

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

MARCELA CRISTINA DAMIÃO ANDRUCIOLI SOATO

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS EM BRÁQUETES METÁLICOS IN VIVO,
COM OU SEM UTILIZAÇÃO DE AGENTE ANTIMICROBIANO, PELA
TÉCNICA *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Ortodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Ortodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

Araraquara

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Soato, Marcela Cristina Damião Andruccioli

Detecção de microrganismos em bráquetes metálicos *in vivo*, com e sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* / Marcela Cristina Damião Andruccioli Soato . – Araraquara: [s.n.], 2009.

101 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

1. Bráquetes ortodônticos 2. Microbiologia 3. Sondas DNA
4. Bactérias 5. Clorexidina I. Título

MARCELA CRISTINA DAMIÃO ANDRUCIOLI SOATO

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS EM BRÁQUETES METÁLICOS IN VIVO,
COM OU SEM UTILIZAÇÃO DE AGENTE ANTIMICROBIANO, PELA
TÉCNICA *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: **Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins**

2º Examinador: **Prof. Dr. Luís Gonzaga Gandini Júnior**

3º Examinador: **Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto**

Araraquara, 23 de junho de 2009.

DADOS CURRICULARES

MARCELA CRISTINA DAMIÃO ANDRUCIOLI SOATO

Nascimento	6/12/1980 – Pontal/SP
Filiação	Guilherme Andrucioli Júnior Regina Célia Damiano Andrucioli
1998/2001	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP
2003/2004	Curso de Especialização em Ortodontia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP
2007/2009	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, nível Mestrado, área de Ortodontia, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

A Deus,

"O caminho não foi fácil...Mas Tú me enchestes com esperança, dando-me
força e vontade para continuar."

Aos meu pais,

Regina Célia Damiano Andrucioli e Guilherme Andrucioli Júnior,

A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminam meus caminhos com afeto e dedicação e se doam pelos filhos de forma incondicional. Vocês são meus maiores exemplos de amor, união, luta e caráter. Sou o que sou porque tenho vocês ao meu lado. Que essa conquista seja motivo de orgulho para vocês.

Aos meus irmãos,

Andréa C. Damiano Andrucioli Gobbo e Guilherme L. Damiano Andrucioli,

Por tudo o que significam em minha vida. Por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e dando forças para seguir sempre em frente. A vocês, todo meu carinho.

Ao meu avô **Calil Damiano** (*in memoriam*)

e querida **Vera L. B. Damiano** (*in memoriam*),

Que sempre torceram muito por mim. Sei que estariam felizes e orgulhosos neste momento. Saudades.

À minha Orientadora **Profª. Dra. Lídia Parsekian Martins**,

Mulher e profissional dedicada, cujo exemplo de vida é um estímulo constante. Meus sinceros agradecimentos por esta grande oportunidade de crescimento profissional. Pelos ensinamentos transmitidos, experiências compartilhadas, contribuição na minha formação pessoal e profissional e incentivo constante, meu respeito e admiração. Obrigada por ter permitido escolher meus caminhos na pesquisa e acreditar nas minhas possibilidades.

Ao meu Co-Orientador **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**,

Sinônimo de competência e dedicação. Seu entusiasmo pela pesquisa contagia a todos que têm a oportunidade de conhecê-lo. Obrigada pela confiança em mim depositada ao ter me permitido trabalharmos juntos, mesmo fazendo parte de outro Programa de Pós-Graduação. Pelos ensinamentos, orientações e inestimável contribuição para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos e admiração.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, na pessoa do atual Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e Vice-Diretora Profa. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, na pessoa da Coordenadora Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa e do Vice-Coordenador Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior, pela oportunidade de poder participar deste conceituado programa de Pós-Graduação e pela cordialidade a mim dispensada.

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César Braga De Abreu e Lima, Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa, Profa. Dra. Lourdes Aparecida Martins Dos Santos Pinto, Profa. Dra. Rita De Cássia Loiola Cordeiro, Prof. Dr. Ary Dos Santos Pinto, Prof. Dr. Dirceu Barnabé Raveli, Prof. Dr. João Roberto Gonçalves, Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins, Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Júnior e Prof. Dr. Maurício Tatsuei Sakima, pelos conhecimentos compartilhados, pela atenção e agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Ary Dos Santos Pinto, Prof. Dr. Dirceu Barnabé Raveli, Prof. Dr. João Roberto Gonçalves e Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Júnior, exemplos de determinação e dedicação ao ensino e à pesquisa. Pela oportunidade ímpar de ter podido partilhar de seus conhecimentos, experiências profissionais e de vida, expresso meus sinceros agradecimentos, admiração e profundo respeito.

AGRADECIMENTOS

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, pela valiosa contribuição em minha formação acadêmica e científica.

Ao Prof. Dr. Adilson Thomazinho, Profª. Dra. Míriam Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof. Dr. Ademair Valente, Profª. Dra. Carla Enoki Itikawa, Profª. Elizabeth Norie Morizono e Prof. Marcelo Mestriner, pelos ensinamentos transmitidos, experiências compartilhadas e pela enorme contribuição na minha formação pessoal e profissional. Pelo constante incentivo, apoio e, sobretudo, por acreditarem nas minhas possibilidades. Deixo registrado meu respeito e gratidão.

À Profª. Dra. Magda Feres, Profª. Dra. Luciene Cristina Figueiredo e Prof. Dr. Marcelo Faveri, pela inestimável colaboração na realização deste trabalho, por partilharem seus conhecimentos e experiências em biologia molecular, pelo auxílio com os resultados e pela atenção e disponibilidade com que me receberam, expreso meu reconhecimento e estima.

À Profª. Dra. Izabel Yoko Ito, sempre disposta a partilhar de sua imensa sabedoria, pela gentileza em permitir-me trabalhar em seu laboratório.

À Profª. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva, pela valiosa colaboração com a análise estatística, pelos ensinamentos compartilhados e pela atenção com que sempre me recebeu.

À Dra. Gisele Faria, pela disponibilidade, auxílio prestado na descrição dos resultados e agradável convivência.

À bióloga **Izilvânia Q. Barreto**, técnica do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Guarulhos, pelo auxílio na realização do processamento microbiológico das amostras. Obrigada pela atenção, prontidão em atender sempre minhas solicitações e por ter me recebido tão bem na Universidade.

À **Maraisa Palhão Verri**, técnica do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, obrigada pela gentileza e atenção no preparo dos materiais necessários para a colheita das amostras durante o experimento.

Às amigas Pós-Graduandas **Marcela Perçiza** e **Patrícia Alves Ferreira Amato**, pela extrema dedicação, empenho e auxílio com a parte experimental desta pesquisa. Vocês foram fundamentais para que minha conquista se realizasse!

Às companheiras de turma de Mestrado, **Aparecida Fernanda Meloti**, **Betina Grehs Porto**, **Denise Rocha Góes** e **Roberta Maria de Paula Amaral**, que compartilharam das dificuldades, anseios e alegrias. Principalmente pelos bons momentos, levarei boas lembranças...

Aos Pós-Graduandos **Adriano Porto Peixoto**, **Amanda Fahning Ferreira Magno**, **André da Costa Monini**, **Cecília Helena Porto**, **Savana Maia Gallo**, **Milena Andrade Araújo**, **Patrícia Bicalho De Mello**, **Sandra Patrícia Palomino Gomes**, **Sergei Godeiro F. R. Caldas**, **Mário Lania de Araújo**, **Camilla Ivini Viana Vieira**, **Isabela Parsekian Martins**, **Taisa Boamorte Raveli**, **Renata De Cássia Gonçalves**, **Helder Baldi Jacob**, **Luana Paz Sampaio Dib**, **Ingrid Madeira**

B. Nunes, Simone Gallão e Tatiana Banzato Kreia, pela agradável convivência, ainda que por vezes pequena.

À Isabela Parsekian Martins e ao Renato Parsekian Martins, pela atenção e gentileza com que sempre me receberam.

À amiga Amanda Fahning Ferreira Magno, pelo incentivo no início desta etapa e pela amizade demonstrada em todos os momentos em que convivemos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Mara Cândida Munhoz do Amaral, Rosângela Aparecida Silva dos Santos, José Alexandre Garcia e Flávia Souza de Jesus, pelo auxílio prestado durante todo o curso e pela atenção com que sempre atenderam às minhas solicitações.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pela disponibilidade, e em especial à Sonia Maria Tircailo, pela atenção e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, em especial à Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas e à Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, pela atenção e disposição em sempre ajudar.

À todos os funcionários do "Gestos - Grupo de Estudos Ortodônticos e Serviços", pela prontidão com que me atenderam sempre que precisei.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, **Vera Ribeiro do Nascimento** e **Sr. José Aparecido Neves do Nascimento** pela disponibilidade em sempre ajudar e pela agradável convivência, fundamentais durante toda a etapa experimental deste trabalho. Pela amizade, carinho e respeito, meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pela disponibilidade e amizade.

Aos meus familiares que sempre me incentivaram, em especial às minhas **Tias Sandra Mara Damião Contart** e **Sarita Damião Médici**, pelo muito que representam pra mim.

Aos meus cunhados, **Jacqueline Tomazini** e **Francisco Carlos Gobbo Filho**, pelas alegrias e angústias compartilhadas. Obrigada pelo incentivo constante e agradável convívio.

Aos meus amigos **Leandro D. de Macedo**, **Mariana Chaves Borsato**, **Rosemeire de Lordo Franco** e **Valéria Pontelli Navarro**, pelo incentivo e amizade.

À **CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela bolsa concedida.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro, indispensável para o desenvolvimento deste estudo.

Aos **Pacientes**, que permitiram a realização deste estudo, minha gratidão pela confiança em mim depositada.

À **Colgate-Palmolive**, pela disponibilização das escovas dentais e Periogard® para a execução clínica do experimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, minha lembrança e gratidão.

“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...”

Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo da dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 PROPOSIÇÃO.....	24
3 ARTIGO I.....	26
4 ARTIGO II.....	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
6 REFERÊNCIAS.....	77
7 APÊNDICE.....	85
8 ANEXOS.....	99

RESUMO

Soato MCDA. Detecção de microrganismos em bráquetes metálicos in vivo, com ou sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

A presente Dissertação foi composta de dois estudos. O objetivo do primeiro estudo foi avaliar in vivo, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, a contaminação de bráquetes metálicos por 40 espécies diferentes de microrganismos pertencentes aos complexos amarelo, verde, laranja e vermelho, grupo dos *Actinomyces* e bactérias cariogênicas. Participaram do estudo 18 pacientes (11 a 29 anos), em tratamento ortodôntico, nos quais foram colados 2 bráquetes metálicos novos, em pré-molares diferentes. Decorridos 30 dias, os bráquetes foram removidos e processados pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os resultados foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($\alpha=5\%$). De acordo com os resultados obtidos, a maioria dos microrganismos estava presente em 100% dos indivíduos. Dentre os microrganismos cariogênicos, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram encontrados em maiores quantidades que *L. acidophilus* e *L. casei* ($p<0,001$). As bactérias periodontopatogênicas pertencentes ao complexo laranja foram evidenciadas em maiores quantidades do que as pertencentes ao complexo vermelho ($p<0,0001$). Dentre os demais microrganismos não associados com patologias específicas, a espécie observada em maior quantidade foi *V. parvula* ($p<0,0001$), pertencente ao complexo roxo. A quantidade dos microrganismos dos complexos amarelo, verde e do grupo dos *Actinomyces* foram semelhantes ($p>0,05$). O objetivo do segundo estudo foi avaliar, in vivo, por meio da técnica *Checkerboard*

DNA-DNA Hybridization, a contaminação de bráquetes metálicos por 17 espécies de microrganismos periodontopatogênicos dos complexos vermelho e laranja e a eficácia do gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®]), sob a forma de bochechos. Participaram do estudo 39 pacientes (11 a 33 anos), em tratamento ortodôntico, nos quais foram colados 2 bráquetes metálicos novos, em pré-molares diferentes. Os pacientes do grupo Controle fizeram 2 bochechos semanais com solução placebo, durante 30 dias e os pacientes do grupo Experimental fizeram bochechos com clorexidina, da mesma forma que o grupo Controle. Decorridos 30 dias, os bráquetes foram removidos e processados pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os resultados foram analisados por meio dos testes não-paramétricos de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn ($\alpha = 5\%$). De acordo com os resultados obtidos observou-se quantidades menores no total de microrganismos após a realização dos bochechos com clorexidina ($p < 0,0068$), assim como para os microrganismos do complexo laranja ($p = 0,03$). Os resultados obtidos nos dois estudos permitiram concluir que os bráquetes metálicos encontram-se multicolonizados por diversas espécies bacterianas, e que a clorexidina, utilizada duas vezes por semana sob a forma de bochechos, foi eficaz na redução dos níveis de microrganismos periodontopatogênicos, durante o tratamento ortodôntico.

Palavras-chave: Bráquetes ortodônticos, Microbiologia, Sondas DNA, Bactérias, Clorexidina.

ABSTRACT

Soato MCDA. Detection of microorganisms in metallic orthodontic brackets in vivo by the *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* after use or not of an antimicrobial agent [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

The present Master's degree thesis was composed of two studies. The purpose of the first study was to evaluate in vivo by the *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* technique the contamination of metallic orthodontic brackets by 40 microbial species of the yellow, green, orange and red complexes, *Actinomyces* group and cariogenic bacteria. Eighteen patients aged 11 to 29 years under orthodontic treatment were enrolled in this study and all subjects had 2 new metallic brackets bonded to different premolars in a randomized manner. After 30 days, the brackets were removed and processed for analysis by *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. The data were analyzed statistically by the non-parametric Kruskal-Wallis and Dunn's post tests ($\alpha=5\%$). According to the obtained results, most evaluated microorganisms were present in 100% of the individuals. Among the cariogenic microorganisms, *S. mutans* and *S. sobrinus* were found in larger numbers than *L. acidophilus* and *L. casei*. ($p<0.001$). The periodontopathogenic bacteria of the orange complex were detected in larger numbers than the red complex bacteria ($p<0.0001$). Among the other microorganisms not associated with specific pathologies, *V. parvula*, belonging to the purple complex, was the most frequently detected specie ($p<0.0001$). The number of yellow and green complex bacteria and *Actinomyces* group microorganisms was similar ($p>0.05$). The purpose of the second study was to evaluate in vivo by the *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* technique the contamination of metallic orthodontic brackets by 17 periodontopathogenic microorganisms of the red and orange complexes, and the efficacy of 0.12% chlorhexidine

gluconate (Periogard®) mouthwashes against these microbial strains. Thirty-nine patients aged 11 to 33 years under orthodontic treatment were enrolled in this study and all subjects had 2 new metallic brackets bonded to different premolars in a randomized manner. The patients in the Control group were instructed to use a placebo mouthwash twice a week, while those in the Experimental group were instructed to use a chlorhexidine oral rinse in the same way. After 30 days, the brackets were removed and processed for analysis by *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. The data were analyzed statistically by the non-parametric Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Dunn's post tests ($\alpha=5\%$). According to the obtained results, smaller numbers of total microorganisms ($p<0.0068$) as well as orange complex bacteria ($p=0.03$) were observed after use of the chlorhexidine mouthwash. Based on the findings of both studies, it may be concluded that the metallic brackets were multi-colonized by several bacterial species and that the use of chlorhexidine mouthwashes twice a week was effective in reducing the levels of periodontopathogenic microorganisms during the orthodontic treatment.

