77]	0,51 [0,00 - 4,07]	0,00 [0,00 - 10,93]	88,15 [38,85 - 461,21]	
		D2	654,76 [489,33 - 942,08]	1,81 [0,00 - 15,48]	0,00 [0,00 - 0,00]	39,08 [9,92 - 126,88]	
Gender	male (N=17)	T 0	D1	709,87 [480,34 - 887,71]	0,01 [0,00 - 0,52]	0,00 [0,00 - 0,00]	100,09 [20,54 - 309,42]
			D2	613,95 [426,97 - 819,09]	0,88 [0,00 - 2,77]	0,00 [0,00 - 6,13]	47,36 [6,45 - 115,81]
		T 1	D1	615,69 [432,81 - 667,4]	0,25 [0,00 - 1,42]	0,00 [0,00 - 11,58]	77,38 [48,68 - 219,34]
			D2	648,49 [489,95 - 959,38]	0,52 [0,00 - 3,18]	0,00 [0,00 - 0,00]	32,63 [9,63 - 109,89]
	Female (N=11)	T 0	D1	801,51 [518,17 - 958,54]	0,18 [0,00 - 0,65]	0,00 [0,00 - 0,00]	42,75 [11,54 - 171,34]
			D2	568,97 [487,74 - 897,44]	0,33 [0,00 - 10,56]	0,00 [0,00 - 12,59]	3,59 [2,72 - 21,04]
		T 1	D1	633,99 [410,63 - 1357,99]	0,82 [0,00 - 10,86]	0,00 [0,00 - 0,00]	159,2 [43,8 - 779,02]
			D2	661,02 [401,45 - 880,41]	14,63 [0,22 - 37,49]	0,00 [0,00 - 0,00]	49,32 [17,77 - 203,88]
Expander	MiniHyrax Inverted (N=14)	T 0	D1	799,62 [480,34 - 887,71]	0,07 [0,00 - 0,43]	0,00 [0,00 - 10,07]	130,47 [23,43 - 253,79]
			D2	570,51 [468,52 - 819,09]	0,55 [0,00 - 2,31]	0,00 [0,00 - 16,37]	21,29 [5,1 - 102,29]
		T 1	D1	607,35 [354,09 - 920,73]	0,13 [0,00 - 3,54]	0,00 [0,00 - 11,79]	137,64 [49,79 - 748,21]
			D2	654,76 [336,05 - 803,71]	0,33 [0,00 - 16,34]	0,00 [0,00 - 0,00]	30,66 [22,36 - 115,46]
	Hyrax (N=14)	T 0	D1	699,37 [456,29 - 1091,96]	0,09 [0,00 - 1,19]	0,00 [0,00 - 0,00]	20,92 [12,69 - 132,3]
			D2	600,04 [412,92 - 951,16]	0,47 [0,00 - 7,63]	0,00 [0,00 - 6,13]	8,56 [1,27 - 54,40]
		T 1	D1	655,08 [503,7 - 836,81]	0,80 [0,00 - 4,61]	0,00 [0,00 - 3,78]	77,15 [29,01 - 219,34]
			D2	649,31 [489,95 - 1061,37]	2,75 [0,03 - 14,63]	0,00 [0,00 - 0,00]	47,43 [3,8 - 810,72]
Age group	8 a 11 years (N=17)	T 0	D1	709,87 [427,86 - 1091,96]	0,18 [0,00 - 1,19]	0,00 [0,00 - 0,00]	23,43 [17,01 - 146,71]
			D2	620,32 [426,97 - 1028,92]	0,77 [0,00 - 7,63]	0,00 [0,00 - 0,00]	19,40 [3,32 - 115,81]
		T 1	D1	611,37 [328,75 - 746,64]	0,82 [0,00 - 18,19]	0,00 [0,00 - 0,00]	76,93 [24,88 - 176,35]
			D2	752,84 [504,41 - 959,38]	0,88 [0,06 - 16,34]	0,00 [0,00 - 0,00]	45,53 [11,02 - 134,58]
	12 a 15 years (N=11)	T 0	D1	739,38 [544,54 - 813,32]	0,00 [0,00 - 0,08]	0,00 [0,00 - 0,00]	114,24 [32,02 - 281,61]
			D2	570,34 [515,65 - 788,91]	0,28 [0,00 - 2,54]	10,81 [3,07 - 16,98]	5,10 [2,79 - 36,23]
		T 1	D1	623,15 [553,51 - 878,77]	0,00 [0,00 - 1,31]	0,00 [0,00 - 17,34]	307,38 [59,07 - 663,91]
			D2	545,77 [393,61 - 691,69]	2,73 [0,00 - 12,55]	0,00 [0,00 - 3,05]	28,68 [7,00 - 89,52]

