

**CUANTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA EN PACIENTES ORTODÓNCICOS QUE
UTILIZARON ORTODONCIA FIJA Y ALINEADORES. ESTUDIO PILOTO.**

**MICROBIOLOGICAL QUANTIFICATION IN ORTHODONTIC PATIENTS WHO
USED FIXED ORTHODONTICS AND ALIGNERS. PILOT STUDY**

*Ramírez Fernández Lina ¹, Liseth Romero Gustín ², Adriana Jaramillo³, Carlos Humberto
Martínez⁴, Gerardo Andrés Libreros⁵.*

¹⁻² Residentes ortodoncia y ortopedia maxilar Unicic – Cali.

³ Director trabajo de grado.

⁴ Asesor metodológico.

⁵ Asesor científico.

CUANTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA EN PACIENTES ORTODÓNCICOS QUE UTILIZARON ORTODONCIA FIJA Y ALINEADORES. ESTUDIO PILOTO.

Resumen

Antecedentes: En la cavidad oral están presentes bacterias gram + y gram -. Estas han sido el centro de investigación a lo largo de los años, estas bacterias son agentes etiológicos de enfermedades importantes que se presentan en la cavidad oral y con el tiempo pueden generar pérdida de las piezas dentales en edades adultas. Estas enfermedades periodontales son iniciadas por especies bacterianas que viven en biopelículas polimicrobianas o debajo del margen gingival que comprenden etiologías multifactoriales de las cuales las más estudiadas son las microbianas y las inmunológicas teniendo en cuenta que el factor microbiano primario para que se da es el proceso de enfermedad que es un cambio en el contenido de la microbiota oral y el factor inmunológico primario es una respuesta inflamatoria destructiva del huésped. Gran parte de los microorganismos orales son los principales agentes etiológicos de las enfermedades periodontales y sus diferentes especies son responsables de las diferentes formas de la enfermedad, asociado a una microbiota gram+ supragingival que consiste principalmente en diversas especies predominantes en la gingivitis *Streptococcus* y *Actinomyces*, sin embargo, la cantidad de bacterias gram-, como *Fusobacteria* y *Bacteroides*, aumentan en la periodontitis, la microflora está dominada por anaerobios facultativos gram -, con incrementos de espiroquetas (1). **Objetivo:** analizar las diferencias en el acúmulo de biopelícula dental en pacientes con tratamiento de ortodoncia fija comparados con los que usan alineadores. Para posteriormente cuantificar las bacterias gram + y gram – presentes en la biopelícula dental de pacientes con ortodoncia fija o alineadores transparentes. **Métodos:** Este estudio piloto utilizó una muestra que estuvo constituida por 21 pacientes, divididos en pacientes con ortodoncia fija y grupo alineadores. Se realizó una toma de muestra con cureta Gracey del incisivo lateral superior y primer molar superior derecho e izquierdo, además se realiza el proceso de fijación en una placa de vidrio, tomando una muestra de biofilm para posteriormente analizar las bacterias presentes.

Resultados: Las muestras recolectadas de pacientes con ortodoncia fija presentaron promedios de crecimiento bacteriano en ufc/ml mayores al inicio y 48 horas después que aquellos con alineadores invisibles, los promedios del logaritmo crecimiento bacteriano (ufc/ml) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los dos momentos de evaluación. Así mismo, al compararlos al interior de cada grupo al inicio y 48 horas después, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas. Se identificó la presencia de morfotipos bacterianos como Bacilos Grampositivos largos (morfotipo lactobacilos), Cocos Gram positivos (morfotipo estreptococos), Bacilos Gram negativos, Cocos Gram negativos y el contraste según el tipo de tratamiento no evidencio diferencias estadísticamente significativas. **Conclusión:** Los alineadores invisibles están a la vanguardia, es una técnica digital relevante, debido a sus múltiples ventajas como la facilidad de la higiene y por ende menos acumulo de placa bacteriana, por estas razones han tenido mucha adherencia en el mercado. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas en cuanto a el crecimiento bacteriano en ortodoncia fija y alineadores.

Palabras clave:

Brackets, ortodoncia, bacteriología, bacteria gram positiva, bacteria gram negativa, aparatos de ortodoncia removibles.

MICROBIOLOGICAL QUANTIFICATION IN ORTHODONTIC PATIENTS WHO USED FIXED ORTHODONTICS AND ALIGNERS. PILOT STUDY.