Key words: Orthodontic brackets, Microbiology, DNA probes, Bacteria, Chlorhexidine.

1 INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente bucal oferece condições ideais para a colonização das partes anatômicas que o compõem por uma microbiota bastante complexa, que coexiste em homeostase com o hospedeiro (Ferjerskov, Kidd¹⁸, 2005). No entanto, quando ocorrem modificações no ambiente bucal, a microbiota também se altera, o que resulta em desequilíbrio e possibilidade do desenvolvimento de doenças (Marsh³³, 2006).

O tratamento ortodôntico por meio do uso de aparelhos fixos e removíveis promove alterações específicas no meio bucal (Anhoury et al.⁶, 2002), incluindo redução do pH, aumento no acúmulo de biofilme dental (Naranjo et al.³⁹, 2006) e elevação dos níveis de microrganismos na saliva e no biofilme (Ai et al.⁴, 2005; Leung et al.²⁷, 2006; Madlena et al.³¹, 2000; Rosenbloom, Tinanoff⁴⁶, 1991; Sandham et al.⁵⁰, 1992; Sari, Birinci⁵¹, 2007). Esse fato ocorre, pois os aparelhos ortodônticos são compostos por uma variedade de materiais sólidos e elásticos (Steinberg, Eyal⁵⁶, 2004), com superfícies irregulares como bráquetes, acrílico, bandas, fios e outros acessórios, as quais funcionam como áreas de retenção de biofilme bacteriano (Ahn et al.¹, 2007; Ahn et al.², 2007; Ahn et al.³, 2006; Lessa et al.²⁶, 2007; Leung et al.²⁷, 2006; Magno et al.³², 2008). Além disso, dificultam a higienização (Faltermeier et al.¹⁶, 2008; Olympio et al.⁴², 2006) e a auto-limpeza mecânica efetuada pela saliva e pela movimentação da musculatura (Rosenbloom, Tinanoff⁴⁶, 1991).

O maior acúmulo de microrganismos após instalação de aparelhos ortodônticos implica no aumento do risco a doenças, como a cárie dental e a doença periodontal (Anhoury et al.⁶, 2002; Artun, Brobakken⁷, 1986; Chin et al.¹¹, 2006; Consolaro, Consolaro¹², 2008; Lo et al.²⁹, 2008; Naranjo et al.³⁹, 2006; Ogaard et al.⁴¹, 2001; Rosa et al.⁴⁵, 2005; Sudjalim et al.⁵⁷, 2007; Turkkahraman et al.⁵⁹, 2005), com possibilidade da ocorrência de alterações inflamatórias na mucosa do

palato (Martins-Ortiz et al.³⁴, 2004) e gengiva (Lee et al.²⁵, 2005; Sallum et al.⁴⁹, 2004), além de invasão de células da mucosa por microrganismos (Leung et al.²⁷, 2006).

Deve-se ressaltar, ainda, que nunca houve uma análise das consequências sistêmicas do uso de aparelhos contaminados, por longos períodos de tempo.

Sabe-se que os microrganismos podem ter acesso à corrente circulatória após procedimentos odontológicos, como a colocação de elásticos de separação (Lucas et al.³⁰, 2002), colocação e remoção de bandas (Erverdi et al.¹⁵, 2001; Rosa et al.⁴⁵, 2005) e remoção de aparelhos para expansão rápida da maxila (Gürel et al.²², 2009; Rosa et al.⁴⁵, 2005). Esse fato implica na necessidade de cuidados adicionais, como antibioticoterapia profilática ou uso de agentes antimicrobianos durante o tratamento ortodôntico em pacientes portadores de necessidades especiais, incluindo aqueles que apresentam risco de complicações cardíacas ou risco de endocardite bacteriana (Lucas et al.³⁰, 2002; Rosa et al.⁴⁵, 2005).

Em pacientes com aparelhos ortodônticos fixos, os quais não podem ser removidos da boca para serem higienizados, o controle da contaminação microbiana por meio do uso de agentes químicos é de fundamental relevância, não apenas para reduzir o risco de doenças prevalentes como cárie dental e doença periodontal, mas também para preservar a saúde geral do paciente. Conforme salientado por Martins-Ortiz et al.³⁴ (2004), no consultório odontológico não são tratados apenas pacientes sistemicamente saudáveis, mas também cardiopatas, diabéticos e imunodeprimidos, entre outros, justificando a necessidade de cuidados adicionais.

Em Ortodontia, diversos autores têm se preocupado em avaliar a contaminação microbiana da superfície de componentes específicos de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis. No entanto, na maioria das vezes são avaliados microrganismos cariogênicos (Ahn et

al.¹, 2007; Ahn et al.², 2007; Faltermeier et al.¹⁶, 2008; Lim et al.²⁸, 2008; Steinberg, Eyal⁵⁶, 2004), empregando-se particularmente técnicas de cultura microbiana (Brusca et al.¹⁰, 2007; Lessa et al.²⁶, 2007; Magno et al.³², 2008; Maruo et al.³⁵, 2008; Papaioannou et al.⁴³, 2007).

Com o advento das novas técnicas de biologia molecular, avanços ocorreram na área da Microbiologia, tornando possível a identificação de espécies bacterianas de maneira mais confiável, por meio de sondas de DNA. Dentre as técnicas de biologia molecular destaca-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, empregada em Odontologia nas áreas de Periodontia (Ioannou et al.²⁴, 2009; Matarazzo et al.³⁶, 2008; Teles et al.⁵⁸, 2007), Endodontia (Siqueira, Rôças⁵², 2009; Vianna et al.⁶⁰, 2008), Implantodontia (Nascimento et al.⁴⁰, 2009) Odontopediatria (Gizani et al.²¹, 2009; Ruvierre et al.⁴⁷, 2007; Youravong et al.⁶¹, 2007), Cariologia (Filoche et al.¹⁹, 2007; Filoche et al.²⁰, 2008) e Microbiologia Oral (Haffajee et al.²³, 2008; Sakamoto et al.⁴⁸, 2005), entre outras.

A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi preconizada por Socransky et al.⁵⁵, em 1994. Este método de diagnóstico oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana, incluindo a detecção de microrganismos de desenvolvimento lento, nutricionalmente exigentes, além da detecção da microbiota não cultivável. Também, é um método preciso e mais rápido que o empregado na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*), pois utiliza várias sondas de DNA de uma única vez, podendo-se estocar as amostras por longos períodos (Moraes et al.³⁷, 2002; Siqueira et al.⁵³, 2000).

Estudos empregando técnicas de biologia molecular também têm sido realizados em Ortodontia. A técnica *PCR* foi utilizada para analisar a contaminação por microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos no biofilme supra e subgingival durante o tratamento ortodôntico (Ai et al.⁴, 2005; Lee et al.²⁵, 2005; Sallum et al.⁴⁹, 2004) e a contaminação por microrganismos cariogênicos em bráquetes

metálicos (Ahn et al.¹, 2007). No entanto, a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, foi empregada em apenas um estudo piloto efetuado por Anhoury et al.⁶ em 2002, para avaliar a contaminação em bráquetes metálicos e cerâmicos.

Como já salientado, para a prevenção e controle da instalação de processos patológicos na cavidade bucal, embora os métodos de higiene bucal nos pacientes com aparelhos ortodônticos devam ser enfatizados (Lim et al.²⁸, 2008; Naranjo et al.³⁹, 2006), em crianças e jovens a destreza manual e o cuidado com a higiene bucal, na maior parte das vezes, são fatores que comprometem o controle mecânico do biofilme (Dills et al.¹⁴, 1988). Adicionalmente, segundo Smiech-Slomkowska, Jablonska-Zrobek⁵⁴ (2007), embora a escovação e o uso do fio dental sejam de fundamental importância, essas medidas não reduzem de forma relevante os níveis salivares de microrganismos em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos.

Em função disso, vários autores preconizam o uso de agentes antimicrobianos, principalmente sob a forma de bochechos, sprays ou vernizes, como coadjuvantes no controle do biofilme dental e do biofilme dos aparelhos (Alves et al.⁵, 2008; Bagatin-Rossi⁸, 2007; Brightman et al.⁹, 1991; Derks et al.¹³, 2008; Fardal, Turnbull¹⁷, 1986; Lessa et al.²⁶, 2007; Maruo et al.³⁵, 2008; Peixoto⁴⁴, 2007; Sari, Birinci⁵¹, 2007). Um enfoque especial tem sido dado à clorexidina, pois esta é considerada o antimicrobiano “padrão ouro”, quando comparada aos demais agentes disponíveis no comércio especializado (Moshrefi³⁸, 2002).

No entanto, até o momento não há estudos publicados avaliando a composição da microbiota de bráquetes metálicos, durante tratamento com aparelhos ortodônticos fixos, com ou sem o uso de agentes antimicrobianos, empregando técnicas de biologia molecular como o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

2 PROPOSIÇÃO



2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo clínico randomizado foi avaliar in vivo, por meio da técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*:

- A contaminação em bráquetes metálicos por 40 espécies de microrganismos, por meio de sondas de DNA; e
- A contaminação de bráquetes metálicos por 17 espécies de microrganismos periodontopatogênicos e a eficácia do gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®]) sobre esses microrganismos, sob a forma de bochecho.

3 ARTIGO I



3 ARTIGO I

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE BRÁQUETES METÁLICOS IN VIVO, POR MEIO DA TÉCNICA *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION.*

RESUMO

Soato MCDA. Avaliação da contaminação microbiana de bráquetes metálicos in vivo, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

Diferentes autores têm avaliado a contaminação microbiana de componentes específicos de aparelhos ortodônticos, empregando particularmente técnicas de cultura microbiana. No entanto, avanços ocorreram na área da Microbiologia, tornando possível a identificação de espécies bacterianas de maneira mais confiável, por meio de técnicas de biologia molecular. O objetivo deste estudo clínico randomizado foi avaliar in vivo, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, a contaminação de bráquetes metálicos por 40 espécies de microrganismos pertencentes aos complexos amarelo, verde, laranja e vermelho, grupo dos *Actinomyces* e bactérias cariogênicas. Participaram do estudo 18 pacientes (11 a 29 anos), em tratamento ortodôntico, nos quais foram colados 2 bráquetes metálicos novos, em pré-molares diferentes. Decorridos 30 dias, os bráquetes foram removidos e processados pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os resultados foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%. De acordo com os resultados obtidos, a maioria dos microrganismos estava presente em 100% dos indivíduos, exceto *S. constellatus*, *C. rectus*, *T. forsythia*, *T. socranskii* e *L. acidophilus* (presentes em 94,4% dos indivíduos), *P. acnes I* e *E. nodatum* (presentes em 88,9%) e *T. denticola* (presentes em 77,8%). Dentre os microrganismos cariogênicos, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram encontrados em maiores quantidades que *L. acidophilus* e *L. casei*

($p < 0,001$). As bactérias periodontopatogênicas pertencentes ao complexo laranja foram evidenciadas em maiores quantidades do que as pertencentes ao complexo vermelho ($p < 0,0001$). Dentre os demais microrganismos não associados com patologias específicas, a espécie observada em maior quantidade foi *V. parvula* ($p < 0,0001$), pertencente ao complexo roxo. A quantidade dos microrganismos dos complexos amarelo, verde e do grupo dos *Actinomyces* foram semelhantes ($p > 0,05$). Concluiu-se que os bráquetes metálicos encontram-se multicolonizados por diversas espécies bacterianas, sugerindo que medidas preventivas devam ser adotadas para prevenir o desenvolvimento de doenças, durante o tratamento ortodôntico.

Palavras-chave: Bráquetes ortodônticos, Microbiologia, Sondas DNA, Bactérias.

INTRODUÇÃO

O tratamento ortodôntico por meio do uso de aparelhos fixos promove alterações específicas no meio bucal⁴ incluindo redução do pH, aumento no acúmulo de biofilme dental²³ e elevação dos níveis de microrganismos na saliva e no biofilme^{3,28}.

O maior acúmulo de microrganismos na cavidade bucal não implica apenas no aumento do risco a doenças como a cárie dental e a doença periodontal^{4,17}, mas também na possibilidade da ocorrência de complicações sistêmicas^{10,12,15,20}.

Considerando que determinados procedimentos ortodônticos podem levar a bacteriemias transitórias^{18,25,9}, cuidados adicionais tornam-se necessários, como o uso de agentes antimicrobianos durante o tratamento ortodôntico, ou até mesmo a necessidade de antibioticoterapia profilática em casos específicos, para preservar a saúde geral do paciente, principalmente daqueles com algum comprometimento sistêmico^{18,25}.

Diversos autores têm se preocupado em avaliar a contaminação microbiana da superfície de componentes específicos de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis. No entanto, na maioria das vezes são avaliados microrganismos cariogênicos^{1,2,7,16,33}, empregando-se particularmente técnicas de cultura microbiana^{5,14,19,21,24}.

Com o advento das novas técnicas de biologia molecular, avanços ocorreram na área da Microbiologia, tornando possível a identificação de espécies bacterianas de maneira mais confiável, por meio de sondas de DNA. Dentre as técnicas de biologia molecular destaca-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, empregada em Odontologia nas áreas de Periodontia²², Endodontia³⁰, Implantodontia⁶, Odontopediatria²⁶ e Cariologia⁸, entre outras. Em Ortodontia, essa técnica foi empregada em apenas um estudo piloto, efetuado por Anhoury et al.⁴,

em 2002, para avaliar a contaminação em bráquetes metálicos e cerâmicos.

Considerando que o conhecimento da microbiota dos aparelhos é importante para possibilitar o desenvolvimento de medidas preventivas específicas para prevenir o desenvolvimento de doenças durante o tratamento ortodôntico, o objetivo do presente estudo foi avaliar, in vivo, a contaminação de bráquetes metálicos empregando 40 sondas de DNA para diferentes espécies bacterianas, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, 30 dias após sua colocação na cavidade bucal.

MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 2008.1.163.58.8 - Anexo 1) sendo obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis (Anexo 2). Foram selecionados 18 pacientes de 11 a 29 anos de idade, de ambos os gêneros, com dentição permanente completa, em tratamento com aparelho ortodôntico fixo na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, por um tempo máximo de 16 meses.

Após a realização de anamnese detalhada, os indivíduos deveriam apresentar boa saúde geral, e não poderiam ter feito uso de antibióticos e/ou bochechos com soluções antimicrobianas por um período mínimo de 3 meses, previamente ao início da pesquisa.

Uma semana antes do início do experimento foi efetuada a avaliação do índice de placa²⁹ por um único operador, seguida de evidenciação do biofilme dental e rigorosa profilaxia com pedra-pomes e

água. Em seguida, cada paciente recebeu uma escova dental Professional[®] (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, S B Campo, SP, BR), dentifrício fluoretado Colgate Máxima Proteção Anticáries[®] (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, S B Campo, SP, BR) e instruções de higiene bucal individualmente, sendo orientados a escovar os dentes 3 vezes ao dia, durante o período do experimento.

Os pacientes foram aleatoriamente divididos para determinar quais dentes seriam utilizados (15 e 25 / 35 e 45), com o auxílio do programa *SAS (Statistical Analysis System) for Windows* versão 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Cada paciente selecionado recebeu novos bráquetes metálicos com *slot* 0.022" x 0.028" e prescrição Edgewise (Generus; GAC International Inc, Bohemia, NY, USA), previamente autoclavados, nos pré-molares determinados, colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Decorridos 30 dias, os 2 bráquetes foram removidos de cada paciente com alicate ortodôntico (How reto – TP Orthodontics, Inc, La Porte, IN, USA) e processados para posterior análise. Todos os procedimentos clínicos foram realizados por um único operador especialista em Ortodontia.

Processamento das amostras

Cada bráquete foi colocado individualmente em tubos plásticos para microcentrifuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 150 µL de solução tampão TE (pH 7,6) e 100 µL de NaOH a 0,5 M, codificados e agitados vigorosamente em aparelho Mixtron (Toptronix – São Paulo, SP, BR), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para dessorção do material. Os bráquetes foram então removidos com uma pinça clínica esterilizada e os tubos contendo a suspensão bacteriana foram estocados a -20°C, até o momento do processamento.

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

O conteúdo de cada amostra foi avaliado utilizando-se da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*³², para verificar a presença de 40 espécies bacterianas diferentes, por meio de sondas de DNA (Tabela 1). As amostras foram aquecidas para lisar as células bacterianas e o DNA contido nas mesmas foi depositado sobre uma membrana de nylon com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA), com o auxílio de um dispositivo específico (*Minislot-30* - Immunetics, Cambridge, MA, USA).

Após a fixação do DNA sobre a membrana, esta foi colocada em outro dispositivo (*Miniblotter-45* - Immunetics), com as linhas contendo o DNA das amostras posicionadas perpendicularmente às canaletas do *Miniblotter-45*. As sondas de DNA para os 40 microrganismos diferentes, marcadas com digoxigenina, foram depositadas nas canaletas do *Miniblotter-45* para a hibridização das sondas com o DNA das amostras. As membranas foram então lavadas em alta adstringência e as sondas de DNA foram detectadas utilizando-se o anticorpo anti-digoxigenina, conjugado à fosfatase alcalina, por meio da observação dos sinais de quimioluminescência. As duas últimas linhas horizontais da membrana continham controles nas concentrações de 10^5 e 10^6 bactérias de cada espécie que estava sendo investigada. Os sinais produzidos foram comparados aos controles e convertidos em contagem absoluta (0 , 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7). A leitura dos resultados foi realizada duas vezes para a conferência dos resultados por um único examinador calibrado ($Kappa > 0,8$) e cego com relação aos grupos avaliados. A sensibilidade foi ajustada para permitir a detecção de 10^4 células das espécies que estavam sendo avaliadas pelo ajuste da concentração das sondas de DNA.

Tabela 1- Cepas bacterianas utilizadas para a obtenção das sondas de DNA

Microrganismo	Cepa
Bactérias cariogênicas	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356 ^a
<i>Lactobacillus casei</i>	393 ^a
<i>Streptococcus mutans</i>	25175 ^a
<i>Streptococcus sobrinus</i>	33748 ^a
Grupo dos Actinomyces	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a
<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	17929 ^a
Complexo roxo	
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a
Complexo amarelo	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a + b</i>	43718 ^a
	29523 ^a
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
	11827 ^a
<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11828 ^a
	11828 ^a
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a
Complexo verde	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a
Complexo laranja	
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss vincentii</i>	49256 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
Complexo vermelho	
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Haffajee et al.¹¹ (2008), e bactérias cariogênicas.

^a ATCC (American Type Culture Collection).

^b Forsyth Institute, Boston, MA.

A descrição detalhada do preparo das sondas de DNA a partir das cepas bacterianas e a técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, empregada para a detecção de microrganismos nos bráquetes ortodônticos metálicos, encontra-se descrita detalhadamente no Apêndice 1.

Análise Estatística

Os resultados obtidos com a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram analisados de forma descritiva, utilizando o software *SAS (Statistical Analysis System) for Windows* versão 9.1.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA), a fim de avaliar o nível de contaminação dos bráquetes por cada um dos 40 microrganismos avaliados. Para a comparação das contagens de bactérias foi empregado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn, utilizando o software *Graphpad Prism for Windows* versão 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

A análise descritiva dos resultados mostrou que a maioria das sondas utilizadas estava presente em 100% dos pacientes, exceto *S. constellatus*, *C. rectus*, *T. forsythia*, *T. socranskii* e *L. acidophilus* que estavam presentes em 94,4% dos indivíduos, *P. acnes I* e *E. nodatum* presentes em 88,9% e *T. denticola*, que foi a espécie menos prevalente, tendo sido encontrada em 77,8% dos indivíduos.

A prevalência das bactérias presentes nos bráquetes metálicos, agrupadas por complexos microbianos¹¹ e bactérias cariogênicas, está apresentada no Gráfico 1.

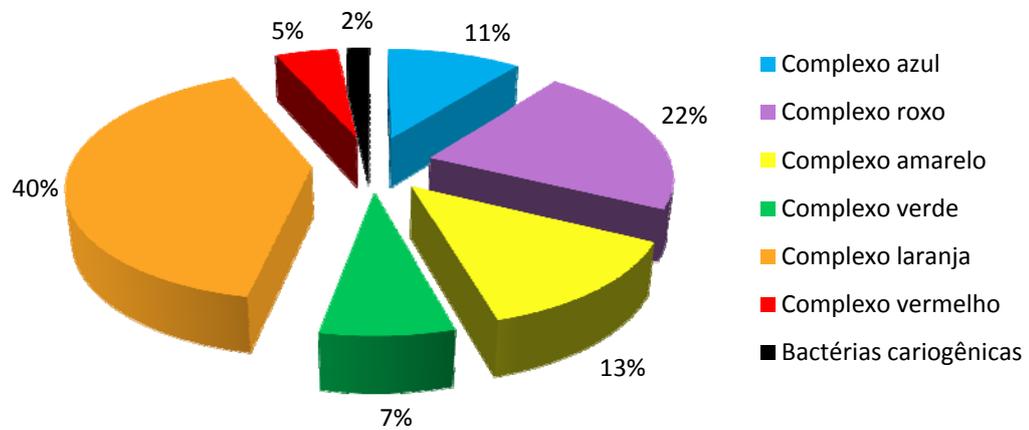


GRÁFICO 1- Prevalência das bactérias presentes nos bráquetes metálicos, agrupadas por complexos microbianos e bactérias cariogênicas.

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total das 40 espécies de microrganismos nos indivíduos variou de 34.250.000 a 188.130.000, com mediana de 75.060.000.

A distribuição da quantidade de cada microrganismo avaliado encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição da quantidade dos microrganismos presentes nos bráquetes metálicos

Microrganismo	M(Q1-Q3)	Microrganismo	M(Q1-Q3)
Bactérias cariogênicas		Complexo verde	
<i>L. acidophilus</i>	100.000 (20.000 - 110.000)	<i>C. gingivalis</i>	1.500.000 (1.000.000 - 2.000.000)
<i>L. casei</i>	20.000 (20.000 - 20.000)	<i>C. sputigena</i>	600.000 (200.000 - 1.000.000)
<i>S. mutans</i>	800.000 (200.000 - 1.000.000)	<i>E. corrodens</i>	1.000.000 (600.000 - 1.500.000)
<i>S. sobrinus</i>	600.000 (200.000 - 1.000.000)	Complexo laranja	
Complexo azul		<i>C. gracilis</i>	1.000.000 (600.000 - 1.000.000)
<i>A. gerencseriae</i>	1.000.000 (600.000 - 1.000.000)	<i>C. rectus</i>	600.000 (200.000 - 1.000.000)
<i>A. israelii</i>	600.000 (600.000 - 1.000.000)	<i>C. showae</i>	1.000.000 (600.000 - 1.500.000)
<i>A. naeslundii I</i>	600.000 (600.000 - 1.500.000)	<i>C. ochracea</i>	1.000.000 (600.000 - 2.000.000)
<i>A. naeslundii II</i>	1.750.000 (1.000.000 - 11.000.000)	<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	1.500.000 (1.100.000 - 11.000.000)
<i>A. odontolyticus I</i>	600.000 (200.000 - 1.000.000)	<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	1.250.000 (1.000.000 - 1.500.000)
Complexo roxo		<i>F. nucleatum sp polymorphum</i>	1.500.000 (1.000.000 - 1.500.000)
<i>V. parvula</i>	20.000.000 (20.000.000 - 20.000.000)	<i>F. periodonticum</i>	1.500.000 (1.500.000 - 11.000.000)
Complexo amarelo		<i>P. intermedia</i>	1.000.000 (500.000 - 1.000.000)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	600.000 (200.000 - 1.000.000)	<i>P. melaninogenica</i>	2.000.000 (1.500.000 - 20.000.000)
<i>L. buccalis</i>	1.000.000 (600.000 - 1.000.000)	<i>P. nigrescens</i>	1.000.000 (1.000.000 - 1.500.000)
<i>P. acnes</i>	60.000 (20.000 - 200.000)	<i>S. noxia</i>	1.000.000 (600.000 - 1.500.000)
<i>S. anginosus</i>	600.000 (200.000 - 600.000)	Complexo vermelho	
<i>S. constellatus</i>	110.000 (20.000 - 600.000)	<i>E. nodatum</i>	20.000 (10.000 - 110.000)
<i>S. gordonii</i>	1.500.000 (1.000.000 - 2.000.000)	<i>P. gingivalis</i>	200.000 (110.000 - 200.000)
<i>S. intermedius</i>	600.000 (200.000 - 1.000.000)	<i>T. forsythia</i>	200.000 (200.000 - 1.000.000)
<i>S. mitis</i>	1.000.000 (1.000.000 - 1.500.000)	<i>T. denticola</i>	100.000 (10.000 - 200.000)
<i>S. oralis</i>	1.000.000 (600.000 - 1.000.000)	<i>T. socranskii</i>	600.000 (200.000 - 1.500.000)
<i>S. sanguinis</i>	1.500.000 (1.000.000 - 1.500.000)		

Os valores referentes ao número total de microrganismos encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil.

Avaliando as bactérias por complexos, pôde-se observar que as bactérias periodontopatogênicas pertencentes ao complexo laranja foram evidenciadas em maiores quantidades do que as pertencentes ao complexo vermelho ($p < 0,0001$). Dentre os demais microrganismos não associados com patologias específicas, o complexo roxo apresentou-se em maiores quantidades ($p < 0,0001$), enquanto que não houve diferença para as quantidades dos microrganismos dos complexos amarelo, verde e do grupo dos *Actinomyces* ($p > 0,05$).

V. parvula, espécie pertencente ao complexo roxo, foi o microrganismo encontrado em maiores quantidades ($p < 0,0001$), dentre todas as sondas avaliadas.

Com relação às sondas das bactérias cariogênicas, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram encontradas em quantidades maiores que *L. acidophilus* e *L. casei* ($p < 0,001$).

A. naeslundii II foi a espécie que estava em maior quantidade no grupo dos *Actinomyces* ($p < 0,001$).

Dentre as espécies pertencentes ao complexo amarelo, as presentes em maiores quantidades foram: *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* e *L. buccalis* ($p < 0,05$).

Com relação às três espécies bacterianas pertencentes ao complexo verde, *C. gingivalis* foi encontrada em maiores quantidades, seguida de *E. corrodens* e *C. sputigena*. No entanto, houve diferença apenas entre *C. gingivalis* e *C. sputigena* ($p < 0,05$).

Todas as espécies do complexo laranja foram encontradas em quantidades elevadas nos indivíduos avaliados, sem diferença significativa entre elas ($p > 0,05$), com exceção de *P. intermedia*, *C. gracilis* e *C. rectus*.

Com relação ao complexo vermelho, as bactérias em maiores quantidades foram *T. socranskii*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* ($p < 0,05$).

O Gráfico 2 apresenta as contagens das 40 espécies de microrganismos avaliados, presentes nos bráquetes metálicos, separados por complexos microbianos e bactérias cariogênicas.

