

REMBERTO MARCELO ARGANDOÑA VALDEZ

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PERIODONTOPATOGÊNICOS
GRAM-NEGATIVOS E QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINA EM
BRÁQUETES METÁLICOS, COM OU SEM UTILIZAÇÃO DE
AGENTE ANTIMICROBIANO – ESTUDO *IN VIVO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Grau de Mestre em Odontopediatria.

Orientador: PROF. DR. PAULO NELSON-FILHO

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Valdez, Remberto Marcelo Argandoña

Detecção de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos e quantificação de endotoxina em bráquetes metálicos, com ou sem utilização de agente antimicrobiano – Estudo *in vivo*.
Ribeirão Preto, 2009.

70p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa: Odontopediatria.
Orientador: Nelson-Filho, Paulo

1. *Checkerboard DNA-DNA Hybridization.*
2. *Limulus Amebocyte Lysate.*
3. Clorexidina.
4. Bráquetes ortodônticos.
5. Microrganismos periodontopatogênicos.
6. Endotoxina bacteriana.

REMBERTO MARCELO ARGANDOÑA VALDEZ

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PERIODONTOPATOGÊNICOS GRAM-
NEGATIVOS E QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINA EM BRÁQUETES
METÁLICOS, COM OU SEM UTILIZAÇÃO DE AGENTE
ANTIMICROBIANO – ESTUDO *IN VIVO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Grau de Mestre em Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

Remberto Marcelo Argandoña Valdez

Nascimento: 2/4/76 – La Paz – Bolívia

Filiação: Remberto Argandoña Sangüeza
Angela Valdez de Argandoña

1996/2001: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia – Universidad Mayor de San Andrés
La Paz – Bolívia

2002: Extensão Universitária em Santiago de Callapa, La Paz - Bolívia

2003: Cirurgião-Dentista da ONG, Misión Alianza de Noruega

2004/2006: Cirurgião-Dentista da UMOPAR - Policía Nacional da Bolívia

2007/2009: Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

DEDICO ESTE TRABALHO,

Aos meus pais ANGELA e REMBERTO e aos meus irmãos PABLO, CECILIA e CRISTIAN.

"Ahora mismo siento su orgullo y mi felicidad y espero que esta dicha, de alguna manera logre reunirnos una vez mas."

AGRADECIMENTOS

Este trabalho tornou-se o que é hoje devido a duas pessoas muito especiais. Neste momento, quero expressar minha gratidão por tudo o que fizeram:

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, meu orientador,

Além de ser o melhor professor que eu já tive, mostrou-me que nada é impossível. Obrigado pela sua bondade, seu exemplo, amabilidade, paciência e pelas muitas horas que dedicou a me ensinar. Sou grato para sempre, por tudo o que fez.

À Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Presidente da Comissão de Pós- Graduação da FORP/USP,

Obrigado pela sabedoria e bom coração, que tornaram esta experiência maravilhosa para mim.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon e Vice-Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

Torna-se impossível citar os nomes de todas as pessoas importantes para mim, durante minha permanência no Brasil, para realizar o Curso de Pós-Graduação. No entanto, algumas pessoas foram marcantes, contribuindo com minha formação profissional e pessoal, como os Professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, incluindo a Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Profa. Dra.

Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra Maria Cristina Borsatto, Prof. Dr. Mario Roberto Leonardo, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Profa Dra. Sada Assed, Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Adilson Thomazinho e Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira.

Não poderia deixar de agradecer aos funcionários administrativos, que sempre me auxiliaram com boa vontade e eficiência: Isabel Cristina Galino Sola, Regiane Cristina Moi Sacilotto, Filomena Lelli Placciti, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Marco Antonio dos Santos, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, José Aparecido N. do Nascimento e Vera Ribeiro do Nascimento. Especialmente ao Marco e à Fátima, pela ajuda nas horas certas que sempre facilitaram meus dias longe de casa.

Ao pessoal do "Centro de Formação de Recursos Humanos Especializados no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais", pelo imenso aprendizado.

À Maraísa Palhão Verri, Técnica do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pela ajuda e amizade.

Meu profundo agradecimento aos meus primos Eliana e Jairo. Sempre os recordarei com carinho.

Sinceros agradecimentos à Rosana Siqueira de Carreño, Diretora do Centro de Estudos Brasileiros na Bolívia.

Aos pós-graduandos Ana Paula Ramos Bernardes da Silva, Cristina Bueno Brandão, Edécio Garcia Junior, Giselle de Angelo Souza Leite, Lourdes Y. G. Olmedo, Marcela Perdiza, Marta Maria Martins Giamatei Contente, Olívia Santos de Oliveira Verardo, Rodrigo Machado da Silva, Rosângela Morais Marques Sawan, Taiana de Melo Dias e Vanessa Bernardini Maldonado. Considero um privilégio ter compartilhado o Curso de Pós-Graduação com todos vocês. Minha infinita gratidão à Olívia e à Marcela. Elas sabem por que eu lhes devo muito.

À Pós-Graduanda Marcela C. D. Andrucioli Soato, que com competência e gentileza ajudou-me em todas as etapas da execução da parte experimental desse trabalho.

Às Pós-Graduandas Marcela Perdiza e Patrícia Alves Ferreira Amato, pelo auxílio constante.

À Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da FORP/USP, pela valiosa cooperação na análise estatística dos resultados.

Às Profas. Dras. Magda Gomes Feres e Luciene Cristina de Figueredo, do Laboratório de Pesquisa em Odontologia II, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos, e à Técnica de Laboratório Izilvânia Barreto, pela contribuição no processamento e análise das amostras de DNA.

À Profa. Dra. Lucia Helena Faccioli e ao Dr. Carlos Arterio Sorgi, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pela cordialidade e imensa cooperação nos procedimentos laboratoriais para quantificação da endotoxina bacteriana.

Ao campus da USP de Ribeirão Preto pela acolhida, em todas as suas dependências.

À Embaixada do Brasil na Bolívia

Ao CNPq, pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro ao Projeto (Edital Universal).

O meu muito obrigado a todos vocês!

RESUMO

Valdez, RMA. Detecção de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos e quantificação de endotoxina em bráquetes metálicos, com ou sem utilização de agente antimicrobiano – Estudo *in vivo*. [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2009.