Abstract

Both gram + and gram - bacteria are present in the oral cavity. These have been the focus of research over the years, these bacteria are etiological agents of important diseases that occur in the oral cavity and over time can cause loss of teeth in adulthood. These periodontal diseases are initiated by bacterial species that live in polymicrobial biofilms or under the gingival margin that comprise multifactorial etiologies of which the most studied are microbial and immunological, taking into account that the primary microbial factor for which it occurs is the process of disease that is a change in the content of the oral microbiota and the primary immunological factor is a destructive inflammatory response of the host. A large part of oral microorganisms are the main etiological agents of periodontal diseases and their different species are responsible for the different forms of the disease, associated with a gram+ supragingival microbiota that consists mainly of various species predominant in gingivitis, Streptococci and Actinomyces, without However, the number of gram- bacteria, such as fusobacteria and Bacteroides, increases in periodontitis, the microflora is dominated by gram-facultative anaerobes, with increases in spirochetes. **Objective:** to analyze the differences in the accumulation of dental biofilm in patients with fixed orthodontic treatment compared to those who use aligners. To subsequently quantify gram + and gram - bacteria present in the dental biofilm of patients with fixed orthodontics or transparent aligners. **Methods:** This pilot study used a sample that consisted of 42 patients, divided into patients with fixed orthodontics (n=21) and aligners group (n=21). A sample was taken with a Gracey curette from the upper lateral incisor and upper right and left first molar, in addition the fixation process is carried out on a glass plate, taking a biofilm sample to later analyze the bacteria present. **Results:** Samples collected from patients with fixed orthodontics presented higher bacterial growth rates in cfu/ml at baseline and 48 hours later than those with invisible aligners. The means of the logarithm of bacterial growth (ufc/ml) did not present statistically significant differences between

the groups at the two evaluation moments (Figure 1 and 2). Likewise, when comparing them within each group at the beginning and 48 hours later, no statistically significant differences were found. **Conclusion:** Invisible aligners are at the forefront, it is a relevant digital technique, due to its multiple advantages such as ease of hygiene and therefore less accumulation of bacterial plaque, for reasons these have had a lot of adherence in the market. However, in this study no significant differences were found in terms of bacterial growth in fixed orthodontics and aligners.

Keywords

Brackets, Orthodontic, Bacteriology, Gram negative bacteria, Gram positive bacteria, orthodontic appliances removable.

Introducción

La cavidad oral es un hábitat de diferente microbiología oral y periodontal el cual ha sido centro de diferentes investigaciones a lo largo de los años, están presentes las bacterias gram + y gram – que son los agentes etiológicos más importantes de las enfermedades que se presentan en cavidad oral, y pueden ocasionar la pérdida de piezas dentales en edades adultas (2) estas enfermedades periodontales son iniciadas por especies bacterianas que viven en biopelículas polimicrobianas o debajo del margen gingival que comprenden etiologías multifactoriales de las cuales las más estudiadas son las microbianas y las inmunológicas teniendo en cuenta que el factor microbiano primario para que se da es el proceso de enfermedad que es un cambio en el contenido de la microbiota oral y el factor inmunológico primario es una respuesta inflamatoria destructiva del huésped (2).

Gran parte de los microorganismos orales son los principales agentes etiológicos de las enfermedades periodontales y sus diferentes especies son responsables de las diferentes formas de la enfermedad, asociado a una microbiota gram+ supragingival que consiste principalmente en diversas especies predominantes en la gingivitis *Streptococos* y *Actinomyces*, sin embargo, la cantidad de bacterias gram-, como *fusobacteria* y *Bacteroides*, aumentan en la periodontitis, la microflora está dominada por anaerobios facultativos gram -, con incrementos de espiroquetas (1).

Existen dos formas de realizar el tratamiento de ortodoncia, de manera convencional con aparatología fija y con alineadores transparentes. Independientemente de sus ventajas y desventajas en cuanto al tiempo de tratamiento, un factor importante es el acumulo de placa bacteriana sin importar el tipo de aparatología. Esto se da debido a que dificultan la higiene bucal y genera un aumento de retención de placa bacteriana, generando así un ambiente óptimo para que haya un cambio en la microbiota oral, aumentando la población microbiana y al mismo tiempo, dando como resultado la gingivitis y posterior a ello la enfermedad periodontal (3), el cambio de microbiota oral debido a la formación de biopelículas alrededor del bracket o del surco gingival en el caso de los alineadores, da pie a que se inicie un

proceso inflamatorio que puede progresar a un proceso infeccioso hasta llegar a la periodontitis. Generando una destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, pérdida de inserción clínica, pérdida ósea y formación de bolsas periodontales(4). La adhesión microbiana y su biopelícula de especies aeróbicas y anaeróbicas son similares entre los dos tipos de aparatología; en los alineadores parece aumentar por la forma de este ya que contiene surcos y crestas (4).