* Values divided by thousand (1,000)

D1 - distal site of the first tooth mesial to cleft.

D2 - mesiovestibular site of previous tooth to banded.

T0 - before the circuit interrupter.

T1 - after RME.

The significance level was 5%.

Table II. Multiple comparisons to bacterial strains: Universal, *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*, intra-group in general and stratified by gender, age and expander.

Variáveis	Grups	comparisons	Universal	<i>S.oralis</i>	<i>P.gingivalis</i>	<i>A.naeslundii</i>
Time	D1	T1/T0	0,760	0,078	0,879	0,833
	D2	T1/T0	0,213	0,124	0,485	0,000
Gender	female	D1	0,851	0,145	0,834	0,734
		D2	0,467	0,271	0,727	0,012
	male	D1	0,674	0,120	0,953	0,918
		D2	T1/T0	0,041	0,096	0,768
Age group	8 a 11 years	D1	0,797	0,117	0,004	0,560
		D2	T1/T0	0,310	0,108	0,020
	12 a 15 years	D1	0,706	0,000	0,925	0,191
		D2	T1/T0	0,169	0,222	0,000
Expander	Mini Hyrax Inverted	D1	0,854	0,275	0,576	0,360
		D2	T1/T0	0,412	0,239	0,118
	Hyrax	D1	0,634	0,065	0,877	0,269
		D2	T1/T0	0,044	0,222	0,487

D1 - distal site of the first tooth mesial to cleft.

D2 - mesiovestibular site of previous tooth to banded.

T0 - before the circuit interrupter.

T1 - after RME.

The significance level was 5%.

Table III. Multiple comparisons bacterial strain: *Universal*, *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*, inter-group in general and stratified by gender, age and expander.

variables	Time	Comparisons	Universal	<i>S.oralis</i>	<i>P.gingivalis</i>	<i>A.naeslundii</i>
Time	T0	D1/D2	0,103	0,005	0,828	0
	T1	D1/D2	0,898	0,433	0,382	0,765
Gender	Female	T0	0,325	0,02	0,047	0,009
		T1	0,952	0,652	0,268	0,991
	Male	T0	0,024	0,023	0,44	0,002
		T1	0,881	0,226	0,119	0,73
Age group	8 a 11 years	T0	0,244	0,005	0,624	0
		T1	0,873	0,482	0,542	0,684
	12 a 15 years	T0	0,116	0,065	0,004	0,041
		T1	0,973	0,522	0,4	0,932
Expander	Mini Hyrax Inverted	T0	0,49	0,027	0,986	0,003
		T1	0,61	0,737	0,399	0,348
	Hyrax	T0	0,001	0,093	0,828	0,012
		T1	0,835	0,106	0,382	0,664

D1 - distal site of the first tooth mesial to cleft.

D2 - mesiovestibular site of previous tooth to banded.

T0 - before the circuit interrupter.

T1 - after RME.

The significance level was 5%.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo foi o primeiro na literatura a avaliar o perfil microbiológico de pacientes FLP antes e após a utilização de diferentes ERM.

Observamos uma crescente colonização por *A. naeslundii* em D2 considerando tempo, idade e disjuntor sinalizando uma transição de microrganismos após o período de ERM.

Embora o estímulo aos pacientes FLP quanto à higienização seja uma prática rotineira na clínica, nossos resultados corroboram para necessidade de um maior controle na higienização principalmente próximo a fissura. É essencial que se trabalhe na conscientização do paciente e da família para que se evite infecções indesejáveis.