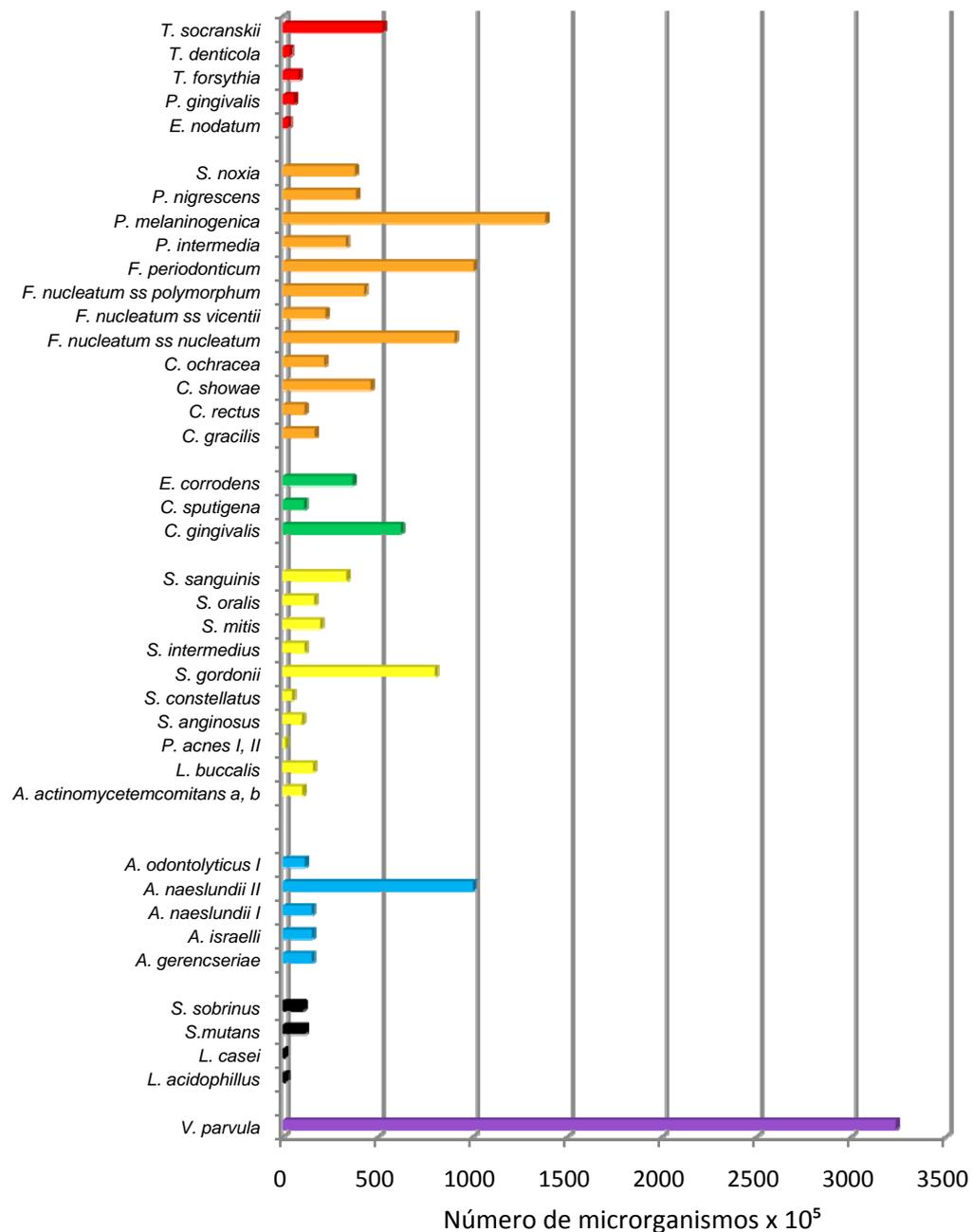


GRÁFICO 2- Contagem do número total das 40 espécies de microrganismos avaliados, presentes nos bráquetes metálicos, separados por complexos microbianos e bactérias cariogênicas.

DISCUSSÃO

A escolha da técnica *Checkerboard DND-DNA Hybridization* para este estudo se deu em função da possibilidade de permitir a detecção de microrganismos de difícil cultivo, até então não detectáveis por técnicas de cultura microbiana, além de permitir a avaliação de uma maior quantidade de espécies de uma única vez³², possibilitando, desta forma, estabelecer um perfil da contaminação microbiana de bráquetes metálicos in vivo, durante o tratamento ortodôntico.

As espécies bacterianas selecionadas para este estudo são espécies encontradas com frequência na cavidade bucal, associadas ou não com patologias específicas, as quais podem ocorrer durante o tratamento ortodôntico, incluindo a cárie dental e a doença periodontal. Para facilitar a obtenção e a interpretação dos resultados, as espécies bacterianas analisadas, com exceção das bactérias cariogênicas, foram divididas de acordo com os complexos microbianos da placa supra-gengival, definidas por Haffajee et al.¹¹ (2008), considerando que os bráquetes são acessórios colados na coroa do elemento dental, próximo à gengiva.

Poucos foram os estudos em Ortodontia que verificaram a contaminação bacteriana em partes específicas de aparelhos ortodônticos por meio de técnicas de biologia molecular, como o *PCR*² (Reação em Cadeia da Polimerase) e o *Checkerboard DND-DNA Hybridization*⁴, fato este que limita a possibilidade de comparação dos resultados obtidos no presente estudo com a literatura específica.

Anhoury et al.⁴ (2002) compararam a contagem de microrganismos em bráquetes metálicos e cerâmicos, da região de incisivos e pré-molares superiores, obtidos no momento da remoção do aparelho, ao final do tratamento, após períodos não relatados de permanência na cavidade bucal. De acordo com os resultados obtidos, o

tipo de bráquete não influenciou na contagem de microrganismos. A maioria das sondas bacterianas empregadas por esses autores foi também avaliada em nosso estudo.

Os microrganismos cariogênicos empregados por Anhoury et al.⁴ (2002) foram *S. mutans* e *L. acidophilus*, os quais foram observados em quantidades semelhantes. Em nosso estudo, *S. mutans* e *S. sobrinus* estavam em quantidades maiores que *L. acidophilus* e *L. casei* ($p < 0,001$). Em 2007, Ahn et al.² também analisaram a prevalência de estreptococos do grupo mutans aderidos a bráquetes metálicos através da detecção do DNA bacteriano, extraído e amplificado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. Foram utilizados bráquetes dos incisivos superiores e inferiores, no momento da remoção do aparelho. A prevalência de *S. mutans* foi aproximadamente duas vezes maior que a de *S. sobrinus*. No presente estudo, empregando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, não foi observado diferença nas contagens entre os dois microrganismos.

As espécies dos complexos amarelo, verde, roxo e o grupo dos *Actinomyces* são microrganismos que não estão relacionados com doenças específicas e geralmente colonizam o biofilme dental previamente às espécies dos complexos laranja e vermelho³¹. De acordo com os resultados do estudo de Anhoury et al.⁴ (2002), o grupo dos *Actinomyces* foi encontrado em maiores quantidades que as bactérias dos complexos amarelo, verde e roxo. No presente estudo, a bactéria *V. parvula*, pertencente ao complexo roxo, foi encontrada em maior quantidade quando comparada aos microrganismos dos outros complexos ($p < 0,0001$) e as bactérias do grupo dos *Actinomyces* foram encontradas em quantidades semelhantes às bactérias do complexo verde e amarelo ($p > 0,05$).

As espécies bacterianas dos complexos vermelho e laranja são espécies associadas com a doença periodontal^{11,31} e estão relacionadas com a inflamação gengival comumente observada durante o

tratamento ortodôntico^{13,27}. No presente estudo, as espécies do complexo laranja foram as bactérias mais prevalentes nos bráquetes metálicos, constituindo 40% do total de bactérias, podendo estar associadas com a inflamação gengival, considerando a proximidade destes com a gengiva.

Por outro lado, os nossos resultados evidenciaram quantidades menores das espécies pertencentes ao complexo vermelho quando comparadas às do complexo laranja ($p < 0,0001$). Resultados semelhantes também foram encontrados por Anhoury et al.⁴ (2002), com exceção de *E. nodatum*. De acordo com Socransky et al.³¹ (1998), a colonização pelas espécies pertencentes ao complexo laranja precedem a colonização pelas espécies pertencentes ao complexo vermelho, o que poderia explicar os maiores números obtidos no presente estudo para as espécies do complexo laranja.

Além disso, as diferenças observadas entre os nossos resultados e os relatados por Anhoury et al.⁴ (2002) podem ser possivelmente explicadas pelo fato de que esses autores avaliaram bráquetes removidos no final do tratamento ortodôntico, ou seja, após longos períodos de permanência na cavidade bucal, o que pode ter aumentado a colonização posterior por determinados microrganismos.

Considerando a ampla variedade de espécies bacterianas observadas nos bráquetes metálicos in vivo, estudos adicionais são necessários para tornar possível o desenvolvimento de protocolos clínicos preventivos eficazes no controle da contaminação microbiana, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de doenças, durante o tratamento ortodôntico.

CONCLUSÃO

Os bráquetes metálicos encontraram-se multicolonizados por diversas espécies bacterianas, sugerindo que medidas preventivas devam ser desenvolvidas e adotadas na prática clínica para prevenir o desenvolvimento de doenças, durante o tratamento ortodôntico.

REFERÊNCIAS

1. Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;132:815-21.
2. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:736-41.
3. Ai H, Lu HF, Liang HY, Wu J, Li RL, Liu GP, et al. Influences of bracket bonding on mutans streptococcus in plaque detected by real time fluorescence-quantitative polymerase chain reaction. *Chin Med J (Engl).* 2005;118:2005-10.
4. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod.* 2002;72:338-43.
5. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod.* 2007;77:331-6.

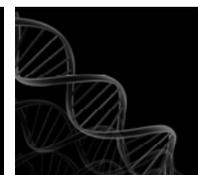
6. do Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque Junior RF. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to evaluate the internal contamination of dental implants and comparison of bacterial leakage with cast or pre-machined abutments. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Feb 21.
7. Faltermeier A, Burgers R, Rosentritt M. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:S99-103.
8. Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54:27-36.
9. Gurel HG, Basciftci FA, Arslan U. Transient bacteremia after removal of a bonded maxillary expansion appliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135:190-3.
10. Gurenlian JR. Inflammation: the relationship between oral health and systemic disease. *Dent Assist.* 2009;78:8-10, 2-4, 38-40; quiz 1-3.
11. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:196-205.
12. Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, et al. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2009 Apr 5.
13. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, et al. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol.* 2005;43:260-5.

14. Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:705 e11-7.
15. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:547-58.
16. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:882-8.
17. Lo BA, Di Marco R, Milazzo I, Nicolosi D, Cali G, Rossetti B, et al. Microbiological and clinical periodontal effects of fixed orthodontic appliances in pediatric patients. *New Microbiol.* 2008;31:299-302.
18. Lucas VS, Omar J, Vieira A, Roberts GJ. The relationship between odontogenic bacteraemia and orthodontic treatment procedures. *Eur J Orthod.* 2002;24:293-301.
19. Magno AF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Faria G, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:S104-9.
20. Marques da Silva R, Caugant DA, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysms by multiplex polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2005;76:590-4.
21. Maruo IT, Rosa EA, Maruo H, Tanaka O, Guariza Filho O, Ignacio SA, et al. Effect of chlorhexidine mouth rinse on *Streptococci* counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11:136-42.

22. Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Favari M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008;35:885-96.
23. Naranjo AA, Trivino ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:275 e17-22.
24. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod.* 2007;77:1090-5.
25. Rosa EA, Rached RN, Tanaka O, Fronza F, Fronza F, Araujo Assad R. Preliminary investigation of bacteremia incidence after removal of the Haas palatal expander. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;127:64-6.
26. Ruviere DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child (Chic).* 2007;74:118-23.
27. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Goncalves RB, Machion L, Wilson Sallum A, et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;126:363-6.
28. Sari E, Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients. *Angle Orthod.* 2007;77:881-4.
29. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand.* 1964;22:121-35.

30. Siqueira JF, Jr., Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009;88:61-5.
31. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-44.
32. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994;17:788-92.
33. Steinberg D, Eyal S. Initial biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. *J Oral Rehabil.* 2004;31:1041-5.

4 ARTIGO II



4 ARTIGO II

**EFICÁCIA DA CLOREXIDINA SOBRE MICRORGANISMOS
PERIODONTOPATOGÊNICOS PRESENTES EM BRÁQUETES
METÁLICOS IN VIVO, POR MEIO DA TÉCNICA *CHECKERBOARD*
DNA-DNA HYBRIDIZATION.**

RESUMO

Soato MCDA. Eficácia da clorexidina sobre microrganismos periodontopatogênicos presentes em bráquetes metálicos in vivo, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

O tratamento ortodôntico promove alterações específicas no meio bucal, incluindo a redução do pH, aumento do acúmulo de biofilme dental e dos níveis de microrganismos na saliva, no biofilme e na superfície dos aparelhos. No entanto, a avaliação da contaminação microbiana em Ortodontia, na maior parte das vezes, se restringe à detecção de microrganismos cariogênicos, geralmente por técnicas de cultura microbiana. O objetivo do presente estudo clínico randomizado foi avaliar, in vivo, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, a contaminação de bráquetes metálicos por 17 espécies de microrganismos periodontopatogênicos dos complexos vermelho e laranja e a eficácia do gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®), sob a forma de bochechos. Participaram do estudo 39 pacientes (11 a 33 anos), em tratamento ortodôntico, nos quais foram colados 2 bráquetes metálicos novos, em pré-molares diferentes. Os pacientes do grupo Controle (n=18) fizeram 2 bochechos semanais com solução placebo, durante 30 dias e os pacientes do grupo Experimental (n=21) fizeram bochechos com clorexidina, da mesma forma que o grupo Controle. Decorridos 30 dias, os bráquetes foram removidos e processados pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Para a verificação da aleatorização dos indivíduos entre os dois grupos, foram realizados os testes de qui-quadrado para comparação da proporção dos gêneros, teste t para comparação das médias das idades e Kruskal-Wallis para a distribuição do biofilme dental. Os resultados obtidos foram analisados por meio dos

testes não-paramétricos de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados da aleatorização dos indivíduos evidenciaram que não houve diferença com relação ao gênero, à idade e à quantidade de biofilme dental entre os dois grupos. De acordo com os resultados obtidos, observou-se quantidades menores no número total de microrganismos ($p=0,0068$) e no número de bactérias do complexo laranja ($p=0,03$), após a realização dos bochechos com clorexidina. As espécies que apresentaram redução foram *C. rectus*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss vicentii*, *F. nucleatum ss polymorphum* e *F. periodonticum*. Concluiu-se que a clorexidina, utilizada duas vezes por semana sob a forma de bochechos, foi eficaz na redução dos níveis de microrganismos periodontopatogênicos, durante o tratamento ortodôntico.

Palavras-chave: Bráquetes ortodônticos, Microbiologia, Sondas DNA, Bactérias, Clorexidina.

INTRODUÇÃO

Em Ortodontia, diversos autores têm se preocupado em avaliar a contaminação microbiana da superfície de componentes específicos de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis, empregando, na maioria das vezes, técnicas de cultura microbiana^{4,14,16,17,20} particularmente por microrganismos cariogênicos^{1,2,7,15,30}.

No entanto, alguns autores têm relatado que o uso de aparelhos ortodônticos promove o aumento de patógenos periodontais no biofilme supra²¹ e subgingival^{13,21,32}, os quais estão diretamente relacionados com a inflamação gengival que ocorre durante o tratamento ortodôntico^{13,21}. Apesar disso, a presença de microrganismos periodontopatogênicos em aparelhos ortodônticos tem sido pouco avaliada³.

Haffajee et al.¹¹ (2008) dividiram os microrganismos encontrados no placa supragengival em complexos roxo, amarelo, verde, laranja, vermelho e grupo dos *Actinomyces*. De acordo com esses autores, os microrganismos pertencentes aos complexos vermelho e laranja estão altamente associados com a doença periodontal.