Publicaciones científicas han demostrado que la presencia de aparatos fijos en la cavidad oral de pacientes ortodóncicos podría alterar la naturaleza de la placa dental, La estructura, el metabolismo y la composición de esta cambiarían, lo que provocaría un aumento de la población microbiana, especialmente *Streptococo* y *Lactobacillus*, Por lo tanto, la retención de placa se considera un problema real en la Ortodoncia Correctiva, las dificultades para mantener la higiene bucal alrededor de los aparatos pueden provocar una gingivitis marginal hiperplásica que puede progresar a periodontitis (3). Por lo tanto, el conocimiento de esta microbiota es de gran importancia para realizar un tratamiento ortodóntico exitoso, debido a que genera un aumento de la población bacteriana (5), ya que publicaciones científicas han demostrado que la presencia de aparatos fijos en la cavidad oral de pacientes ortodóncicos podría alterar la naturaleza de la placa dental, La estructura, el metabolismo y la composición de esta cambiarían, lo que provocaría un aumento de la población microbiana, especialmente *Streptococo* y *Lactobacillus*, Por lo tanto, la retención de placa se considera un problema real en la Ortodoncia Correctiva, las dificultades para mantener la higiene bucal alrededor de los aparatos pueden provocar una gingivitis marginal hiperplásica que puede progresar a periodontitis (6).

El objetivo de este estudio fue analizar las diferencias en el acúmulo de biopelícula dental en pacientes con tratamiento de ortodoncia fija comparados con los que usan alineadores.

Materiales y métodos

Este estudio piloto utilizó una muestra que estuvo constituida por 21 pacientes, divididos en pacientes con ortodoncia fija y pacientes con alineadores, los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1. Pacientes que presentaban ortodoncia fija, 2. Pacientes que presentaban alineadores, 3. Pacientes entre 15 y 44 años. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: 1. Pacientes con enfermedades sistémicas, 2. Pacientes fumadores, 3. Pacientes con discapacidad motriz que dificulte su higiene oral, 4. pacientes con menos de tres meses de tratamiento, 5. pacientes con ausencias dentales (excepto terceros molares), las variables incluidas en el estudio fueron (Edad del paciente, género, índice de placa bacteriana, hábitos de higiene oral, frecuencia de cepillado, uso de seda, uso de enjuague, tipo de microflora, número de bacterias en microflora).

Toma de la muestra

Se realizó con cureta de Gracey a partir de las superficies vestibulares de incisivo lateral y primero molar superior derecho e izquierdo, la muestra recogida se llevó a tubos Eppendorf de 2 ml para su respectivo cultivo bacteriano que contendrán caldo BHI. Las muestras se homogenizarán mediante agitación con vórtex durante 5 min, y 1 ml de muestra se diluirá de 1:10 a 1:106. Después de la dilución, se sembrará 0,1 ml de las muestras diluidas y se extenderán sobre placas de agar para el crecimiento microbiano.

Las placas de agar se incubarán a 37°C, durante 48 h en condiciones aeróbicas suplementadas con dióxido de carbono al 5%. Las colonias bacterianas se identificarán morfológicamente y se contarán como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) utilizando una cuadrícula de recuento de colonias; La base de datos se construirá en Microsoft Excel, estimando frecuencias absolutas y relativas de las variables en una escala categórica que incluye género, edad del paciente, microflora en su forma y número, ubicación de esta microflora y el pH encontrado en cavidad oral. Se realizará prueba t-Student entre las variables categóricas relacionadas con la categoría de diferenciación de morfotipos bacterianos en pacientes que presentan ortodoncia fija y alineadores.

Análisis estadístico

Los datos fueron consignados en hojas de cálculo en Microsoft Excel versión 16.66.1 para macOS 10.15.7. Estos datos fueron analizados en JASP Team (2023). JASP (Version 0.17.1) [Computer software]. El análisis consistió las medidas de tendencia central y dispersión para las Unidades Formadores de Colonias. Se realizó transformación logarítmica para de la variable crecimiento bacteriano (ufc/ml) para el contraste de promedios del para el contraste entre los grupos y se utilizó la prueba de shapiro wilk para probar normalidad y prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. El contraste se realizó entre los grupos al inicio y después de 48 horas. Así mismo, se contrasto con prueba t-student pareada los promedios del logaritmo para identificar diferencias al interior de los grupos pasadas las 48 horas.

Además se realizó el cálculo de frecuencias absolutas y relativas para la presencia de Bacilos Grampositivos largos (morfotipo lactobacilos), Cocos Gram positivos (morfotipo estreptococos), Bacilos Gram negativos, Cocos Gram negativos. Consignados con 0,+,++,+++,++++;se contrasto la variable entre los grupos de tratamiento mediante prueba de MannWhitney y la variable dicotomizada (ausencia/presencia) entre los grupos de ortodoncia fija vs alineadores invisibles mediante prueba exacta de Fisher. El nivel de significancia se establece en 0.05 y la confiabilidad den 95%.