Empregando a técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e o teste *Limulus Amebocyte Lysate*, os objetivos do presente estudo clínico randomizado *in vivo* foram avaliar, em bráquetes ortodônticos metálicos: 1) A presença de 16 espécies de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos pertencentes aos complexos laranja e vermelho, por meio de sondas de DNA; 2) A quantidade de endotoxina bacteriana presente; e 3) A eficácia da utilização do gluconato de clorexidina a 0,12%, sob a forma de bochechos, na redução da contaminação pelas 16 espécies de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos e na redução da quantidade de endotoxina bacteriana. Participaram do estudo 33 pacientes de 11 a 33 anos de idade, em tratamento com aparelho ortodôntico fixo, nos quais foram colocados randomicamente 3 bráquetes metálicos novos nos pré-molares. Os pacientes do *Grupo Controle* (n=17) fizeram 2 bochechos semanais com solução placebo, durante 30 dias. Os pacientes do *Grupo Experimental* (n=16) fizeram bochechos com solução à base de gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®]), da mesma forma que o grupo Controle. Decorridos 30 dias, os 3 bráquetes foram removidos de cada paciente e processados para a detecção dos microrganismos, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, e para a quantificação da endotoxina bacteriana por meio do teste *Limulus Amebocyte Lysate*. Os resultados obtidos foram analisados por meio dos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e pós-teste de Dunn, utilizando os softwares *SAS* e *Graphpad Prism*. O nível de significância adotado foi de 5%. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que todos os bráquetes dos pacientes do Grupo Controle encontravam-se densamente contaminados pelos microrganismos avaliados. Nesse grupo, as espécies bacterianas do complexo laranja apresentaram-se em maiores quantidades, em relação às espécies do complexo vermelho ($p < 0,01$). A mediana da quantidade de endotoxina para este grupo foi de 0,6673 EU/ml. Quando comparado ao grupo Controle, observou-se que o número total de microrganismos no grupo Experimental foi estatisticamente menor, com mediana de 29.150.000 no grupo Controle e de 13.130.000 no grupo Experimental ($p = 0,01$). Quando os microrganismos foram avaliados por complexos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Experimental para o complexo laranja ($p = 0,04$), com contagens menores de bactérias após os bochechos com clorexidina. Por outro lado, observou-se que a quantidade de endotoxina no grupo Experimental foi maior, com mediana de 1,2199 EU/ml ($p = 0,02$). Concluiu-se que os bochechos com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% podem ser úteis, na prática clínica, com a finalidade de reduzir os níveis de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos, em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos. No entanto, em função do aumento da quantidade de endotoxina bacteriana após o uso dos bochechos com clorexidina, estudos adicionais são necessários com a finalidade de desenvolver procedimentos clínicos ou agentes antimicrobianos que tenham ação sobre a endotoxina presente nos bráquetes metálicos.

ABSTRACT

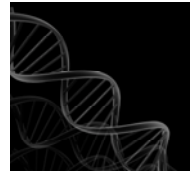
Valdez, RMA. Detection of Gram-negative periodontopathogenic microorganisms and quantification of endotoxin in orthodontic metallic brackets, with or without use of an antimicrobial agent – An *in vivo* study. [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2009.

Using the biomolecular technique Checkerboard DNA-DNA Hybridization and the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay, the purposes of the present randomized clinical study were to evaluate in orthodontic metallic brackets: 1) The presence of 16 Gram-negative periodontopathogenic microbial species of the orange and red complexes by using DNA probes; 2) The amount of bacterial endotoxin; and 3) The efficacy of 0.12% chlorhexidine gluconate mouthwashes in reducing the contamination by the evaluated microbial species and the amount of bacterial endotoxin. Thirty-three 11-33-year-old patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances were enrolled in the study and all subjects had 3 new metallic brackets bonded to different premolars in a randomized manner. The patients in the Control group (n=17) were instructed to use a placebo mouthwash twice a week, while those in the Experimental group (n=16) were instructed to use a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthwash (Periogard®) in the same way. After 30 days, the 3 brackets were removed from each patient and processed for detection of the microorganisms by the Checkerboard DNA-DNA hybridization technique, and for quantification of bacterial endotoxin by the LAL assay. The data were analyzed statistically by the non-parametric Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Dunn's post tests using SAS and GraphPad Prism softwares. A significance level of 5% was set for all analyses. The brackets of the patients in the Control group were densely contaminated by the evaluated microbial species. In this group, the number of bacterial species of the orange complex was larger compared to the number of bacterial species of the red complex ($p < 0.01$). The median of the amount of bacterial endotoxin for this group was 0.6673 EU/ml. The Experimental group had a significantly smaller number of microorganisms than the Control group (median 13,130,000 *versus* 29,150,000; $p = 0.01$). When the microorganisms were analyzed by complex, there was statistically significant difference between the Control and Experimental groups for the orange complex ($p = 0.04$) with smaller counts of bacteria after use of chlorhexidine oral rinses. On the other hand, there was a greater amount of bacterial endotoxin in the Experimental (median of 1,2199 EU/ml; $p = 0.02$). In conclusion, 0.12% chlorhexidine oral rinse can be useful in the clinical practice to reduce the levels of Gram-negative periodontopathogenic microorganisms in patients with fixed orthodontic appliances. Considering the increase in the amount of bacterial endotoxin after use of chlorhexidine oral rinses, further research is necessary to develop clinical procedures or antimicrobial agents with action against the endotoxin in the metallic brackets.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 PROPOSIÇÃO.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4 RESULTADOS.....	32
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO.....	69

1 INTRODUÇÃO



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 (Fejerskov e Kidd, 2005). No entanto, quando ocorrem modificações nesse ambiente, a microbiota também sofre alterações, resultando em desequilíbrio e possibilidade do desenvolvimento de doenças (Marsh, 2006).

O tratamento ortodôntico por meio do uso de aparelhos fixos ocasiona alterações específicas no meio bucal (Anhoury et al., 2002; Lee e al., 2005; Brusca et al., 2007), pois os aparelhos ortodônticos são compostos por uma variedade de materiais sólidos e elásticos (Steinberg e Eyal, 2004), com superfícies irregulares incluindo bráquetes,acrílico, bandas, fios e outros acessórios, as quais funcionam como áreas de retenção de biofilme bacteriano (Leung et al., 2006; Lessa et al., 2007; Ahn et al., 2007; Magno et al., 2008). Além disso, dificultam a higienização (Olympio et al., 2006; Faltermeier et al., 2008) e limitam a ocorrência da auto-limpeza mecânica ocasionada pela saliva e pela movimentação da musculatura (Rosenbloom e Tinanoff, 1991).

O maior acúmulo de microrganismos e a elevação dos seus níveis salivares, após instalação de aparelhos ortodônticos, implicam no aumento do risco a doenças, como a cárie dental e a doença periodontal (Ärtun e Brobakken, 1986; Anhoury et al., 2002; Naranjo et al., 2006; Sudjalim et al., 2007; Consolaro e Consolaro, 2008; Lo et al., 2008).

Em Ortodontia, a contaminação microbiana da superfície de componentes específicos de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis tem sido avaliada empregando, na maioria das vezes, técnicas de cultura microbiana (Brêtas et al., 2005; Papaioannou et al., 2007; Lessa et al., 2007; Brusca et al.,

2008; Magno et al. 2008; Maruo et al., 2008). Além disso, os estudos têm enfocado, particularmente, os microrganismos cariogênicos (Steinberg e Eyal, 2004; Brêtas et al., 2005; Ahn et al., 2007; Lessa et al., 2007; Lim et al., 2008; Magno et al., 2008; Faltermeier et al., 2008).

No entanto, alguns autores têm relatado que o uso de aparelhos ortodônticos promove, também, o aumento de patógenos periodontais no biofilme supra (Sallum et al., 2004) e subgengival (Sallum et al., 2004; Lee et al., 2005; Thornberg et al., 2009), os quais estão diretamente relacionados com a inflamação gengival que observada durante o tratamento ortodôntico (Sallum et al., 2004, Lee et al., 2005).

Há possibilidade, também, da ocorrência de alterações inflamatórias na mucosa, particularmente do palato (Martins-Ortiz et al., 2004) e invasão de células da mucosa por microrganismos (Leung et al., 2006). Muitas vezes, mesmo os pacientes com higiene bucal mecânica satisfatória apresentam desenvolvimento de gengivite moderada, principalmente nos primeiros meses após a colocação do aparelho (Zachrisson e Zachrisson, 1972).