A ERM conduzida neste estudo com os disjuntores Hyrax e Mini Hyrax Invertido em crianças e adolescentes portadores de FLP embora não tenha alterado de forma significativa a carga total bacteriana em sítios próximos da fissura e nos sítios controle, mudanças em relação a quantidade de *S. oralis* e *A. naeslundii* foram observadas, sugerindo que a ERM promoveu modulação de populações bacterianas específicas.

Este estudo aponta para a necessidade de investigações futuras, com a utilização de outros tipos de disjuntores como, por exemplo, o Haas borboleta. Outro aspecto que merece aprofundamento é o estudo de um espectro mais expandido de bactérias colonizadoras do sulco gengival.

REFERÊNCIAS

- ASIKAINEN, S. et al. Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and matched controls. **Journal of Periodontology**, v.58, p. 224-230, 1987.
- BIEDERMAN, W. An hygienic appliance for rapid expansion. **The Journal of Practical Orthodontics**, v.2, p. 67-70, 1968.
- CORTELLI, J.R. et al. Detection of periodontal pathogens in newborns and children with mixed dentition. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.31, n.6, p. 1041-1050, June 2012.
- FIGUEIREDO, D.S.F. et al. Dentoskeletal effects of 3 maxillary expanders in patients with clefts: A cone-beam computed tomography study. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.146, n.1, p. 73-81, July 2014.
- IPDTC, W.G. Prevalence at Birth of Cleft Lip With or Without Cleft Palate: Data From the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts. **Cleft Palate Craniofacial Journal**, v.48, n.1, p. 66-81, Jan. 2011.
- HAAS, AJ. Rapid expansion of the maxillary dental arch and nasal cavity by opening the midpalatal suture. **The Angle Orthodontist**, v.31, p. 73-89, 1961.
- HAZZA'A, A.M. et.al. Dental and oral hygiene status in Jordanian children with cleft lip and palate: a comparison between unilateral and bilateral clefts. **International Journal of Dental Hygiene**, v.9, p. 30-36, Sept. 2011.
- MARCHISIO, O.; ESPOSITO, M.R.; GENOVESI, A. Salivary pH level and bacterial plaque evaluation in orthodontic patients treated with recalcant_products. **International Journal Dentistry Hygiene**, v.8, p. 232-236, Feb. 2010.
- MOBELLI, A.; BRAGGER, U.; LANG, N.P. Microbiota associated with residual clefts and neighboring teeth in patients with cleft lip, alveolus and palate. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v.29, n.5, p. 463-469, Sept. 1992.
- MOORE, L.V.H. et al. The bacteriology of human gingivitis. **Journal of Dental Research**, v.66, p. 989-995, 1987.
- MOSSEY, P.A. et al. Global oral health inequalities: challenges in the prevention and management of orofacial clefts and potential solutions. **Advances in Dental Research**, v.23, p. 247-258, 2011.
- OLIVEIRA, D.O. et al. An alternative clinical approach to achieve greater anterior than posterior maxillary expansion in cleft lip and palate patients. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.25, n.6, Nov. 2014.

PERDIKOIANNI, H. et al. Periodontal and microbiological parameters in children and adolescents with cleft lip and /or palate. **International Journal Paediatric Dentistry**, v.19, n.6, p. 455-467, Sept. 2009.

SANDIKÇIOĞLU, M.; HAZAR, S. Skeletal and dental changes after maxillary expansion in the mixed dentition, **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.111, n.3, p. 321-327, Mar. 1997.

SILVA FILHO, O.G. et al. Upper dental arch morphology of adult unoperated complete bilateral cleft lip and palate. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.114, n.2, p. 154-161, Aug. 1998.

TINDLUND, R.S.; RYGH, P.; BOE, O.E. Intercanine widening and sagittal effect of maxillary transverse expansion in patients with cleft lip and palate during the deciduous and mixed dentitions. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v.30, n.2, p. 195-207, Mar. 1993.