Resultados

Se incluyeron muestras provenientes de 21 pacientes con predominio de sexo femenino (61.90%); participantes con edades comprendidas entre 15 a 44 años y promedio de edad 27.76 ± 9.28 , sin diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres ($p=0.9664$); mientras que los entre grupos de tratamiento si se identificaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0293$); la diferencia de edad, en favor del grupo de alineadores invisibles fue de 9.14 ± 3.87 . (Tabla 1)

Se identifico la presencia de algunos morfotipos bacterianos: Bacilos Grampositivos largos (morfotipo lactobacilos), Cocos Gram positivos (morfotipo estreptococos),

Bacilos Gram negativos, Cocos Gram negativos y el contraste según el tipo de tratamiento no evidencio diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 2).

Las muestras recolectadas de pacientes con ortodoncia fija presentaron promedios de crecimiento bacteriano en ufc/ml mayores al inicio y 48 horas después que aquellos con alineadores invisibles. Los promedios del logaritmo crecimiento bacteriano (ufc/ml) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los dos momentos de evaluación (Figura 1 y 2). Así mismo, al compararlos al interior de cada grupo al inicio y 48 horas después, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas. (Figura 3)

Discusión

En nuestro estudio, se observa una diferencia en el promedio de crecimiento bacteriano al inicio y 48 horas después mayor en pacientes con ortodoncia fija que pacientes que presentaron tratamiento con alineadores, La película adquirida, aparece en el esmalte la cual está constituida por albumina, lisozima, glicoproteínas, fosfoproteínas, lípidos y fluido crevicular, que será colonizada por cocos principalmente Gram + y bacterias de la flora oral normal, predominando estreptococos actinomicetos y una menor cantidad de *Haemophilus* que son aptos para unirse de manera directa a la película, por medio de la producción de glucanos extracelulares, desarrollando así una matriz polisacárido perteneciente a una biopelícula (7), La cavidad oral actúa como reservorio de muchos patógenos importantes, dentro de ellos están los microorganismos Gram negativos, encontrándose con mayor facilidad de la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales producen una amplia gama de factores de virulencia y resistencia a varios antimicrobianos. En cuanto a la colonización de estas, logran contribuir a una condición disbiótica de la microbiota periodontal que comúnmente es observada en pacientes periodontales (1) en el caso de nuestro estudio no son pacientes periodontales pero tienen un alto riesgo de adquirir esta enfermedad ya que los sistemas de ortodoncia ya sea fija o con alineadores forman un reservorio el cual puede volver a los pacientes más susceptibles a este tipo de enfermedad que inicia

con la inflamación leve y definitiva de las encías, hasta llegar a la destrucción permanente de los tejidos de soporte (encía, ligamento periodontal, hueso alveolar, cemento). Lo cual provoca la pérdida temprana de los dientes (7) limitando así la continuación del tratamiento de ortodoncia.

La enfermedad periodontal es causada por distintas bacterias; para ello existen varios métodos de análisis bacteriano que permiten simplificar e identificar distintos tipos de bacterias que pueden ser específicas e incluyen inmunofluorescencia. Existen pruebas como: ELISA, citometría de flujo y tecnología de sonda de ADN (8) en nuestro estudio se tomaron muestras de placa dental blanda presente en la superficie del esmalte o dentina del diente alrededor del bracket en el caso de pacientes que presentaban ortodoncia y en el fondo del surco en pacientes con alineadores, esta fue transportada en caldo BHI para cultivo bacteriano, estas muestras se homogenizaron mediante agitación con vórtex durante 5 min, y 1 ml de muestra se diluirá de 1:10 a 1:10⁶. Después de la dilución, se sembraron 0,1 ml de las muestras diluidas y se extenderán sobre placas de agar para el crecimiento microbiano, las placas de agar se incubaron a 37°C, durante 48 h en condiciones aeróbicas suplementadas con dióxido de carbono al 5%, las colonias bacterianas se identificaron morfológicamente y se contaron como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) utilizando una cuadrícula de recuento de colonias (9).