Essa microbiota supra e subgengival periodontopatogênica é composta predominantemente por microrganismos anaeróbios (Huser et al., 1990; Albandar e Rams, 2000; Jenkins e Papapanou, 2000), com níveis elevados de bactérias fusiformes e espiroquetas (Atack et al., 1996), semelhante à de pacientes sem aparelho ortodôntico portadores de alterações gengivais (Syed e Loesche, 1978).

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 encontra-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, preconizada por Socransky, em 1994, e empregada em Odontologia nas áreas de Periodontia (Matarazzo et al., 2008; Teles et al., 2008; Ioannou et al., 2009; Adriaens et al., 2009), Endodontia (Vianna et al., 2008; Siqueira e Rôças, 2009), Implantodontia (Máximo et al., 2009; Nascimento et al., 2009), Odontopediatria (Ruvierre et al., 2007; Youravong et

al., 2007; Gizani et al., 2009) e Cariologia (Filoche et al., 2008; Papaioannou et al., 2009), entre outras.

Empregando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, Haffajee et al. (2008) dividiram os microrganismos encontrados na placa supragengival nos chamados "complexos microbianos" vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo, e grupo dos *Actinomyces*. De acordo com esses autores, os microrganismos pertencentes aos complexos vermelho e laranja estão altamente associados com a doença periodontal.

Em Ortodontia, a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi empregada até o momento em apenas um estudo piloto efetuado por Anhoury et al. (2002), para avaliar a contaminação por diferente microrganismos, incluindo alguns periodontopatogênicos, em bráquetes metálicos e cerâmicos, após períodos não padronizados de manutenção na cavidade bucal.

Outro aspecto também relevante é que os microrganismos Gram-negativos, além de gerarem produtos e subprodutos tóxicos aos tecidos, contêm a endotoxina em sua parede celular. Esse conhecimento é particularmente importante, uma vez que a endotoxina, também conhecida como LPS em função de sua natureza lipopolissacarídica, é liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana, exercendo uma série de efeitos biológicos importantes (Rietschel e Brade, 1992; Leonardo et al., 2004) que conduzem à ocorrência de reação inflamatória e reabsorção óssea (Daly et al., 1980; Ishihara et al., 1991; Rietschel e Brade, 1992; Antal-Szalmás et al., 1997; Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Jiang et al., 2003; Mochizuki et al., 2004; Ren et al., 2005; Doucet e Lowestein, 2006; Rogers et al., 2007; Silva et al., 2008; Sosroseno et al., 2009).

Sabe-se que a doença periodontal, em humanos, é caracterizada pela destruição das estruturas de suporte do elemento dental (McDevitt et al., 2000), iniciada pela interação de microrganismos periodontopatogênicos com as células do hospedeiro (Sheikhi et al., 2000). A endotoxina bacteriana constitui um dos maiores fatores de virulência da superfície de microrganismos Gram-negativos, atuando como um potente estímulo para uma grande variedade de

células do hospedeiro via receptores, como a proteína ligante da endotoxina (LBP), CD14 e "toll-like receptors" (TLRs) 2 e 4 (Ren et al., 2005), o que resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias e amplificação da resposta imune do hospedeiro (Antal-Szalmás et al., 1997).

A endotoxina bacteriana pode ultrapassar o epitélio sulcular (Rizzo, 1968; Schwartz et al., 1972) e contribuir com a instalação de resposta inflamatória. Clinicamente, a perda de adesão periodontal e recessão gengival podem estar associadas com elevações nas concentrações de endotoxina no fluido crevicular (Maidwell-Smith et al., 1987).

A endotoxina induz a produção de óxido nítrico (Sosroseno et al., 2009), ativa o sistema complemento (Morrison e Kline, 1977) e, no interior dos tecidos periodontais e fluido gengival crevicular, ativa monócitos, macrófagos e fibroblastos a produzirem citocinas pró-inflamatórias clássicas, como a IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6 (Lee et al., 1995; Tsai et al., 1995; Leng e Elias, 1997), induzindo inflamação. Essas citocinas estimulam as metaloproteinases da matriz como as colagenases, que destroem os tecidos devido à degradação dos componentes da matriz extracelular. Além disso, a IL-1 e o TNF-alfa induzem a reabsorção óssea, indiretamente, estimulando a IL-6 ou indiretamente estimulando efetores associados com a osteoclastogênese, como o receptor ativador do fator ligante nuclear – kappa B (RANKL). A endotoxina por si só pode conduzir ao aumento da expressão osteoblástica de prostaglandina E2, RANKL, IL-1 e TNF-alfa (Roux e Orcel, 2000) e inibir diretamente a osteogênese (Loomer et al., 1995). Distúrbios na homeostasia do metabolismo do colágeno no interior do tecido gengival podem também ser ocasionados pela endotoxina (Takahashi et al., 2008).

O rompimento vascular e sangramento que ocorrem em pacientes com periodontite elevam os níveis de hemoglobina no fluido crevicular gengival. Essa hemoglobina e a endotoxina oriunda de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos atuam sinergicamente, amplificando a resposta inflamatória (Bodet et al., 2007).

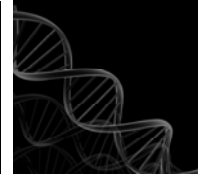
Do ponto de vista ortodôntico, em 1999 Knoernschild et al. avaliaram a afinidade da endotoxina bacteriana de *P. gingivalis* e de *E. coli* a bráquetes metálicos, *in vitro*, por meio de espectrometria. De acordo com os resultados obtidos, observaram que a endotoxina de ambos os microrganismos se aderiram aos bráquetes, evidenciando que, *in vivo*, essa afinidade poderia afetar a concentração de endotoxina no sulco gengival, contribuindo para a inflamação dos tecidos adjacentes.

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 (Naranjo et al., 2006; Lim et al., 2008), em crianças, jovens e idosos 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., 1988). Adicionalmente, segundo Diedrich (1989), a escovação é ineficaz na remoção de microrganismos das áreas retentivas dos aparelhos.

Em função disso, vários autores têm preconizado diferentes protocolos de uso de agentes antimicrobianos, particularmente a clorexidina, principalmente sob a forma de bochechos, sprays ou vernizes, como coadjuvantes no controle do biofilme dental e do biofilme dos aparelhos ortodônticos (Fardal e Turnbull, 1986; Brightman et al., 1991; Peixoto, 2007; Sari e Birinci, 2007; Lessa et al., 2007; Bagatin-Rossi, 2007; Maruo et al., 2008; Alves et al., 2008; Derks et al., 2008). 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 (Mosrefi, 2002).

Pelo exposto, justifica-se a necessidade de estudos sobre a detecção de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos por meio de técnicas de biologia molecular e quantificação de endotoxina, em bráquetes ortodônticos, com o objetivo de desenvolver terapêuticas clínicas para o seu controle e/ou eliminação.

2 PROPOSIÇÃO

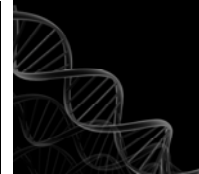


PROPOSIÇÃO

Empregando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e o teste *Limulus Amebocyte Lysate*, o objetivo desse estudo clínico randomizado *in vivo* foi avaliar, em bráquetes ortodônticos metálicos:

- A presença de 16 espécies de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos pertencentes aos complexos laranja e vermelho, por meio de sondas de DNA.
- A quantidade de endotoxina bacteriana presente.
- A eficácia da utilização do gluconato de clorexidina a 0,12%, sob a forma de bochechos, na redução da contaminação pelos microrganismos avaliados e na redução da quantidade de endotoxina bacteriana.