Com o advento das novas técnicas de biologia molecular, incluindo o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*²⁷, avanços ocorreram na área da Microbiologia, tornando a identificação de microrganismos de difícil cultivo e/ou até então não identificáveis mais fácil e segura, por meio das sondas de DNA. Em Ortodontia, esta técnica foi empregada apenas no estudo de Anhoury et al.³ (2002), para avaliar a contaminação microbiana em bráquetes metálicos e cerâmicos.

Por outro lado, para a prevenção e controle da instalação de processos patológicos na cavidade bucal, embora os métodos de higiene bucal nos pacientes portadores de aparelhos ortodônticos devam ser enfatizados^{15,19}, em crianças e jovens a destreza manual e o cuidado com a higiene bucal, na maior parte das vezes, são fatores que comprometem

o controle mecânico do biofilme. Segundo Smiech-Slomkowska, Jablonska-Zrobek²⁵ (2007), embora a escovação e o uso do fio dental sejam de fundamental importância, essas medidas não reduzem de forma relevante os níveis salivares de microrganismos em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos.

Tendo em vista que, até o momento, não há estudos avaliando a presença de microrganismos periodontopatogênicos em bráquetes, com e sem o uso de agentes antimicrobianos, empregando técnicas de biologia molecular, o objetivo do presente estudo clínico randomizado foi avaliar in vivo, por meio da técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, a contaminação de bráquetes metálicos por patógenos periodontais dos complexos vermelho e laranja, e a eficácia da utilização do gluconato de clorexidina a 0,12%, sob a forma de bochechos.

MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 2008.1.163.58.8 - Anexo 1) sendo obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis (Anexo 2). Foram selecionados 39 pacientes de 11 a 33 anos de idade, de ambos os gêneros, com dentição permanente completa, em tratamento com aparelho ortodôntico fixo na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, por um tempo máximo de 16 meses.

Após a realização de anamnese detalhada, os indivíduos deveriam apresentar boa saúde geral, e não poderiam ter feito uso de

antibióticos e/ou bochechos com soluções antimicrobianas por um período mínimo de 3 meses, previamente ao início da pesquisa.

Uma semana antes do início do experimento foi efetuada a avaliação do índice de placa²³ por um único operador, seguida de evidenciação do biofilme dental e rigorosa profilaxia com pedra-pomes e água. Em seguida, cada paciente recebeu uma escova dental Professional[®] (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, S B Campo, SP, BR), dentifrício fluoretado Colgate Máxima Proteção Anticáries[®] (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, S B Campo, SP, BR) e instruções de higiene bucal individualmente, sendo orientados a escovar os dentes 3 vezes ao dia, durante o período do experimento.

Os 39 pacientes foram aleatoriamente divididos em grupos Controle e Experimental com o auxílio do programa SAS (*Statistical Analysis System*) for Windows versão 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA), de acordo com o gênero. Posteriormente, foi efetuada nova aleatorização dentro de cada grupo, para determinar quais dentes seriam utilizados, 15 e 25 ou 35 e 45. Cada paciente selecionado recebeu novos bráquetes metálicos com *slot* 0.022" x 0.028" e prescrição Edgewise (Generus; GAC International Inc, Bohemia, NY, USA), previamente autoclavados, nos pré-molares determinados, colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Os pacientes do **Grupo Controle** (n=18) fizeram bochechos com solução placebo manipulada (Farmácia de manipulação Doce Erva, Ribeirão Preto, SP, BR) com cor, sabor e composição semelhantes ao Periogard[®] (glicerina 10%, polissorbato 0,5%, essência de menta 0,05%, sacarina 0,05%, corante azul 1 x 0,25% e água destilada QSP 1000mL). Foram efetuados 2 bochechos por semana em dias distintos, durante um mês, com 10 mL da solução, por 30 segundos. Um dos bochechos foi realizado na clínica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, sob supervisão profissional, e o outro bochecho foi realizado à noite, no domicílio, no mínimo 1 hora após a escovação dental.

Os pacientes do **Grupo Experimental** (n=21) fizeram bochechos com solução antimicrobiana à base de gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®] – Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, S B Campo, SP, BR), da mesma forma anteriormente descrita.

Ambas as soluções foram acondicionadas em frascos plásticos de 120 mL e fornecidas aos pacientes no mesmo dia da colagem dos bráquetes, na semana seguinte à profilaxia. Os pacientes não tiveram conhecimento de qual das 2 soluções estavam utilizando nos bochechos.

Decorridos 30 dias, os 2 bráquetes foram removidos de cada paciente de ambos os grupos, com alicata ortodôntico (How reto – TP Orthodontics, Inc, La Porte, IN, USA) e processados para posterior análise. Todos os procedimentos clínicos foram realizados por um único operador especialista em Ortodontia.

Processamento das amostras

Cada bráquete, com e sem uso de solução antimicrobiana, foi colocado individualmente em tubos plásticos para microcentrifuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 150 µL de solução tampão TE (pH 7,6) e 100 µL de NaOH a 0,5 M, codificados e agitados vigorosamente em aparelho Mixtron (Toptronix – São Paulo, SP, BR), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para dessorção do material. Os bráquetes foram então removidos com uma pinça clínica esterilizada e os tubos contendo a suspensão bacteriana foram estocados a -20°C, até o momento do processamento.

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

O conteúdo de cada amostra foi avaliado utilizando-se da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*²⁹ para verificar a presença das espécies bacterianas pertencentes aos complexos vermelho e laranja (Tabela 1), as quais são patógenos associados com a doença periodontal. As amostras foram aquecidas para lisar as células bacterianas e o DNA contido nas mesmas foi depositado sobre uma membrana de nylon com

carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA), com o auxílio de um dispositivo específico (*Minislot-30* - Immunetics, Cambridge, MA, USA).

Tabela 1- Cepas bacterianas utilizadas para a obtenção das sondas de DNA

Microrganismo	Cepa
Complexo laranja	
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	49256 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
Complexo vermelho	
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Haffajee et al.¹¹ (2008).

^a ATCC (American Type Culture Collection).

^b Forsyth Institute, Boston, MA.

Após a fixação do DNA sobre a membrana, esta foi colocada em outro dispositivo (*Miniblotter-45* - Immunetics), com as linhas contendo o DNA das amostras posicionadas perpendicularmente às canaletas do *Miniblotter-45*. As sondas de DNA para as 17 espécies bacterianas marcadas com digoxigenina foram depositadas nas canaletas do *Miniblotter-45* para a hibridização das sondas com o DNA das amostras. As membranas foram então lavadas em alta adstringência e as sondas de DNA foram detectadas utilizando-se o anticorpo anti-digoxigenina, conjugado à fosfatase alcalina, por meio da observação dos sinais de quimioluminescência. As duas últimas linhas horizontais da membrana

continham controles nas concentrações de 10^5 e 10^6 bactérias de cada espécie que estava sendo investigada. Os sinais produzidos foram comparados aos controles e convertidos em contagem absoluta (0 , 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7). A leitura dos resultados foi realizada duas vezes para a conferência dos resultados, por um único examinador calibrado ($Kappa > 0,8$) e cego com relação aos grupos avaliados. A sensibilidade foi ajustada para permitir a detecção de 10^4 células das espécies que estavam sendo avaliadas pelo ajuste da concentração das sondas de DNA.

A descrição detalhada do preparo das sondas de DNA a partir das cepas bacterianas e a técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, empregada para a detecção de microrganismos nos bráquetes ortodônticos metálicos, encontra-se descrita detalhadamente no Apêndice 1.

Análise Estatística

A fim de verificar se a aleatorização dos indivíduos nos grupos Controle e Experimental foi adequada, foram empregados os testes de qui-quadrado para comparação da proporção dos gêneros, teste t para comparação das médias das idades e Kruskal-Wallis para a distribuição não-paramétrica da quantidade de biofilme dental. Os resultados obtidos com a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram analisados por meio dos testes não-paramétricos de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn, utilizando os softwares SAS (*Statistical Analysis System*) for Windows versão 9.1.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) e Graphpad Prism for Windows versão 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Os 39 pacientes selecionados para o estudo participaram do mesmo até a sua conclusão. Foram analisadas 78 amostras, das quais 42 pertenciam ao grupo Experimental e 36 pertenciam ao grupo Controle.

Os resultados da análise da aleatorização dos indivíduos nos grupos Controle e Experimental evidenciaram que não houve diferença entre os 2 grupos, com relação ao gênero ($p=0,25$), à idade ($p=0,08$) e à quantidade de biofilme dental inicial ($p=0,75$).

A maioria das sondas empregadas neste estudo (70,6%) estava presente em 100% dos pacientes do grupo Controle. Dos 18 pacientes, 17 (94,4%) apresentaram-se contaminados por *C. rectus*, *T. forsythia* ou *T. socranskii*. *E. nodatum* estava presente em 16 pacientes (88,9%) e *T. denticola* foi o microrganismo menos prevalente nesse grupo, tendo sido encontrado em apenas 14 pacientes (77,8%).

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total das 17 espécies de microrganismos nos indivíduos do grupo Controle variou de 6.350.000 a 141.300.000, com mediana de 30.795.000.

As espécies bacterianas do complexo laranja apresentaram-se, inicialmente, em maiores quantidades, em relação às espécies do complexo vermelho ($p<0,0001$).

Todas as espécies do complexo laranja foram encontradas em quantidades elevadas nos indivíduos avaliados, sem diferença significativa entre elas ($p>0,05$), com exceção de *P. intermedia*, *C. gracilis* e *C. rectus*. Com relação ao complexo vermelho, as bactérias em maiores quantidades foram *T. socranskii*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* ($p<0,05$).

No grupo Experimental, das 17 sondas utilizadas, 10 (58,8%) estavam presentes em 100% dos pacientes (*C. showae*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. periodonticum*, *F. nucleatum ss polymorphum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica*, *C. gracilis*, *S. noxia*, *C. ochracea*). Dos 21 pacientes, 20 (95,2%) apresentaram-se contaminados

por *F. nucleatum ss vicentii* ou *P. gingivalis*. Os microrganismos *T. socranskii* e *T. forsythia* estavam presentes em 19 indivíduos (90,5%) e *E. nodatum* ou *C. rectus*, em 18 (85,7%). Da mesma forma que no grupo Controle, *T. denticola* também foi o microrganismo menos prevalente nesse grupo, tendo sido encontrado em apenas 15 indivíduos (71,4%).

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total das 17 espécies de microrganismos nos indivíduos do grupo Experimental variou de 4.030.000 a 56.100.000, com mediana de 15.820.000. O número total de microrganismos no grupo Experimental foi menor quando comparado ao grupo Controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,0068$).

Considerando as espécies bacterianas isoladamente, *C. rectus*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss vicentii*, *F. nucleatum ss polymorphum* e *F. periodonticum* apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando os dois grupos foram comparados ($p<0,05$), com menores quantidades de microrganismos após o bochecho com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%. As demais espécies avaliadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle ($p>0,05$).

Quando os microrganismos foram avaliados por grupos ou complexos, foi observada diferença estatisticamente significativa apenas para o complexo laranja ($p=0,03$), com contagens menores de bactérias após o bochecho com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (Gráfico 1).

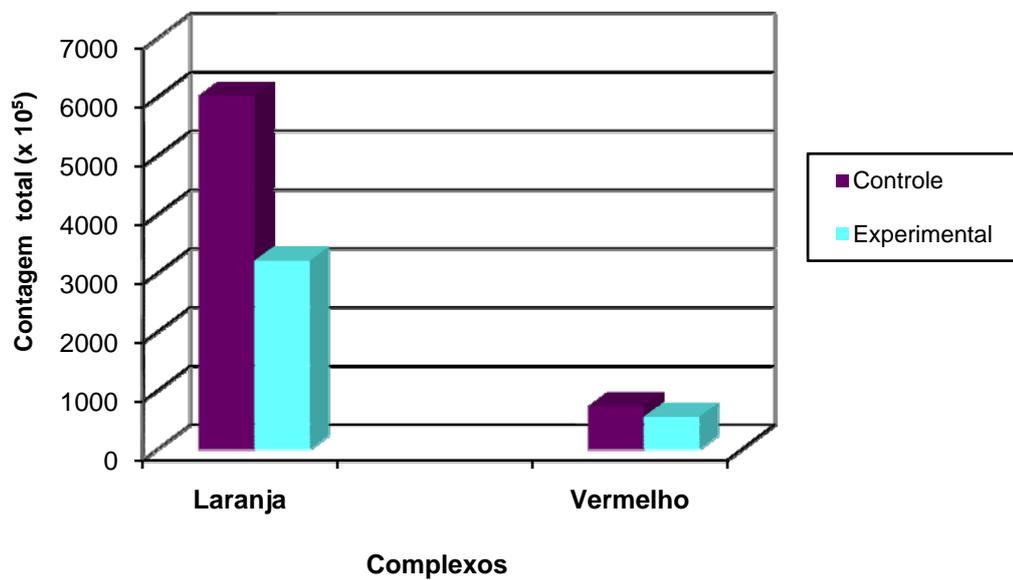


GRÁFICO 1- Comparação do número total de microrganismos entre os grupos Controle (bochechos com solução placebo) e Experimental (bochechos com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%) para os complexos microbianos vermelho e laranja.

O resultado das comparações entre os grupos Controle e Experimental para as espécies bacterianas pode ser evidenciado na Tabela 2.

Tabela 2- Distribuição do número de microrganismos entre os grupos Controle (uso de bochechos com solução placebo) e Experimental (uso de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%)

Microrganismo	Grupo Controle	Grupo Experimental	p*
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
Complexo laranja			
<i>C. gracilis</i>	1.000.000 (600.000 – 1.000.000)	600.000 (200.000 – 1.000.000)	0,1683
<i>C. rectus</i>	600.000 (200.000 – 1.000.000)	110.000 (20.000 – 600.000)	0,0263†
<i>C. showae</i>	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	1.000.000 (200.000 – 1.000.000)	0,0609
<i>C. ochracea</i>	1.000.000 (600.000 – 2.000.000)	1.000.000 (600.000 – 1.000.000)	0,1686
<i>F. nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	1.500.000 (1.100.000 – 11.000.000)	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	0,0042†
<i>F. nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	1.250.000 (1.000.000 – 1.500.000)	1.000.000 (600.000 – 1.000.000)	0,0171†
<i>F. nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	1.500.000 (1.000.000 – 1.500.000)	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	0,0105†
<i>F. periodonticum</i>	1.500.000 (1.500.000 – 11.000.000)	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	0,0011†
<i>P. intermedia</i>	1.000.000 (500.000 – 1.000.000)	600.000 (110.000 – 1.000.000)	0,0751
<i>P. melaninogenica</i>	2.000.000 (1.500.000 – 20.000.000)	2.000.000 (1.500.000 – 10.500.000)	0,4466
<i>P. nigrescens</i>	1.000.000 (1.000.000 – 1.500.000)	1.000.000 (1.000.000 – 1.000.000)	0,6752
<i>S. noxia</i>	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	0,5376
Complexo vermelho			
<i>E. nodatum</i>	20.000 (10.000 – 110.000)	20.000 (20.000 – 110.000)	0,7676
<i>P. gingivalis</i>	200.000 (110.000 – 200.000)	110.000 (20.000 – 200.000)	0,1350
<i>T. forsythia</i>	200.000 (200.000 – 1.000.000)	200.000 (100.000 – 600.000)	0,1628
<i>T. denticola</i>	100.000 (10.000 – 200.000)	100.000 (0 – 200.000)	0,8290
<i>T. socranskii</i>	600.000 (200.000 - 1.500.000)	1.000.000 (600.000 - 1.100.000)	0,7761

*: valor de p para o teste de Mann-Whitney.