En la cavidad oral la aparatología ortodóntica está sujeta a humedad, enzimas salivales, variaciones de temperatura y acumulación de placa bacteriana, que pueden llegar afectar la composición de los materiales de estas técnicas, los alineadores se producen mediante modelos físicos, derivados de un software de planificación o mediante impresiones 3D elaborados de materiales como el poliéster, poliuretano y polipropileno, según su estructura molecular se pueden clasificar en polímeros termoplásticos, los cuales se subdividen en polímeros amorfos que presentan bajo grado de empaquetamiento molecular y semicristalinos que por su alto grado de empaquetamiento molecular los hace más rígidos y duros, estos materiales brindan propiedades ideales de componentes activos para los dispositivos de ortodoncia y se considera un material con una gran recuperación

elástica, baja rigidez, buena conformabilidad, alta energía almacenada, biocompatibilidad y estabilidad ambiental lo que los cataloga con un bajo nivel de citotoxicidad, y el uso clínico podría considerarse seguro, los estudios de la literatura revelan que el uso de alineadores removible garantiza un mejor mantenimiento de la salud periodontal que los aparatos fijos (10) llevando estos resultados a nuestro estudio coinciden ya que se encontró menos acumulo de placa bacteriana en pacientes que presentaban tratamiento con alineadores comparado con pacientes con ortodoncia fija, confirmando que en estudios previos se logró demostrar cambios importantes en cuanto al microbiota oral con bacterias anaerobias y anaerobias facultativas en pacientes con Brackets; Lo anterior se debe a que este tipo de aparatología fija hace más difícil el proceso de higiene, debido a el tamaño de los Brackets más los arcos, en el caso de los alineadores que son aparatos que se pueden remover, permiten un mejor cepillado y uso de seda dental los brackets generan un cambio en la composición del microbioma subgingival; sin embargo, estudios han demostrado que en los primeros 3 meses no hay cambios significativos en cuanto a la presencia de patógenos periodontales (11).

El biofilm que se adhiere a los dientes está compuesto de microbios dentro de una matriz polimérica de proteínas, péptidos y polisacáridos. Estos microorganismos funcionan en comunidad. Se acumula en zonas como el esmalte y sustratos artificiales como alineadores y Brackets. Según Quirynen y Bollen Han, existe un aumento de la formación de placa relacionado con un aumento en la amplitud rugosa de la superficie. Esta característica del material es muy importante ya que tiene una relación positiva con el desarrollo del biofilm irreversible, creando nichos en los cuales las bacterias estarían protegidas (12), en nuestro estudio no se evaluó el material con el que son realizados los alineadores pero encontramos bajos niveles de acumulo de placa y bacterias.

La aparatología de ortodoncia fija y alineadores pueden ser un sustrato ideal para la formación de biopelículas, en partes específicas como las cúspides y las superficies convexas muestran mayor susceptibilidad a la formación de biofilm que en las superficies planas. Como factores de riesgo están: la morfología de la

superficie, la carga y la química de la superficie, por ende, podría iniciar un proceso de inflamación que conduce a la enfermedad periodontal. Por tanto, el diseño y la estructura del alineador tienen un impacto en el microambiente oral (13). Sin embargo, en el análisis cuantitativo bacteriano de nuestro estudio piloto, se observa mayor cantidad de bacterias y por ende de placa bacteriana en pacientes con aparatología fija a diferencia de los pacientes que tenían alineadores.

Por otro lado, Wang et al. (CITA) lograron ver los cambios en el microbioma oral en pacientes que usaron alineadores Invisalign y aparatología fija. Estos cambios resultaron en la disbiosis del microbioma oral, llegando a la conclusión de que los alineadores no se diferenciaron de la aparatología fija en el sentido de que ambos lograron desequilibrar los microorganismos en la cavidad oral (14).

Los tratamientos de ortodoncia, especialmente la aparatología fija induce a un cambio para los microorganismos orales. Esto debido a que existe un pH ácido presente en la placa bacteriana que desencadena un crecimiento de patógenos y por ende un cambio en la microflora oral patógena (12) Lo anterior concuerda con lo encontrado en este estudio, ya que en los pacientes con aparatología fija es muy notable el acumulo de placa bacteriana alrededor de la mayoría de los dientes, por lo cual se genera un cambio en la microflora oral y un crecimiento de bacterias gram + y gram -.

Conclusiones

- Se identificó la presencia de morfotipos bacterianos como Bacilos Gram positivos largos (morfotipo lactobacilos), Cocos Gram positivos (morfotipo estreptococos), Bacilos Gram negativos, Cocos Gram negativos y no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.
- Los alineadores invisibles están a la vanguardia, es una técnica digital relevante, debido a sus múltiples ventajas como la facilidad de la higiene y por ende menos acumulo de placa bacteriana, por estas razones han tenido mucha adherencia en el mercado. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas en cuanto a el crecimiento bacteriano en ortodoncia fija y alineadores.

Recomendaciones

- Aumentar el número de la muestra.
- Homogenizar el tiempo de tratamiento de ortodoncia para la toma de muestras.
- Minimizar el rango de edad.
- Seguir la línea de investigación, para aportar más estudios con respecto a la línea de ortodoncia invisible.