3 MATERIAL E MÉTODO



MATERIAL E MÉTODO

Seleção da amostra

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP (processo nº 2008.1.163.58.8 – Anexo 1), foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes (ou responsáveis) que fizeram parte da pesquisa. Foram selecionados 33 pacientes de 11 a 33 anos de idade, de ambos os gêneros, com dentição permanente completa, em tratamento com aparelho ortodôntico fixo no Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da FORP/USP, por um tempo máximo de 16 meses.

Esses indivíduos 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. Além disso, deveriam ter boa saúde geral, verificada por meio de anamnese detalhada, não devendo apresentar, no momento da realização da pesquisa, alterações sistêmicas significativas que pudessem interferir na realização do estudo.

Instalação dos aparelhos e divisão dos grupos (randomização)

Uma semana antes do início do experimento foi efetuada a avaliação do índice de placa (biofilme dental), como preconizado por Silness e Loe (1964), por um único operador, seguida de rigorosa profilaxia com pedrapomes e água após evidenciação do biofilme dental com solução de fucsina básica (Replak, Dentsply, Catanduva, SP, Brasil). Em seguida, cada paciente recebeu uma escova dental Professional[®] (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) e dentifrício fluoretado Colgate Máxima Proteção

Anticáries[®] (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) e instruções de higiene bucal individualmente, sendo orientados a escovar os dentes 3 vezes ao dia, durante o período do experimento.

Os 33 pacientes selecionados foram aleatoriamente divididos em dois 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 (14, 15, 24, 25, 34, 35, 44 ou 45). Cada paciente recebeu três novos bráquetes metálicos com *slot* 0.022" x 0.028" e prescrição Edgewise (Generus; GAC International Inc, Bohemia, NY), previamente autoclavados, nos 3 pré-molares previamente determinados e fixados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, Ca, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Os pacientes do **Grupo Controle** (n=17) foram orientados a fazer bochechos com solução placebo manipulada (Farmácia de manipulação Doce Erva, Ribeirão Preto, SP, Brasil) 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 1000 ml), porém sem adição de clorexidina em sua composição. Foram efetuados 2 bochechos por semana com 10 ml da solução, por 30 segundos, durante 30 dias. Em cada semana, um dos bochechos foi realizado na clínica da FORP/USP, sob supervisão profissional, enquanto que o outro bochecho foi realizado à noite, no domicílio do paciente, no mínimo 1 hora após a escovação dental, como sugerido por Bagatin-Rossi (2007).

Os pacientes do **Grupo Experimental** (n=16) foram orientados a fazer bochechos com solução antimicrobiana à base de gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®] – Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil), da mesma forma anteriormente descrita para o grupo Controle.

As soluções empregadas para a realização dos bochechos nos grupos Controle e Experimental foram acondicionadas em frascos de plástico de

120 ml e fornecidas aos pacientes no mesmo dia da colocação dos bráquetes, na semana seguinte à profilaxia. Os pacientes não tiveram conhecimento de qual das duas soluções (placebo ou antimicrobiana) estavam utilizando nos bochechos diários.

Todos os procedimentos clínicos foram realizados por um único operador (cirurgião-dentista).

Processamento das amostras dos bráquetes

Decorridos 30 dias, os três bráquetes foram removidos de cada paciente, de ambos os grupos, com alicate ortodôntico (How reto – TP Orthodontics, Inc, La Porte, IN, USA).

Após a remoção, **um** dos bráquetes foi colocado em tubo plástico para microcentrífuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339, Hamburg, Germany) de 1,5 ml, apirogênico, contendo 100 µl de água livre de pirogênio. Em seguida, cada frasco foi codificado e agitado vigorosamente em aparelho Mixtron (Toptronix, São Paulo, SP, Brasil), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para dessorção do material. Os bráquetes foram então removidos com pinça esterilizada e os tubos plásticos contendo a suspensão bacteriana foram congelados a -20°C, para, posteriormente, serem submetidos à quantificação de endotoxina bacteriana por meio do teste *Limulus Amebocyte Lysate*.

Os outros **dois** bráquetes (sendo sempre um do lado direito e outro do lado esquerdo) foram colocados individualmente em tubos plásticos para microcentrífuga contendo 150 µl de solução tampão TE (pH 7,6) e 100 µl de NaOH a 0,5 M. A seguir, cada tubo foi codificado e agitado vigorosamente em aparelho Mixtron (Toptronix, São Paulo, SP, Brasil), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para dessorção do material. Os bráquetes foram removidos com pinça clínica esterilizada e os tubos contendo as suspensões bacterianas foram também congelados a -20°C, para que as amostras fossem submetidas oportunamente à técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA POR MICRORGANISMOS PERIODONTOPATOGÊNICOS GRAM-NEGATIVOS, EMPREGANDO A TÉCNICA CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION

Cepas bacterianas e condições de crescimento

O processamento/análise das amostras foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos – SP.

A relação das 16 cepas bacterianas de microrganismos Gram-Negativos utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos do biofilme supra-gengival, descritos por Haffajee et al. (2008), sendo escolhidas espécies Gram-negativas pertencentes aos complexos laranja e vermelho, que são patógenos associados com a doença periodontal.

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

Microrganismo	Cepa
<i>Complexo laranja</i>	
<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
<i>Complexo vermelho</i>	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

^a ATCC (American Type Culture Collection).

^b Forsyth Institute, Boston, MA.

Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas em anaerobiose na superfície do meio ágar-sangue, 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 por 10 minutos. Em seguida, o sedimento bacteriano foi lisado 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 16 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 e Vogelstein (1983).

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As amostras oriundas dos bráquetes foram avaliadas utilizando-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, preconizada por Socransky et al., em 1994. As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 800 µl de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão contendo o DNA livre das bactérias presentes nas amostras dos bráquetes foi depositada em uma das canaletas do aparelho *Minislot 30* (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA – Figura 1) e transferida para uma membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA). As duas últimas das 30 canaletas horizontais do *Minislot* foram usadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 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.