†: diferença significativa ao nível de 5%.

Os valores encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi clínico randomizado, cujo tipo de amostragem tem como objetivo minimizar a incorporação de vieses, os quais poderiam atuar como fatores de confusão, interferindo nos resultados obtidos. Optou-se pela realização de um estudo clínico randomizado, pois este representa o “padrão ouro” (delineamento ideal) das pesquisas que avaliam a eficácia clínica de materiais e técnicas de tratamento¹⁰. Todos os elementos da população têm igual probabilidade de pertencer à amostra, e todas as possíveis amostras têm também igual probabilidade de ocorrer⁵.

De acordo com a análise estatística da aleatorização dos indivíduos que participaram dos grupos Controle e Experimental, observou-se que não houve diferença entre os 2 grupos, com relação ao gênero ($p=0,25$), à idade ($p=0,08$) e à quantidade de biofilme dental inicial ($p=0,75$), evidenciando a semelhança entre os grupos.

A fim de minimizar ainda mais os possíveis fatores de confusão que pudessem interferir nos resultados, após a fixação dos bráquetes, o material para higiene (escova e dentífrico padronizados) e anti-sepsia (frascos plásticos com solução placebo ou experimental) foi entregue aos indivíduos participantes do estudo, que receberam de um mesmo profissional as orientações com relação à maneira e frequência da escovação e de uso dos bochechos, de acordo com cada grupo.

Apesar desses cuidados acreditamos que, assim como em qualquer pesquisa clínica, alguns fatores inerentes à colaboração e dedicação por parte dos indivíduos que participaram do estudo possam ter apresentado alguma influência nos resultados. Como relatado por Featherstone⁹ (2006), a eficácia do uso domiciliar da clorexidina pode ter seu potencial subestimado, tendo em vista a necessidade da colaboração do paciente, para obter o resultado esperado.

A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* tem sido amplamente utilizada na determinação de associações microbianas da cavidade bucal na saúde ou em presença de doenças^{11,28,34} e para determinar o efeito de terapias antimicrobianas, principalmente na área de Periodontia^{12,18}. Dentre as vantagens da técnica pode-se citar as seguintes: permite a avaliação de várias espécies bacterianas em um grande número de amostras de uma única vez; permite a detecção de microrganismos menos comuns, não identificáveis por técnicas de cultura microbiana e apresenta alta especificidade (92%). Entretanto, apresenta algumas limitações como a sensibilidade, não sendo uma técnica tão sensível quanto o *PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)* por permitir a detecção de um número a partir de 10^4 células, além de detectar apenas espécies cujas sondas foram previamente selecionadas^{27,28}.

À semelhança do que foi efetuado por Anhoury et al.³, em 2002, o presente estudo avaliou a composição da microbiota em bráquetes metálicos, incluindo alguns microrganismos periodontopatogênicos, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. No entanto, não há trabalhos publicados, até o momento, avaliando a eficácia clínica de um agente antimicrobiano, em Ortodontia, empregando a mesma técnica, o que dificulta a realização de comparações diretas.

A complexidade da microbiota subgingival tem sido evidenciada desde 1683, com o estudo de Van Leeuwenhoek³¹. Desde aquela época, vários estudos têm avaliado a composição do biofilme utilizando técnicas de microscopia de luz e eletrônica, cultura microbiana e, mais recentemente, técnicas imunológicas ou moleculares. Levando em consideração que determinadas espécies geralmente ocorrem associadas no biofilme subgingival²⁴ e que o conhecimento das relações entre as espécies microbianas é útil no entendimento da biologia do biofilme subgingival e no planejamento de estratégias para seu controle, Socransky et al.²⁷ (1998) avaliaram as relações entre as espécies

microbianas da placa sub-gengival, utilizando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. A partir daí definiram os chamados “complexos microbianos”, ou seja, grupos de microrganismos que ocorriam em associação, relacionando-os com os parâmetros clínicos da doença periodontal, como profundidade de bolsa e sangramento à sondagem.

No entanto, como o estabelecimento da microbiota sub-gengival é dependente da colonização sucessiva da superfície dental por várias espécies microbianas²⁶, Haffajee et al.¹¹ (2008) avaliaram as relações entre as espécies microbianas da placa supragengival. De acordo com estes autores, a condição das estruturas periodontais, como a profundidade da bolsa periodontal e o nível de inserção óssea também influenciam a composição do biofilme supragengival, provavelmente por fornecer moléculas de ligação entre as espécies e por contribuir com o fornecimento de nutrientes que favorecem o desenvolvimento de algumas comunidades. Os grupos de microrganismos definidos neste último estudo foram em geral, similares àqueles encontrados na placa subgengival²⁷ e foram divididos em Complexos Vermelho, Laranja, Amarelo, Verde, Roxo e o grupo dos *Actinomyces*. Os dois primeiros complexos são compostos por espécies associadas com a doença periodontal crônica e os demais grupos são constituídos por microrganismos que não estão associados com patologias específicas.

Foram selecionadas para este estudo em bráquetes metálicos as bactérias dos complexos laranja e vermelho, encontrados no biofilme supragengival, uma vez que já foi relatado que as espécies que se encontravam em maiores números adjacente às áreas de inflamação gengival pertencem a esses complexos¹¹. De acordo com os resultados do presente estudo, os bráquetes da maioria dos pacientes do grupo Controle apresentavam todas as espécies dos patógenos periodontais avaliados, sugerindo que a presença desses microrganismos nos bráquetes também poderia estar relacionada à inflamação gengival que

ocorre durante o tratamento ortodôntico, em casos de higiene bucal mecânica inadequada.

Com a finalidade de avaliar a contaminação microbiana de bráquetes ortodônticos, verificou-se que até o momento apenas 1 estudo empregou a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Anhoury et al.³ (2002) compararam a contagem de microrganismos em 32 bráquetes metálicos e 16 cerâmicos, após períodos não relatados de permanência na cavidade bucal. De acordo com os resultados obtidos, relataram que o tipo de bráquete não influenciou na contagem para a maioria dos microrganismos periodontopatogênicos que foram avaliados, exceto para *T. denticola*, *F. nucleatum ss vicentii* e *E. nodatum*, que apresentaram-se em maior número, com diferença estatisticamente significativa, nos bráquetes metálicos. Além disso, as espécies do complexo laranja foram observadas em maiores quantidades que as espécies do complexo vermelho, o que está de acordo com os nossos resultados, após um tempo padronizado de permanência dos bráquetes na cavidade bucal de 30 dias.

Outros estudos, entretanto, verificaram a presença de patógenos periodontais durante o tratamento ortodôntico na placa supra e subgengival, por meio de outras técnicas de biologia molecular. Lee et al.¹³ (2005), avaliaram a presença de seis espécies periodontopatogênicas por meio da técnica *PCR* no biofilme subgengival de pacientes em tratamento ortodôntico com inflamação gengival e em pacientes sem aparelho. De acordo com os resultados obtidos, *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. nigrescens* foram mais comuns na placa subgengival nos pacientes que apresentavam aparelho ortodôntico. Comparando esses resultados com os obtidos no presente estudo, podemos verificar que os bráquetes de todos os pacientes apresentaram-se contaminados por *P. nigrescens* e a maioria apresentaram *T. forsythia* e *T. denticola*, podendo-se inferir que a contaminação do aparelho

poderia estar influenciando a composição do biofilme subgengival e, por consequência, a inflamação gengival.

Thornberg et al.³², em 2009, avaliaram, por meio de sondas de DNA a presença de oito patógenos periodontais, presentes em amostras de biofilme subgengival, antes, durante e após tratamento com aparelho ortodôntico fixo e relataram aumento com diferença significativa após seis meses de tratamento ortodôntico para *P. intermedia*, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *T. denticola* e *C. rectus*. De acordo com os nossos resultados, *C. rectus* e *T. denticola* foram as espécies que se apresentaram em menor número dentro dos seus respectivos complexos. As diferenças observadas podem ser explicadas pelo fato de os pacientes que fizeram parte deste estudo estarem em tratamento ortodôntico por tempos diferentes, que variaram de um a 16 meses, e pela diferença nas técnicas de detecção empregadas nos dois estudos.

Sallum et al.²¹ (2004) avaliaram, por meio da técnica de *PCR*, a presença de 5 patógenos periodontais no biofilme supra e subgengival, ao final do tratamento ortodôntico e 30 dias após a remoção do aparelho, em pacientes que apresentavam inflamação gengival. *B. forsythus*, atualmente denominada *T. forsythia*, espécie pertencente ao complexo vermelho, foi a bactéria encontrada em maior frequência que as demais espécies avaliadas, incluindo as do complexo laranja, ao final do tratamento. Os nossos resultados, em bráquetes metálicos, evidenciaram que as espécies do complexo laranja foram mais prevalentes que às do complexo vermelho após 30 dias de permanência na cavidade bucal. Essa diferença poderia ser explicada pelo fato da inflamação gengival ter sido utilizada como critério de inclusão no primeiro estudo, o que poderia ter promovido um aumento nas espécies do complexo vermelho. O fato de terem sido utilizadas amostras de biofilme ao final do tratamento, após períodos não relatados de tratamento e/ou também a maior sensibilidade da técnica de *PCR* também poderiam explicar as diferenças observadas.

Em Ortodontia, observa-se que a clorexidina vem sendo empregada para redução dos níveis de microrganismos cariogênicos na cavidade bucal, sob a forma de bochecho, por vários autores^{14,17,22}. Os resultados desses estudos, realizados com o emprego da técnica de cultura microbiana, evidenciaram a eficácia desse agente antimicrobiano, em diferentes protocolos de aplicação sob a forma de bochechos. Entretanto, a eficácia da clorexidina sobre patógenos periodontais, em Ortodontia, ainda não tinha sido verificada por meio de técnicas de biologia molecular.

Com relação ao protocolo de uso da clorexidina, sua utilização por períodos prolongados pode ocasionar efeitos colaterais, como pigmentação marrom-amarelada da estrutura dental e restaurações, alterações na sensação gustativa⁸, sabor amargo e pigmentação da língua, entre outros^{8,33}.

No presente estudo, não foram relatados efeitos colaterais significativos após uso do gluconato de clorexidina a 0,12% no grupo Experimental, por 30 dias, exceto a observação de uma ligeira pigmentação da superfície dos elementos dentais de alguns pacientes, a qual não interferiu negativamente na estética. Possivelmente, isso ocorreu em função da baixa frequência e do período de tempo relativamente reduzido de uso da clorexidina. Estudos adicionais são necessários, a fim de avaliar se o uso desse protocolo, por longos períodos, não ocasionaria efeitos colaterais adicionais.

Foram encontradas quantidades menores de microrganismos, com diferença estatisticamente significativa, na contagem total dos 17 microrganismos avaliados ($p=0,0068$), após a realização de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%, assim como para algumas espécies microbianas como o *C. rectus*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss vicentii*, *F. nucleatum ss polymorphum* e *F. periodonticum*, evidenciando que o uso da clorexidina apresenta eficácia

sobre microrganismos periodontopatogênicos em bráquetes metálicos in vivo.

Após a realização de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12% no grupo Experimental, o número de microrganismos do complexo laranja foi menor, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$). Esse fato é relevante, pois, de acordo com Sockransky et al.²⁷ (1998), alterações provocadas no complexo laranja poderiam prevenir uma colonização subsequente por microrganismos do complexo vermelho, que são patógenos periodontais mais agressivos.

A eficácia da clorexidina utilizando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi avaliada também na Periodontia, em um estudo realizado por De Soete et al.⁶ em 2001. Esses autores verificaram que após tratamento com raspagem e alisamento radicular associado à bochechos e irrigação das bolsas periodontais com clorexidina houve redução significativa para as bactérias dos complexos laranja e vermelho, em pacientes com periodontite. De acordo com os resultados do presente estudo, houve redução significativa apenas para as bactérias do complexo laranja. Este fato pode ter sido em decorrência da ausência de doença periodontal nos pacientes deste estudo, o que pode ter levado a uma menor colonização pelas bactérias pertencentes ao complexo vermelho. Além disso, no presente estudo empregou-se apenas a escovação dental associada ao uso do agente antimicrobiano, não tendo sido realizado a raspagem e alisamento radicular.

Levando em consideração a alta prevalência de patógenos periodontais na microbiota de bráquetes metálicos, e que a inflamação gengival é um problema frequentemente observado durante o tratamento ortodôntico, métodos auxiliares à higiene mecânica devem ser adotados. Dentre esses métodos, a utilização de agentes antimicrobianos, como a clorexidina, podem ser preconizados para a obtenção de um maior controle da contaminação microbiana durante o tratamento ortodôntico, visando a manutenção da saúde bucal.

CONCLUSÃO

Os bráquetes metálicos apresentaram, in vivo, quantidades elevadas de microrganismos periodontopatogênicos dos complexos vermelho e laranja. A quantidade total de microrganismos e a quantidade dos microrganismos do complexo laranja foram menores após os bochechos com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, quando comparados aos controles. Assim, com a finalidade de reduzir os níveis de microrganismos periodontopatogênicos em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos, o uso de bochechos com clorexidina pode ser útil na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;132:815-21.
2. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:736-41.
3. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod.* 2002;72:338-43.
4. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod.* 2007;77:331-6.
5. Costa Neto PLO. *Estatística.* São Paulo: Ed. Edgard Blucher; 2002.