Agradecimientos

- Docente director: Adriana Jaramillo.
- Asesores metodológicos: Carlos Martínez.
- Asesor Estadístico: Julián Tamayo
- Gerardo Libreros: docente y coordinador microbiología Universidad del Valle.
- Carolina Rodríguez Escobar.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Bibliografía

1. de Freitas AOA, Markezan M, Nojima M da CG, Alviano DS, Maia LC. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: A systematic review. *Dental Press J Orthod.* 2014;19(2):46–55.
2. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology.
3. Lucchese A, Pellegrino M, Montini E, Liguori A, Manuelli M. The effect of removable orthodontic appliances on oral microbiota: systematic review
CURRENT STATUS: UNDER REVIEW SUBJECT AREAS Dentistry General Microbiology.
4. Sifakakis I, Papaioannou W, Papadimitriou A, Kloukos D, Papageorgiou SN, Eliades T. Salivary levels of cariogenic bacterial species during orthodontic treatment with thermoplastic aligners or fixed appliances: a prospective cohort study. *Prog Orthod.* 2018 Dec 1;19(1).
5. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. 2015.
6. Lucchese A, Bonini C, Noviello M, Lupo Stanghellini MT, Greco R, Peccatori J, et al. The effect of removable orthodontic appliances on oral microbiota: A systematic review. *Applied Sciences (Switzerland).* 2021 Mar 2;11(6).
7. Christina L, Espíndola P, Picão RC, Casas SM, Mançano N, Martins Do Souto R, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacilli in subgingival biofilm associated with periodontal diseases Running title: Gram-negative bacilli in periodontitis.

8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 167–93.
9. Nugent, RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. Vol. 29, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1991.
10. Liu H, Sun J, Dong Y, Lu H, Zhou H, Hansen BF, et al. Periodontal health and relative quantity of subgingival porphyromonas gingivalis during orthodontic treatment. *Angle Orthodontist*. 2011 Jul;81(4):609–15.
11. Pango Madariaga AC, Bucci R, Rongo R, Simeon V, D'Antò V, Valletta R. Impact of fixed orthodontic appliance and clear aligners on the periodontal health: A prospective clinical study. *Dent J (Basel)*. 2020 Jan 2;8(1).
12. Fine DH, Iviandei ID. Indicators of periodontal disease activity: an evaluation. Vol. 13, *J Clin Periodontol*. 1986.
13. Murdoch DA. Gram-Positive Anaerobic Cocci [Internet]. Vol. 11. 1998. Available from: <http://cmr.asm.org/>
14. Tektas S, Thurnheer T, Eliades T, Attin T, Karygianni L. Initial bacterial adhesion and biofilm formation on aligner materials. *Antibiotics*. 2020 Dec 1;9(12):1–11.

Anexos – Fotografías/Gráficos/Esquemas

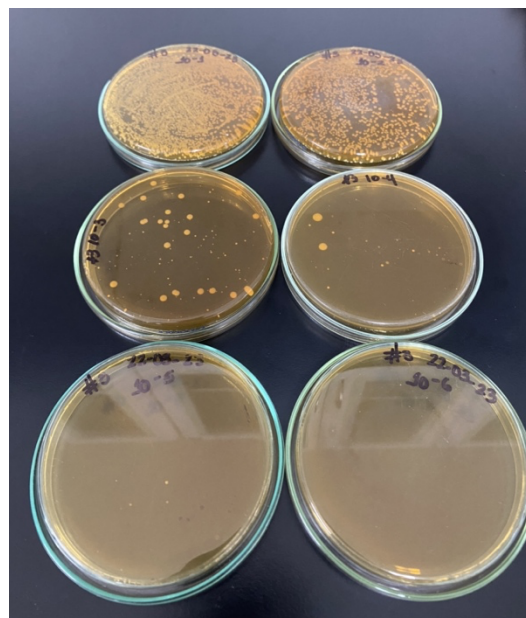
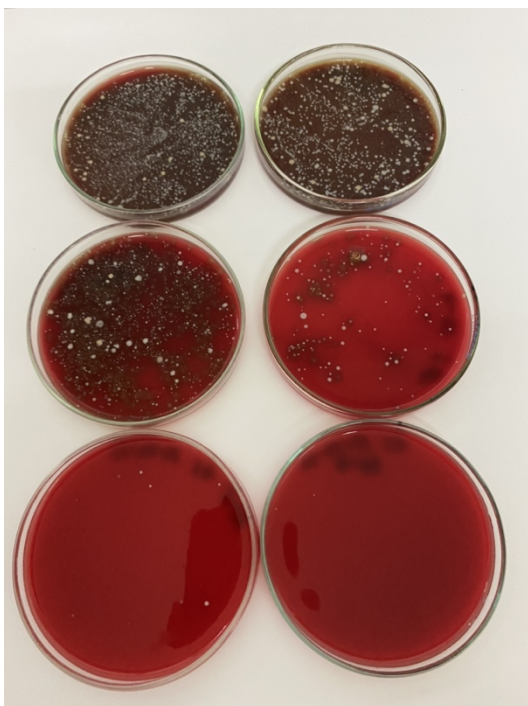


Tabla 1. Crecimiento bacteriano ($\times 10^5$ ufc/ml) al inicio y 48 horas después según el tipo de tratamiento ortodóntico.