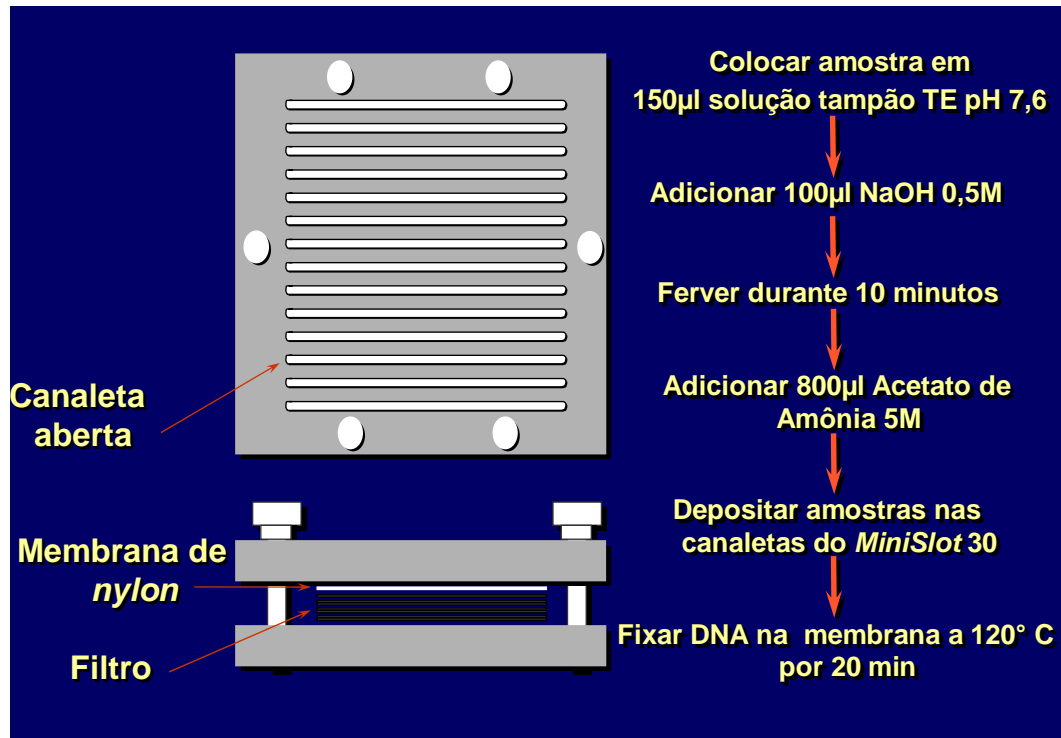


Figura 1- Representação esquemática do *Minislot 30* (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras na membrana de *nylon* (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

A membrana foi pré-hibridada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) [1 x SSC= 150 mM 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).

Em seguida a membrana foi posicionada no *Miniblotter 45* (Immunelectrics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter 45* foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/ml, em 130 µl de solução de hibridação composta de 45% 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 hibridação, aguardou-se um período mínimo de 20 horas, a 42°C.

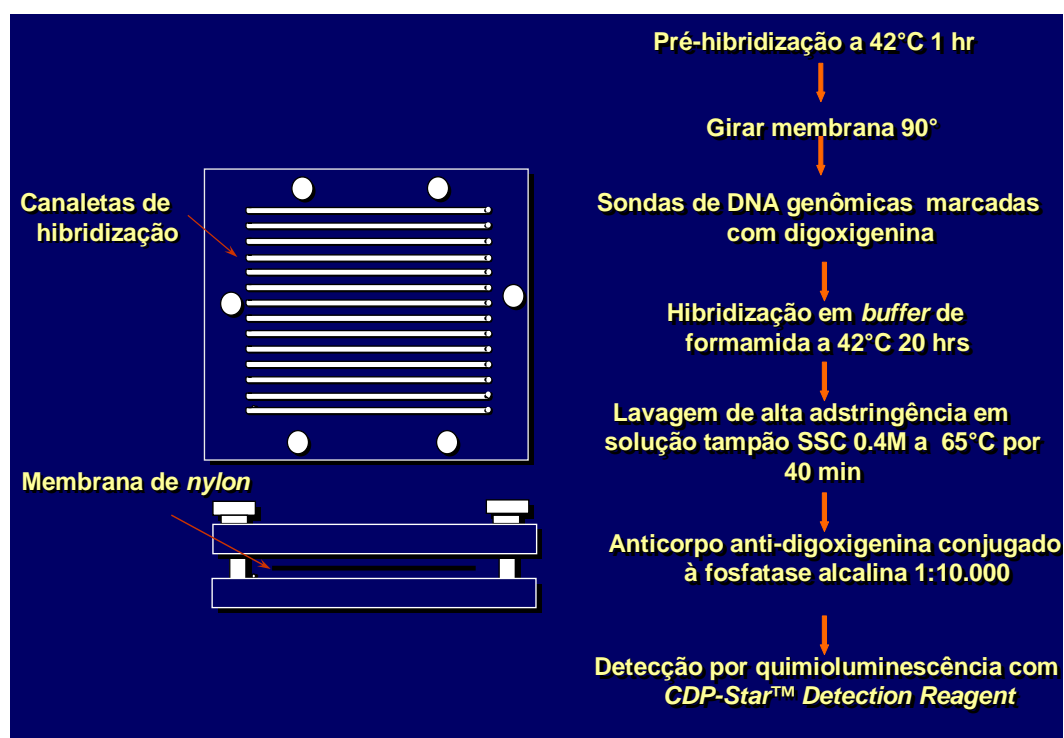


Figura 2- Representação esquemática do *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridação e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

Detecção das espécies

Após o período de hibridação, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45, lavada por 40 minutos a 65°C numa solução de alta adstringência (solução tampão SSC a 0,4 M) composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20 mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução 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, e, em seguida, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) 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, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl e 0,1 M de NaCl, pH 9,5.

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). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete de autoradiografia (Chassi Radiográfico 30 x 40 cm, Konex, São Paulo, SP, Brasil), sobre um filme radiográfico de 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por, aproximadamente, 40 minutos. 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 detectados pelas sondas de DNA, onde as linhas horizontais representam as amostras e as verticais as sondas de DNA, propiciando um formato de "tabuleiro de xadrez" (Figura 3).

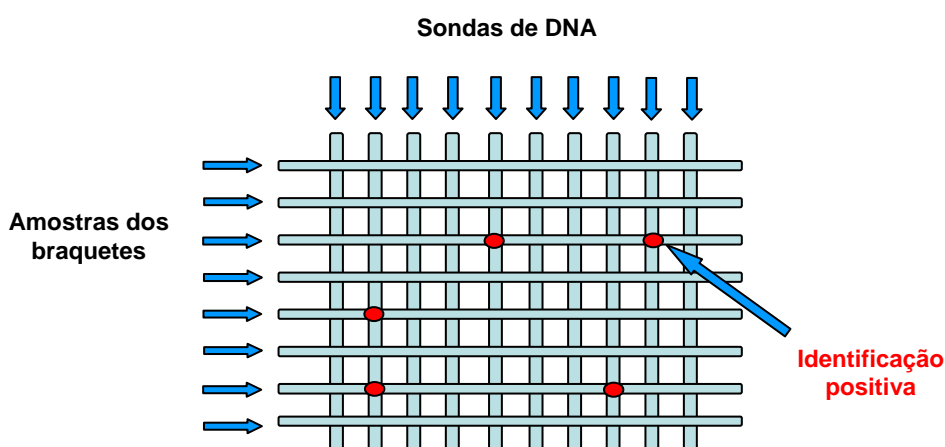


Figura 3- Representação esquemática do padrão de hibridação entre as bactérias presentes nas amostras e as sondas de DNA (Técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

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 dos resultados 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 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 fim de facilitar a anotação dos resultados em fichas elaboradas especificamente para esse fim, 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 2). Tendo em vista que foram removidos 2 bráquetes de cada paciente, foi efetuada a soma dos 2 valores obtidos. Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras.