6. De Soete M, Mongardini C, Peuwels M, Haffajee A, Socransky S, van Steenberghe D, et al. One-stage full-mouth disinfection. Long-term microbiological results analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Periodontol.* 2001;72:374-82.
7. Faltermeier A, Burgers R, Rosentritt M. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:S99-103.
8. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986 Jun;112:863-9.
9. Featherstone JD. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMC Oral Health.* 2006;6 Suppl 1:S8.
10. Fletcher R, Fletcher S, Wagner E. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais.* Porto Alegre: Artmed; 2002.
11. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:196-205.
12. L MS, Andia DC, Casati MZ, Nociti FH, Jr., Sallum EA, Gollwitzer J, et al. Microbiologic changes following administration of locally delivered doxycycline in smokers: a 15-month follow-up. *J Periodontol.* 2007;78:2143-9.
13. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, et al. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol.* 2005;43:260-5.
14. Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:705 e11-7.
15. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:882-8.

16. Magno AF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Faria G, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:S104-9.
17. Maruo IT, Rosa EA, Maruo H, Tanaka O, Guariza Filho O, Ignacio SA, et al. Effect of chlorhexidine mouth rinse on *Streptococci* counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11:136-42.
18. Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008;35:885-96.
19. Naranjo AA, Trivino ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:275 e17-22.
20. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod.* 2007;77:1090-5.
21. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Goncalves RB, Machion L, Wilson Sallum A, et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;126:363-6.
22. Sari E, Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients. *Angle Orthod.* 2007;77:881-4.
23. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand.* 1964;22:121-35.

24. Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol.* 1992;63:270-3.
25. Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Eur J Orthod.* 2007;29:157-60.
26. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002;28:12-55.
27. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-44.
28. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:352-62.
29. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994;17:788-92.
30. Steinberg D, Eyal S. Initial biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. *J Oral Rehabil.* 2004;31:1041-5.
31. Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. *J Periodontol.* 1980;51:668-9.
32. Thornberg MJ, Riolo CS, Bayirli B, Riolo ML, Van Tubergen EA, Kulbersh R. Periodontal pathogen levels in adolescents before, during, and after fixed orthodontic appliance therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135:95-8.
33. Thylstrup A, Ferjerskov O. *Cariologia clínica.* São Paulo: Editora Santos; 2001.

34. Ximenez-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.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, ao avaliar a contaminação em bráquetes metálicos in vivo, com o uso a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, pôde-se observar que:

- A maioria dos microrganismos avaliados estava presente em 100% das amostras;
- Do total dos microrganismos avaliados, os presentes em maior proporção foram os do complexo laranja (40%), seguido dos microrganismos dos complexos roxo (22%), amarelo (13%), azul (11%), verde (7%), vermelho (5%) e microrganismos cariogênicos (2%);
- Avaliando as bactérias por complexos, pôde-se observar que as bactérias periodontopatogênicas pertencentes ao complexo laranja foram evidenciadas em maiores quantidades do que as pertencentes ao complexo vermelho ($p < 0,0001$). Dentre os demais microrganismos não associados com patologias específicas, o complexo roxo apresentou-se em maiores quantidades ($p < 0,0001$), enquanto que não houve diferença para as quantidades dos microrganismos dos complexos amarelo, verde e do grupo dos *Actinomyces* ($p > 0,05$);
- Os microrganismos encontrados em maiores quantidades dentro dos seus respectivos grupos foram: *V. parvula* (complexo roxo), *A. Naeslundii II* (complexo azul), *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* e *L. buccalis* (complexo amarelo), *C. gingivalis* e *E. corrodens* (complexo verde), *T. socranskii*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* (complexo vermelho), *S. mutans* e *S. sobrinus* (bactérias cariogênicas) e todas as espécies do complexo laranja, com exceção de *P. intermedia*, *C. gracilis* e *C. rectus*.
- Observou-se quantidades menores no total de microrganismos ($p < 0,0068$) após a realização dos bochechos com gluconato de

clorexidina a 0,12%, assim como para os microrganismos do complexo laranja ($p=0,03$) e para as contagens de *C. rectus*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss vicentii*, *F. nucleatum ss polymorphum* e *F. periodonticum* ($p<0,05$).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram a necessidade da implementação de métodos de higiene bucal incluindo a utilização de agentes antimicrobianos, em função das elevadas quantidades de microrganismos encontrados nos bráquetes metálicos, para a preservação da saúde bucal do paciente. Atenção especial deve ser dada à presença dos patógenos periodontais, principais causadores da inflamação gengival durante o tratamento ortodôntico, até então não evidenciada em partes específicas de aparelhos ortodônticos.

O gluconato de clorexidina a 0,12%, utilizado sob a forma de bochechos, duas vezes por semana, pode ser útil na prática clínica, com a finalidade de reduzir os níveis de microrganismos em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos.

6 REFERÊNCIAS



6 REFERÊNCIAS*

1. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:736-41.
2. Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;132:815-21.
3. Ahn SJ, Lim BS, Lee YK, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic adhesives. *Angle Orthod.* 2006;76:869-75.
4. Ai H, Lu HF, Liang HY, Wu J, Li RL, Liu GP, et al. Influences of bracket bonding on mutans streptococcus in plaque detected by real time fluorescence-quantitative polymerase chain reaction. *Chin Med J.* 2005;118:2005-10.
5. Alves PV, Alviano WS, Bolognese AM, Nojima LI. Treatment protocol to control *Streptococcus mutans* level in an orthodontic patient with high caries risk. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:91-4.
6. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod.* 2002;72:338-43.
7. Artun J, Brobakken BO. Prevalence of carious white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *Eur J Orthod.* 1986;8:229-34.
8. Bagatin-Rossi C. Formação de biofilme e corrosão em aparelhos disjuntores de Hass, com e sem utilização de agente antimicrobiano: estudo in situ [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Brightman LJ, Terezhalmay GT, Greenwell H, Jacobs M, Enlow DH. The effects of a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse on orthodontic patients aged 11 through 17 with established gingivitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;100:324-9.
10. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod.* 2007;77:331-6.
11. Chin MY, Busscher HJ, Evans R, Noar J, Pratten J. Early biofilm formation and the effects of antimicrobial agents on orthodontic bonding materials in a parallel plate flow chamber. *Eur J Orthod.* 2006;28:1-7.
12. Consolaro A, Consolaro M. *Controvérsias na ortodontia & atlas de biologia da movimentação dentária.* Maringá: Dental Press; 2008.
13. Derks A, Frencken J, Bronkhorst E, Kuijpers-Jagtman AM, Katsaros C. Effect of chlorhexidine varnish application on mutans streptococci counts in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:435-9.
14. Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent.* 1988;60:467-70.
15. Erverdi N, Acar A, Isguden B, Kadir T. Investigation of bacteremia after orthodontic banding and debanding following chlorhexidine mouth wash application. *Angle Orthod.* 2001;71:190-4.
16. Faltermeier A, Burgers R, Rosentritt M. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:S99-103.
17. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986;112:863-9.
18. Ferjerskov O, Kidd E. *Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico.* São Paulo: Editora Santos; 2005.

19. Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:73-9.
20. Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54:27-36.
21. Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, Kavvadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19:193-200.
22. Gürel HG, Basciftci FA, Arslan U. Transient bacteremia after removal of a bonded maxillary expansion appliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135:190-3.
23. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:196-205.
24. Ioannou I, Dimitriadis N, Papadimitriou K, Sakellari D, Vouros I, Konstantinidis A. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36:132-41.
25. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, et al. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol.* 2005;43:260-5.
26. Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:705 e11-7.
27. Leung NM, Chen R, Rudney JD. Oral bacteria in plaque and invading buccal cells of young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:698 e11-8.

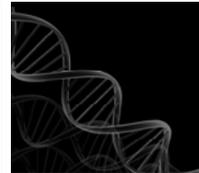
28. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:882-8.
29. Lo BA, Di Marco R, Milazzo I, Nicolosi D, Cali G, Rossetti B, et al. Microbiological and clinical periodontal effects of fixed orthodontic appliances in pediatric patients. *New Microbiol.* 2008;31:299-302.
30. Lucas VS, Omar J, Vieira A, Roberts GJ. The relationship between odontogenic bacteraemia and orthodontic treatment procedures. *Eur J Orthod.* 2002;24:293-301.
31. Madlena M, Vitalyos G, Marton S, Nagy G. Effect of chlorhexidine varnish on bacterial levels in plaque and saliva during orthodontic treatment. *J Clin Dent.* 2000;11:42-6.
32. Magno AF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Faria G, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:S104-9.
33. Marsh P. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006 (Suppl 1):S14.
34. Martins-Ortiz M, Freitas P, Nelson-Filho P, Consolaro A. Por que se preocupar com a higienização dos aparelhos? *Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2004;9:30-2.
35. Maruo IT, Rosa EA, Maruo H, Tanaka O, Guariza Filho O, Ignacio SA, et al. Effect of chlorhexidine mouth rinse on Streptococci counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11:136-42.
36. Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008;35:885-96.

37. Moraes SR, Siqueira JF, Jr., Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MC, Domingues RM. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-dNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod.* 2002;28:86-9.
38. Moshrefi A. Chlorhexidine. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr.* 2002;50:5-9.
39. Naranjo AA, Trivino ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:275 e17-22.
40. Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque Junior RF. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to evaluate the internal contamination of dental implants and comparison of bacterial leakage with cast or pre-machined abutments. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Feb 21.
41. Ogaard B, Larsson E, Henriksson T, Birkhed D, Bishara SE. Effects of combined application of antimicrobial and fluoride varnishes in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120:28-35.
42. Olympio KP, Bardal PA, de MBJR, Buzalaf MA. Effectiveness of a chlorhexidine dentifrice in orthodontic patients: a randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2006;33:421-6.
43. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod.* 2007;77:1090-5.
44. Peixoto I. Avaliação de protocolos clínicos para desinfecção de aparelhos ortodônticos removíveis (cultura microbiana e MEV) [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

45. Rosa EA, Rached RN, Tanaka O, Fronza F, Fronza F, Araujo Assad R. Preliminary investigation of bacteremia incidence after removal of the Haas palatal expander. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;127:64-6.
46. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;100:35-7.
47. Ruvierre DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child.* 2007;74:118-23.
48. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res.* 2005;40:277-85.
49. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Goncalves RB, Machion L, Wilson Sallum A, et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;126:363-6.
50. Sandham HJ, Nadeau L, Phillips HI. The effect of chlorhexidine varnish treatment on salivary *mutans streptococcal* levels in child orthodontic patients. *J Dent Res.* 1992;71:32-5.
51. Sari E, Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients. *Angle Orthod.* 2007;77:881-4.
52. Siqueira JF Jr., Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009;88:61-5.
53. Siqueira JF Jr., Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89:744-8.

54. Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Eur J Orthod.* 2007;29:157-60.
55. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994;17:788-92.
56. Steinberg D, Eyal S. Initial biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. *J Oral Rehabil.* 2004;31:1041-5.
57. Sudjalim TR, Woods MG, Manton DJ, Reynolds EC. Prevention of demineralization around orthodontic brackets in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:705 e1-9.
58. Teles RP, Bogren A, Patel M, Wennstrom JL, Socransky SS, Haffajee AD. A three-year prospective study of adult subjects with gingivitis II: microbiological parameters. *J Clin Periodontol.* 2007;34:7-17.
59. Turkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod.* 2005;75:231-6.
60. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:282-90.
61. Youravong N, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Geater AF, Dahlen G. Microbiology in toothbrush samples from children exposed to lead in southern Thailand. *Acta Odontol Scand.* 2007;65:22-8.

7 APÊNDICE



7 APÊNDICE 1

MATERIAL E MÉTODO

Segue, abaixo, a descrição detalhada do preparo das sondas de DNA e do emprego da técnica de Biologia Molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para a detecção de microrganismos nos bráquetes ortodônticos metálicos. O processamento e análise das amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Guarulhos.

Após a seleção e aleatorização dos pacientes e da realização dos procedimentos clínicos, os bráquetes foram removidos (Figura A1-A), processados (Figura A1-B a F) e analisados como descrito abaixo.

Cepas bacterianas e condições de crescimento

A relação das cepas bacterianas utilizadas para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela A1.

Tabela A1- Cepas bacterianas utilizadas para a obtenção das sondas de DNA

Microrganismo	Cepa
Bactérias cariogênicas	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356 ^a
<i>Lactobacillus casei</i>	393 ^a
<i>Streptococcus mutans</i>	25175 ^a
<i>Streptococcus sobrinus</i>	33748 ^a
Complexo azul	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a
<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	17929 ^a
Complexo roxo	
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a
Complexo amarelo	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a + b</i>	43718 ^a
<i>Leptotrichia buccalis</i>	29523 ^a
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11827 ^a
<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11828 ^a
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a
Complexo verde	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a
Complexo laranja	
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss vincentii</i>	49256 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
Complexo vermelho	
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Haffajee et al. (2008), acrescidas das bactérias cariogênicas.

^a ATCC (American Type Culture Collection).

^b Forsyth Institute, Boston, MA.

As cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia* foi cultivado em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrinado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), enquanto que a espécie *P. gingivalis* foi desenvolvida em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/ml de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivadas em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície do meio ágar-sangue, com exceção de *T. denticola* e *T. socranskii*, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente

suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C₁₂H₂₅NaO₄S, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150 µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al.* (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *Random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg, Vogelstein** (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças.

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos (Figura A2-A) e, em seguida, neutralizadas pela adição de 800 µL de acetato de amônia a 5 M (Figura A2-B). Cada suspensão contendo o DNA livre das bactérias presentes nas amostras dos bráquetes foi depositada em uma das canaletas do aparelho *Minislot-30* (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA - Figuras A2-C,D,E). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das sondas das espécies de microrganismos investigados, nas concentrações correspondentes a 10⁵ e 10⁶ células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi então removida do *Minislot-30* e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos (Figura A2-F).

* Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989;4:47-51.

**Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983;132:6-13.

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% de caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) [1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15 M de citrato de sódio (J.T. Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0], 25 mM de fosfato de sódio (Na₂HPO₄, Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma - Figura A2-G).

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter-45* (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato (Figura A2-H). Em cada canaleta do *Miniblotter-45* foi adicionada uma sonda de DNA (Figura A2-I), diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130 µL de solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 x SSC, 20 mM de Na₂HPO₄ (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% de caseína. Para a hibridização, aguardou-se um período mínimo de 20 horas, a 42°C (Figura A3-A).

Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter-45* (Immunitics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente (solução tampão SSC a 0,4 M - Figuras A3-B) composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20 mM de Na₂HPO₄, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução de bloqueio contendo 1% de ácido maléico (C₄H₄O₄, Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0 (Figura A3-C), e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche - Figura A3-D) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20

minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maléico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0 (Figura A3-E), e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl, pH 9,5, para a remoção de excessos do anticorpo.