	Ortodoncia fija	Alineadores invisibles	Total
Edad	24.714 \pm 1.771	33.857 \pm 4.261	27.761 \pm 9.283
ufc/mL - Inicio	5.907 \pm 7.808	2.968 \pm 5.279	0.005 \pm 6.993
ufc/mL - 48h	5.913 \pm 7.791	1.248 \pm 0.133	4.267 \pm 6.616
Crecimiento ufc/mL	0.006 \pm 0.024	-0.002 \pm 5.136	-0.603 \pm 3.000

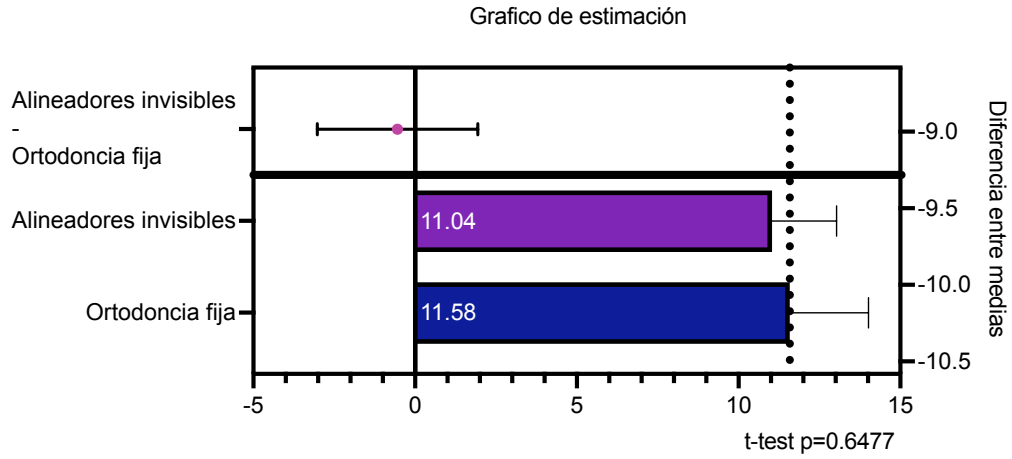


Figura 1. Logarítmico de crecimiento bacteriano (ufc/ml) en muestras de placa bacteriana según el tipo de tratamiento ortodóntico al inicio.

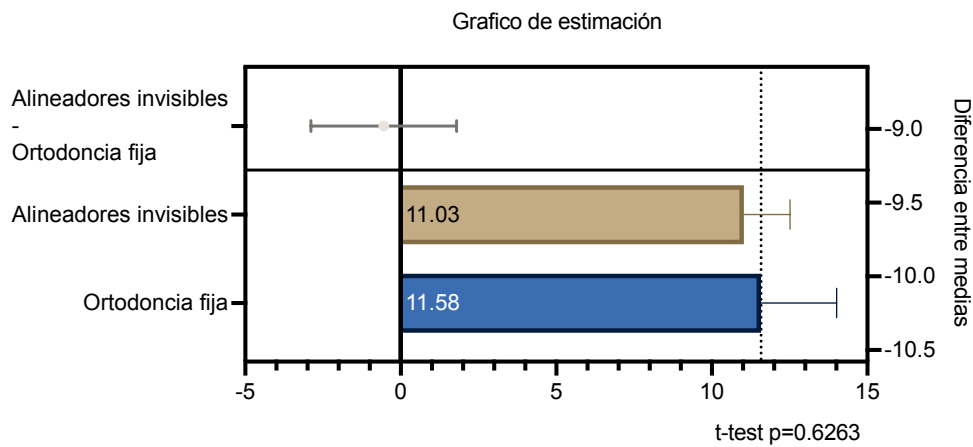


Figura 2. Logaritmo de ufc/ml en muestras de placa bacteriana según el tipo de tratamiento ortodóntico después de 48 horas.