Tabela 2- Conversão dos escores em valores numéricos originais, para cada microrganismo avaliado nas suspensões microbianas oriundas de bráquetes metálicos, *in vivo*, pela técnica *Checkerboard DND-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)

QUANTIFICAÇÃO DA ENDOTOXINA BACTERIANA (LPS) POR MEIO DO TESTE *LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE*

A quantificação da endotoxina presente nos bráquetes metálicos, expressa em EU/ml (Unidades de Endotoxina por mililitro), foi efetuada por meio do teste Limulus Amebocyte Lysate – LAL (QCL-1000® - Cambrex Bio Science Walkersville Inc., MD, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Uma curva padrão com quantidades conhecidas de endotoxina foi utilizada para determinar a concentração de endotoxina nas amostras. Em uma placa de poliestireno de 96 poços apirogênica (96 Wells Cell Culture Cluster – non pyrogenic – Corning Incorporated – USA) foram pipetados, em duplicata, 50 µl das soluções preparadas de cada concentração de padrão conhecido (1,0 UE/ml; 0,5 UE/ml; 0,25 UE/ml; 0,1 UE/ml) e 50 µl de controle negativo (água apirogênica), também em duplicata. Nos demais poços da placa foram pipetados 50 µl de cada amostra obtida dos bráquetes, descongeladas e diluídas em água apirogênica, em uma proporção de 1:50.000, baseada na padronização obtida em estudo piloto prévio. Durante todo o período reacional as placas com as amostras e os reagentes foram incubadas em estufa, a 37°C.

Posteriormente, em cada um dos poços foram acrescentados 50 µl do Limulus Amebocyte Lysate (LAL), utilizando uma pipeta multicanal, seguido de agitação por 15 segundos e incubação por 10 minutos. Todos os tempos das adições de reagente e incubação foram idênticos. A seguir, foram adicionados nos poços 100 µl do substrato cromogênico pré-aquecido a 37 °C, seguido de agitação e incubação por mais 6 minutos em ausência de luz, seguindo o mesmo esquema de pipetagem anterior e mantendo uma taxa de pipetagem constante. Posteriormente, foram acrescentados 100 µl de reagente de parada (25% v/v de ácido acético glacial em água), a fim de interromper a reação.

As absorbâncias de cada amostra foram obtidas em um leitor de ELISA (Bio-Rad 450, Ultramark, Japan) a 410 nm, sabendo-se que a

absorbância é diretamente proporcional à quantidade de endotoxina presente nos poços e sua correlação com a concentração de endotoxina é linear, na faixa de 0,1 - 1,0 EU/mL.

A concentração de endotoxina em cada amostra, em EU/ml, foi calculada a partir dos valores de absorbância das soluções contendo quantidades conhecidas de endotoxina (padrão), multiplicados pelo fator de diluição.

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 teste de Kruskal-Wallis para distribuição da quantidade de biofilme dental.

Os resultados obtidos com relação à detecção de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos e à quantificação de endotoxina foram tabulados e 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%.

4 RESULTADOS



RESULTADOS

Os 33 pacientes (100%) selecionados para o estudo participaram do mesmo até a sua conclusão.

Os resultados da análise da aleatorização dos indivíduos nos grupos Controle e Experimental encontram-se na Tabela 3. Com relação à idade, foram observados maiores valores de mediana para o grupo Experimental ($p=0,03$), em comparação ao Controle. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos dos 2 grupos, com relação à quantidade de biofilme dental ($p=0,66$) e ao gênero ($p=0,22$). No grupo Controle 58,8% dos indivíduos eram do gênero masculino e 41,2% do gênero feminino, enquanto que no grupo Experimental 37,5% eram do gênero masculino e 62,5 do gênero feminino.

Tabela 3 – Caracterização comparativa dos indivíduos dos grupos Controle (uso de bochechos com solução placebo) e Experimental (uso de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%)

Variável	Grupo Controle	Grupo Experimental	P
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
Idade	13 (12 – 16)	19,5 (13,5 – 27,5)	0,03*
Quantidade de biofilme dental [†]	1,8 (0,9 – 2,1)	1,4 (1,0 – 2,0)	0,66**

[†]: Quantidade de biofilme dental obtida por meio da avaliação do índice de placa (Silness e Loe, 1964).

*: valor de p para o teste t.

** : valor de p para o teste de Kruskal-Wallis.

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

Grupo Controle

(Uso de bochechos com solução placebo)

Todos os bráquetes oriundos dos pacientes desse grupo encontravam-se contaminados por pelo menos um dos microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos avaliados. A maioria das 16 espécies de microrganismos avaliados (81,25%) estava presente em 100% dos pacientes do grupo Controle. Dos 17 pacientes, 16 (94,12%) apresentaram-se contaminados por *C. rectus* e *T. forsythia*. O microrganismo menos prevalente nesse grupo foi o *T. denticola*, encontrado em 13 pacientes (76,47%).

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total de microrganismos das 16 espécies periodontopatogênicas dos complexos vermelho e laranja nos indivíduos do grupo Controle variou de 6.350.000 a 141.100.000, com mediana de 29.150.000.

Nesse grupo, as espécies bacterianas do complexo laranja apresentaram-se em maiores quantidades, em relação às espécies do complexo vermelho ($p < 0,01$).

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 detectadas em maiores quantidades foram *T. socranskii*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* ($p < 0,05$).

A quantificação de endotoxina para este grupo evidenciou valores que variaram de 0,09136 EU/ml a valores superiores a 1,9000 EU/ml, com mediana de 0,6673 EU/ml.

Grupo Experimental

(Uso de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%)

Todos os bráquetes oriundos dos pacientes desse grupo encontravam-se contaminados por pelo menos um dos microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos avaliados. No grupo Experimental, das 16 espécies avaliadas, 10 (62,5%) 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* e *C. ochracea*).

Dos 16 pacientes, 15 (93,75%) apresentaram-se contaminados por *F. nucleatum ss vicentii* ou *P. gingivalis*. Os microrganismos *T. socranskii* e *T. forsythia* estavam presentes em 14 indivíduos (87,5%) e *C. rectus*, em 13 (81,25%). Da mesma forma que no grupo Controle, *T. denticola* também foi o microrganismo menos prevalente nesse grupo, tendo sido encontrado em apenas 10 indivíduos (62,5%).

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total de microrganismos das 16 espécies periodontopatogênicas dos complexos vermelho e laranja nos indivíduos do grupo Experimental variou de 4.030.000 a 55.900.000, com mediana de 13.130.000.

Quando comparado ao grupo Controle, observou-se que o número total de microrganismos no grupo Experimental foi menor. A mediana do total de microrganismos foi de 29.150.000 no grupo Controle e de 13.130.000 no grupo Experimental, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$), evidenciando a eficácia dos bochechos com solução à base de clorexidina.

Considerando as espécies bacterianas isoladamente, *C. rectus*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss vicentii*, *F. nucleatum ss polymorphum*, *F. periodonticum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* 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 complexos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Experimental para o complexo laranja ($p = 0,04$), com contagens menores de bactérias após o bochecho com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (Figura 4).

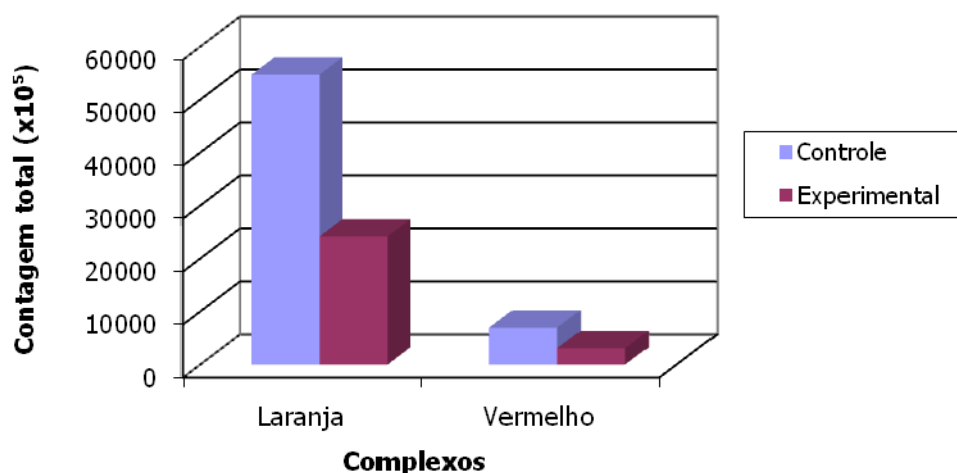


Figura 4- Comparação do número total de microrganismos entre os grupos Controle (bochechos com solução placebo) e Experimental (bochechos com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%), para os complexos microbianos laranja e vermelho.