Para a detecção dos sinais de quimioluminescência a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent* (Amersham - Figura A3-F). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete de autoradiografia, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por, aproximadamente, 40 minutos (Figura A3-G). O filme foi revelado manualmente pelo método convencional tempo-temperatura, de acordo com orientações do fabricante, empregando soluções Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas à temperatura de 20°C.

Desta forma, foi obtido um filme radiográfico com os sinais de quimioluminescência, produzidos pela fosfatase alcalina, onde as linhas horizontais representam as amostras e as verticais as sondas de DNA, propiciando um formato de “tabuleiro de xadrez” (Figura A3-H).

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador calibrado ($Kappa > 0,8$) e cego com relação aos grupos avaliados. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência dos resultados. Quando as leituras não foram coincidentes, foi realizada uma terceira leitura para aquela amostra. A intensidade de cada sinal produzido por uma determinada sonda na suspensão microbiana oriunda dos bráquetes foi comparada ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias.

A fim de facilitar a anotação dos resultados em fichas específicas, com relação aos microrganismos avaliados, foram empregados os seguintes escores:

- Escore 0: registrado quando não houve detecção de sinal de quimioluminescência;
- Escore 1: quando observou-se um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células;
- Escore 2: sinal equivalente a 10^5 células;
- Escore 3: sinal entre 10^5 e 10^6 células;
- Escore 4: sinal equivalente a 10^6 células; e
- Escore 5 : sinal equivalente a mais de 10^6 células.

A análise estatística foi efetuada convertendo-se os escores em valores numéricos originais (Tabela A2). Tendo em vista que foram removidos 2 bráquetes de cada paciente, foi utilizada a soma dos 2 valores obtidos. Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras.

Tabela A2- Conversão dos escores em valores numéricos originais, para cada microrganismo avaliado nas suspensões microbianas oriundas de bráquetes metálicos, in vivo, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Escore	Nível de detecção do microrganismo	Número de microrganismos
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000 (1×10^4)
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000 (1×10^5)
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000 (5×10^5)
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000 (1×10^6)
5	Mais de 10^6 células	10.000.000 (1×10^7)

FIGURA A1- Procedimentos clínicos e processamento das amostras.

A - Remoção do bráquete.

B - Transferência do bráquete removido para o tubo Eppendorf, contendo 150 μ L de solução tampão TE e 100 μ L de NaOH a 0,5 M.

C - Agitação em aparelho Mixtron (Toptronix), durante 30 segundos, para dessorção do material.

D - Remoção do bráquete com pinça clínica esterilizada.

E, F- Estocagem dos tubos Eppendorf contendo as amostras, a -20°C .

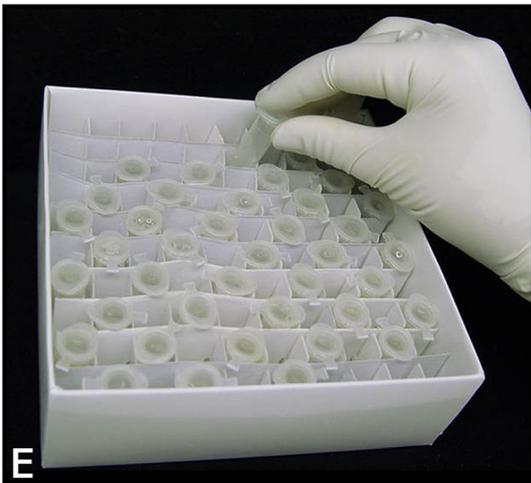
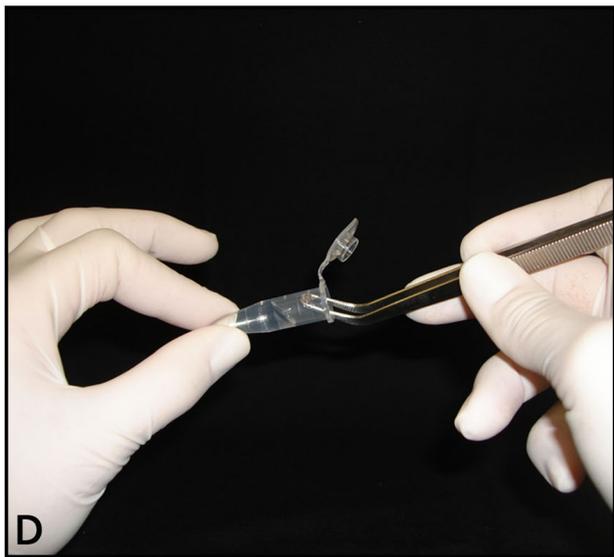


FIGURA A2- Resumo das etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

- A - Fervura das amostras em banho-maria por 10 minutos.
- B - Neutralização das suspensões das amostras pela adição de 800 μ L de acetato de amônia a 5 M.
- C - *Minislot-30*.
- D - Introdução da membrana de nylon (15 x 15 cm) e papéis de filtro no interior do *Minislot-30*.
- E - Deposição das amostras oriundas dos bráquetes nas canaletas do *Minislot-30*.
- F - Exposição da membrana à 120°C por 20 minutos, para fixação do DNA.
- G - Pré-Hibridização da membrana a 42°C por 1 hora.
- H - Introdução da membrana no *Miniblotter-45* evidenciando as canaletas perpendiculares às linhas com o DNA das amostras.
- I - Preenchimento das canaletas do *Miniblotter-45* com as sondas de DNA marcadas com digoxigenina.

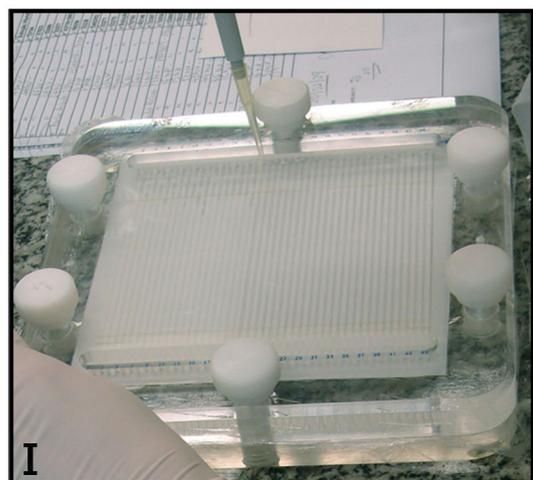
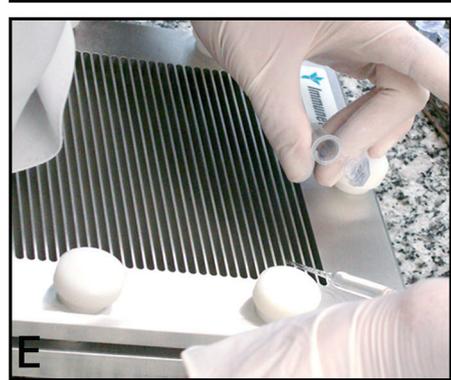
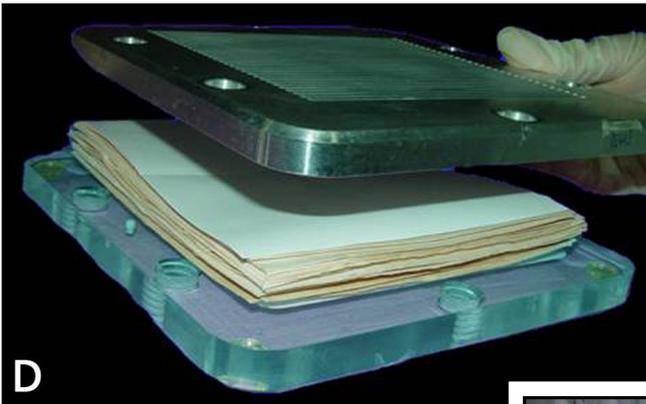
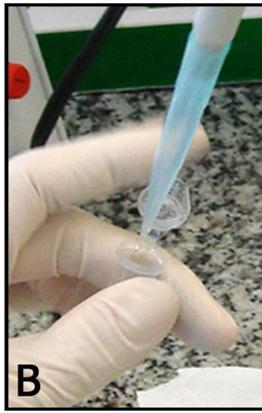
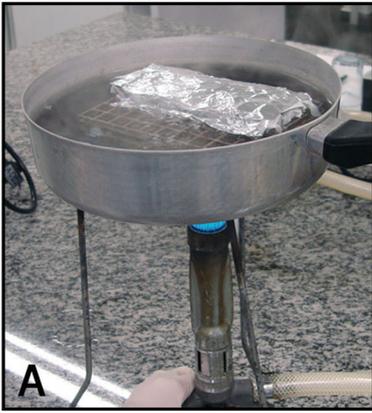
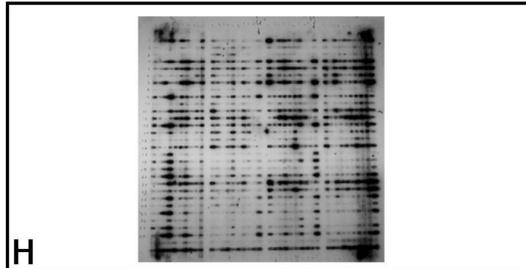
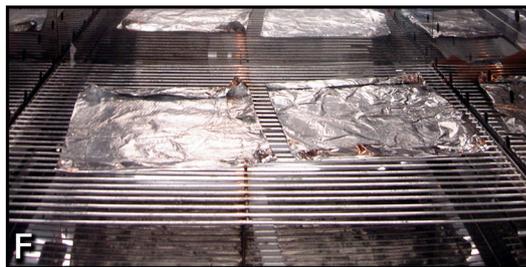
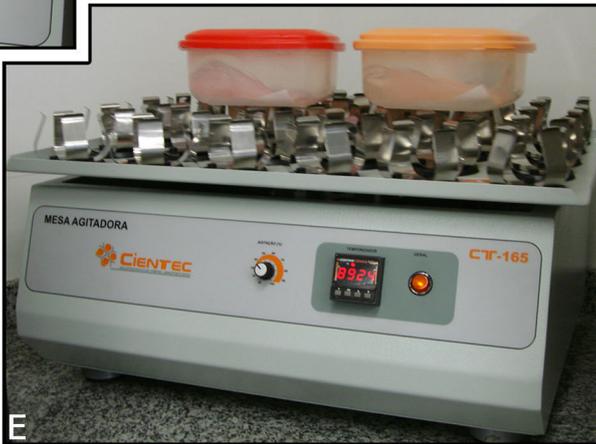
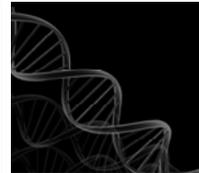


FIGURA A3- Resumo das etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* (continuação).

- A - Hibridização em *buffer* de Formamida a 42°C por 20 horas.
- B- Lavagem de alta adstringência em solução tampão SSC 0,4 M a 65°C por 40 minutos, para a remoção das sondas que não hibridizaram completamente.
- C - Imersão por 1 hora em solução de bloqueio.
- D - Acréscimo do anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina.
- E - Lavagem da membrana em solução específica para remoção de excessos do anticorpo.
- F - Incubação da membrana a 37°C, por 45 minutos, em solução *CDP-Star™ Detection Reagent*, contendo substrato para fosfatase alcalina.
- G - Cassete de autoradiografia contendo o filme radiográfico.
- H - Filme radiográfico com os sinais de quimioluminescência.



8 ANEXOS



8 ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/028/FORP

Senhor Professor,

Ref.: Processo nº 2008.1.163.58.8
CAAE nº 0013.0.138.000-08

A pedido da Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 86ª Sessão, realizada no dia 13 de março de 2008, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado: **"Avaliação da contaminação microbiana de aparelhos ortodônticos, com e sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization e quantificação de Endotoxina (LPS) por meio do teste Limulus Amebo cyte Lysate"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** no dia **30 de março de 2009** e o **Relatório Final** no dia **30 de março de 2010**.

Atenciosamente,


Glauce Della Rosa

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. PAULO NELSON FILHO
Professor Titular do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social – FORP/USP

GDR/gdr

8 ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,, CPF....., responsável pelo paciente, fui convidado a participar da pesquisa: “*Avaliação da contaminação microbiana de aparelhos ortodônticos, com e sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization e quantificação de Endotoxina (LPS) por meio do teste Limulus Amebocyte Lysate*” conduzida pelos pós-graduandos Marcela C. D. Andruçoli Soato (FOAr-UNESP), Marcela Perdiza (FORP-USP) e Remberto Marcelo A. Valdez (FORP-USP) – Áreas de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Nelson Filho.

O propósito do estudo clínico será avaliar a contaminação de aparelhos ortodônticos por meio de técnicas laboratoriais (Biologia Molecular) e também a quantificação de produtos tóxicos (Endotoxina) produzidos por bactérias presentes nestes aparelhos, com e sem a utilização de solução antimicrobiana.

Estou ciente de que esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o sigilo. Declaro que fui devidamente esclarecido(a), de forma oral e escrita que:

- 1) O estudo tem por objetivo avaliar a contaminação microbiana e quantificação de Endotoxina em aparelhos ortodônticos para o estabelecimento de métodos adequados de prevenção contra a doença cárie e inflamação gengival que podem ocorrer durante o tratamento ortodôntico;
- 2) Serão utilizados para o estudo aparelhos removíveis, brackets e outros acessórios ortodônticos que serão removidos oportunamente e repostos imediatamente, quando necessário, para a continuidade do tratamento, sem danos ao paciente;
- 3) A pesquisa não irá ocasionar nenhum prejuízo físico ou moral, e não causará desconforto ou risco previsível;
- 4) Foi-me assegurado sigilo de privacidade.
- 5) Tenho plena liberdade de recusar a minha participação ou de meu dependente nesta pesquisa, assim como tenho liberdade de retirar-me/retirá-lo a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo do atendimento;
- 6) Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência, caso ocorra algum problema relacionado à execução da parte clínica do projeto e a prestar esclarecimentos em qualquer momento da realização da pesquisa (Marcela C. D. A. Soato – telefone 16-3953-6527, Marcela Perdiza telefone 16-3602-4099, - Remberto M. A. Valdez – telefone 16-3602-4099, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho – Av. do Café s/N - Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, FORP-USP, Telefones: 3602 4099, 3602-3995.
- 7) Não é previsto o pagamento de despesas ou indenizações, já que os procedimentos já descritos não são agressivos à saúde física ou moral.

Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsáveis o Prof. Dr. Paulo Nelson Filho. Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho CPF 156200398-46

Paciente ou Responsável

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 23 de junho de 2009

MARCELA CRISTINA DAMIÃO ANDRUCIOLI SOATO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)