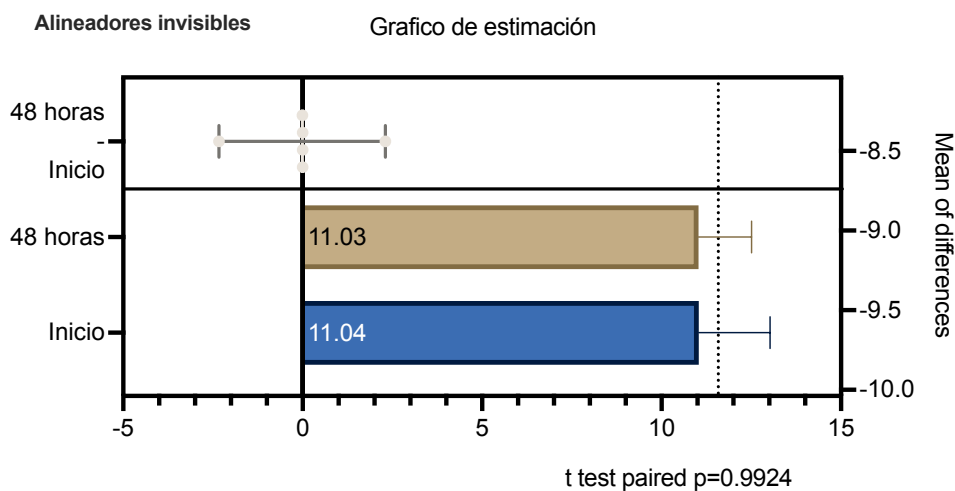
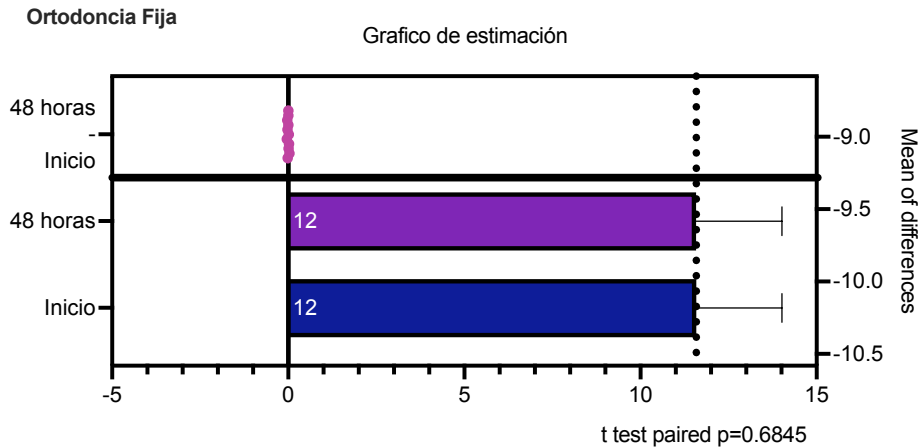


Figura 3. Comparación de promedios del logaritmo de ufc/ml en muestras de placa bacteriana después de 48 horas para cada uno de los grupos de tratamiento ortodóntico.

Tabla 1. Crecimiento bacteriano ($\times 10^5$ ufc/ml) al inicio y 48 horas después según el tipo de tratamiento ortodóntico.

	Ortodoncia fija	Alineadores invisibles	Total	p	Chi2 p
Bacilos Grampositivos largos (morfotipo lactobacilos)					
0	1 (9,1)	0 (0,0)	1 (5,6)	0.2015	0.611
+	1 (9,1)	2 (28,6)	3 (16,7)		
++	0 (0,0)	2 (28,6)	2 (11,1)		
+++	5 (45,5)	2 (28,6)	7 (38,9)		
++++	4 (36,4)	1 (14,3)	5 (27,8)		
Cocos Gram positivos (morfotipo estreptococos)					
0	1 (9,1)	0 (0,0)	1 (5,6)	0.3780	0.611
+	2 (18,2)	2 (28,6)	4 (22,2)		

++	8 (72,7)	3 (42,9)	11 (61,1)		
+++	0 (0,0)	1 (14,3)	1 (5,6)		
++++	0 (0,0)	1 (14,3)	1 (5,6)		
Bacilos Gram negativos					
0	1 (9,1)	0 (0,0)	1 (5,6)	0.1557	0.611
+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
++	3 (27,3)	1 (14,3)	4 (22,2)		
+++	3 (27,3)	1 (14,3)	4 (22,2)		
++++	4 (36,4)	5 (71,4)	9 (50,0)		
Cocos Gram negativos					
0	6 (54,5)	3 (42,9)	9 (50,0)	0.4616	0.500
+	2 (18,2)	1 (14,3)	3 (16,7)		
++	3 (27,3)	2 (28,6)	5 (27,8)		
+++	0 (0,0)	1 (14,3)	1 (5,6)		
++++	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		