O resultado das comparações entre os grupos Controle e Experimental, com relação à detecção das espécies bacterianas avaliadas, pode ser evidenciado nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Detecção de microrganismos dos complexos laranja e vermelho nos 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 (355.000– 1.000.000)	0,16
<i>C. rectus</i>	600.000 (200.000 – 1.000.000)	60.000 (15.000 – 400.000)	0,01
<i>C. showae</i>	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	800.000 (200.000 – 1.000.000)	0,05
<i>C. ochracea</i>	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	0,45
<i>F. nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	1.500.000 (1.100.000 – 2.000.000)	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	0,01
<i>F. nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	1.000.000 (1.000.000 – 1.500.000)	800.000 (350.000 – 1.000.000)	0,02
<i>F. nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	1.500.000 (1.000.000 – 1.500.000)	1.000.000 (200.000 – 1.500.000)	0,04
<i>F. periodonticum</i>	1.500.000 (1.500.000 – 2.000.000)	1.000.000 (200.000 – 1.050.000)	<0,01
<i>P. intermedia</i>	1.000.000 (500.000 – 1.000.000)	600.000 (20.000 – 800.000)	0,03
<i>P. melaninogenica</i>	2.000.000 (1.500.000 – 20.000.000)	2.000.000 (1.500.000 – 10.500.000)	0,70
<i>P. nigrescens</i>	1.000.000 (1.000.000 – 1.500.000)	1.000.000 (1.000.000 – 1.000.000)	0,49
<i>S. noxia</i>	1.000.000 (600.000 – 1.500.000)	1.000.000 (555.000 – 1.250.000)	0,47
Complexo vermelho			
<i>P. gingivalis</i>	200.000 (110.000 – 200.000)	65.000 (20.000 – 200.000)	0,02
<i>T. forsythia</i>	200.000 (200.000 – 1.000.000)	155.000 (100.000 – 200.000)	0,03
<i>T. denticola</i>	100.000 (10.000 – 200.000)	15.000 (0 – 100.000)	0,20
<i>T. socranskii</i>	600.000 (510.000 - 1.500.000)	600.000 (550.000 - 1.050.000)	0,74

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

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

Tabela 5 – Resultados das comparações entre os grupos Controle (uso de bochechos com solução placebo) e Experimental (uso de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%), com relação ao total de microrganismos detectados e à detecção de microrganismos dos complexos laranja e vermelho

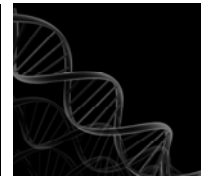
Microrganismos	Grupo Controle	Grupo Experimental	p*
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
Total de microrganismos (Complexos laranja + vermelho)	29.150.000 (16.500.000-39.900.000)	13.130.000 (10.270.000-19.850.000)	0,01
Complexo laranja	17.200.000 (12.500.000-38.900.000)	12.460.000 (8.995.000-18.325.000)	0,04
Complexo vermelho	1.900.000 (910.000-3.200.000)	1.065.000 (610.000-1.460.000)	0,06

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

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

Com relação à quantificação da endotoxina bacteriana, observou-se que no grupo Experimental os valores variaram de 0,3386 EU/ml a valores superiores a 1,9000 EU/ml, com mediana de 1,2199 EU/ml. Quando comparada ao grupo Controle (mediana de 0,6673 EU/ml), a quantidade de endotoxina no grupo Experimental foi maior, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$).

5 DISCUSSÃO



DISCUSSÃO

Da Metodologia

Haffajee et al., em 2008, avaliaram as relações entre as espécies microbianas da placa supragengival, utilizando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. A partir daí definiram os chamados “complexos microbianos” vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo, e grupo dos *Actinomyces*, ou seja, grupos de microrganismos que ocorriam em associação.

No presente estudo em bráquetes metálicos foram avaliadas as bactérias dos complexos laranja e vermelho, uma vez que as espécies que se encontram em maiores números adjacente às áreas de inflamação gengival pertencem a esses complexos (Haffajee et al., 2008).

A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, amplamente utilizada em Periodontia (Matarazzo et al., 2008; Teles et al., 2008; Ioannou et al., 2009; Adriaens et al., 2009), foi empregada nesse estudo como método para a detecção de microrganismos em bráquetes ortodônticos *in vivo*. A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, preconizada por Sockransky et al., em 1994, é um método de diagnóstico que também 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 as amostras ser estocadas por longos períodos (Siqueira et al., 2000; Moraes et al., 2002).

Outras vantagens da técnica incluem: permitir a avaliação de várias espécies bacterianas em um grande número de amostras de uma única vez; permitir a detecção de microrganismos menos comuns, não identificáveis por técnicas de cultura microbiana e apresentar alta especificidade (92%); e permitir a detecção sem a necessidade de amplificação. Entretanto, apresenta algumas limitações como a sensibilidade, não sendo uma técnica tão sensível quanto o *PCR* por permitir a detecção de um número a partir de 10^4 células, sendo por isso um método semi-quantitativo, além de detectar apenas espécies cujas sondas foram previamente selecionadas (Socransky et al., 1998; Socransky et al., 2004).

No presente estudo, foram selecionados apenas microrganismos Gram-negativos, tendo em vista que esses apresentam a endotoxina bacteriana em sua parede celular (Rietschel e Brade, 1992).

Para a avaliação da presença ou da ausência de endotoxina em soluções ou instrumentos utilizados em humanos, tem sido recomendado o emprego de testes formulados a partir do extrato aquoso de células (amebócitos) do sangue do caranguejo *Limulus polyphemus*, denominados de testes *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), em substituição ao teste pirogênico, que se baseia na injeção intravenosa das referidas soluções em coelhos (Poole, 1991). O teste LAL vem sendo amplamente empregado para a detecção de endotoxina em diferentes áreas da Odontologia, (Silva et al., 2007; Goteiner et al., 2008; Martinho e Gomes, 2008; Dutil t al., 2009).

De acordo com o fabricante, o teste LAL é um teste cromogênico, utilizado para a determinação da quantidade de endotoxina presente em uma solução, por meio da alteração de cor da amostra testada. Na presença de endotoxina, os componentes do LAL são ativados por uma cascata de proteínas que resultam na clivagem de um substrato incolor presente no reagente do teste, com a liberação de p-nitroanilina (pNA), a qual apresenta coloração amarelada. A liberação de pNA é medida espectrofotometricamente a 405-410 nm, após a interrupção da reação por um reagente de parada.

Vários autores têm avaliado métodos de recuperação da endotoxina aderida a dispositivos médicos como implantes ou cateteres (Ludwig e Avis, 1989; Novitsky et al., 1986; Twohy e Duran, 1986). Segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos (United States Pharmacopeia, 1995) e a Farmacopéia Brasileira (1988), o processo de recuperação da endotoxina aderida a qualquer dispositivo deverá ser realizada pela combinação de métodos mecânicos (agitação e utilização de ultra-som) e químicos (água livre de pirogênio). Tendo como base as Farmacopéias dos Estados Unidos e do Brasil, no presente estudo foi realizada a recuperação da endotoxina presente nos bráquetes metálicos por meio da associação dos métodos mecânico (uso de agitador mecânico) e químico (utilização de água livre de pirogênio como solução de recuperação).

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 esse representa o “padrão ouro” (delineamento ideal) das pesquisas que avaliam a eficácia clínica de materiais e técnicas de tratamento (Fletcher et al., 2002). Todos os elementos da população têm igual probabilidade de pertencer à amostra, e todas as possíveis amostras têm também igual probabilidade de ocorrer (Costa Neto, 2002).

No presente estudo, de acordo com a análise estatística da aleatorização dos indivíduos que participaram dos grupos Controle e Experimental, foram observados maiores valores de mediana de idade no grupo Experimental ($p=0,03$). No entanto, não houve diferença entre os 2 grupos, com relação ao gênero ($p=0,22$) e à quantidade de biofilme dental inicial ($p=0,66$). Ressalta-se que, para o presente estudo, o fato dos grupos Controle e Experimental apresentarem quantidades de biofilme dental inicialmente semelhantes foi importante para a confiabilidade dos resultados relativos à eficácia dos bochechos com clorexidina.

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 dentifrício 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. Sienta-se que os indivíduos não tinham conhecimento de qual solução (placebo ou com clorexidina) estavam utilizando nos bochechos.

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 Featherstone (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 substância ideal para desinfecção de aparelhos ortodônticos deveria ser bactericida e apresentar um amplo espectro de ação, ser atóxica, não carcinogênica e não irritante. Além disso, deveria ser de fácil uso, eficaz na remoção do biofilme sem provocar danos ao aparelho, quimicamente estável, não deveria conter álcool e deveria apresentar baixo custo (Kolstad e Petit, 1983).

Tendo em vista que não há um agente antimicrobiano que reúna todos os requisitos da substância ideal, concordamos com Moshrefi (2002) quando relatou que a clorexidina ainda é considerada o antimicrobiano "padrão ouro", quando comparada aos demais agentes utilizados para controle do biofilme dental. Assim, no presente estudo foi utilizado o Periogard[®] no grupo Experimental, sob a forma de bochechos, após a escovação do aparelho, que é uma solução à base de gluconato de clorexidina a 0,12%, disponível no comércio e amplamente utilizada na prática odontológica, com finalidades diversas (Denton, 1991).

O protocolo de uso (2 bochechos por semana) foi baseado nos estudos de Peixoto (2007) e de Bagatin-Rossi (2007) que observaram, por meio de cultura microbiana e microscopia eletrônica de varredura, a eficácia desse protocolo sobre estreptococos do grupo mutans, em aparelhos removíveis de acrílico e em disjuntores de Haas.

Dos Resultados do Grupo Controle

(Uso de bochechos com solução placebo)

Um dos problemas clínicos mais freqüentes durante o tratamento ortodôntico é a ocorrência de alterações inflamatórias nos tecidos gengivais, incluindo a gengivite (Zachrisson e Zachrisson, 1972; Sallum et al., 2004). As alterações locais que ocorrem após a instalação de aparelhos ortodônticos fixos elevam a prevalência de microrganismos periodontopatogênicos no biofilme dental, exacerbando a gengivite em pacientes portadores de bráquetes (Sallum et al., 2004; Lee et al., 2005).

Como salientado anteriormente, as espécies do complexo vermelho e laranja estão altamente relacionadas com a presença de inflamação gengival e doença periodontal crônica (Socransky et al., 1998; Socransky e Haffajee, 2005; Haffajee et al., 2008).

De acordo com os resultados do presente estudo, empregando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, verificou-se que os bráquetes também podem atuar como nichos para a colonização por microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos dos complexos laranja e vermelho podendo favorecer, assim, a inflamação gengival, pois muitas vezes estão situados em íntima proximidade com o sulco gengival.

Empregando outras técnicas de biologia molecular, como o PCR, alguns estudos também têm relatado a presença de patógenos periodontais no biofilme supra e subgengival, durante o tratamento ortodôntico (Sallum et al., 2004; Lee et al., 2005; Thornberg et al., 2009).

No presente estudo, observamos que os bráquetes metálicos encontravam-se contaminados por elevadas quantidades de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos dos complexos laranja e vermelho (mediana de 29.150.000), com maiores níveis para os microrganismos do complexo laranja. Assim, verifica-se que esses periodontopatógenos podem ser considerados componentes importantes da microbiota de indivíduos com aparelhos ortodônticos fixos.

Com a finalidade de avaliar a contaminação microbiana de bráquetes ortodônticos, verificou-se que até o momento apenas um estudo empregou a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Anhoury et al. (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, 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 resultados do presente estudo clínico randomizado, após um tempo padronizado de permanência dos bráquetes na cavidade bucal de 30 dias.

Deve-se ressaltar que, em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos, os quais não podem ser removidos da boca para serem higienizados, o controle da contaminação microbiana 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. (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 para o controle da contaminação microbiana nas partes que compõem os aparelhos ortodônticos.

Um outro aspecto relevante é que os microrganismos Gram-negativos contêm a endotoxina em sua parede celular, a qual é liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana, exercendo uma série de efeitos biológicos importantes que conduzem à reação inflamatória e reabsorção óssea (Daly et al., 1980; Ishihara et al., 1991; Rietschel e Brade, 1992; Antal-Szalmás et al., 1997; Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Jiang et al., 2003; Mochizuki et al., 2004; Ren et al., 2005; Doucet e Lowenstein, 2006; Rogers et al., 2007; Silva et al., 2008; Sosroseno et al., 2009).

De acordo com a literatura específica, a endotoxina bacteriana liberada pela lise dos microrganismos Gram-negativos pode aderir-se à superfície radicular (Aleo et al., 1974; McCoy et al., 1987) e a materiais como ligas metálicas (Knoernschild et al., 1997), implantes (Nelson et al., 1997), resinas (Knoernschild et al., 1996) e cerâmicas (Robinson et al., 1996).

A afinidade da endotoxina a bráquetes metálicos foi relatada *in vitro* em 1999, por Knoernschild et al. Esses autores expuseram bráquetes metálicos à endotoxina purificada de *P. gingivalis* e de *E. coli*, por 24 horas. A seguir, os bráquetes foram colocados em frascos contendo água livre de endotoxina, por períodos de 24 a 96 horas. Decorridos esses períodos, foi efetuada a quantificação da endotoxina na solução, por meio de espectrometria de cintilação, demonstrando que a endotoxina bacteriana de microrganismos Gram-negativos apresentou alta afinidade *in vitro* por bráquetes metálicos.

Nossos resultados demonstraram que a endotoxina se liga aos bráquetes metálicos, também *in vivo*.

Concordamos com Knoernschild et al. (1999) quando relataram que, embora as respostas do tecido gengival ao tratamento ortodôntico possam ser atribuídas em parte à conformação dos acessórios ortodônticos, que favorece a retenção de microrganismos, a aderência da endotoxina aos bráquetes também é um fator importante.

Quando o bráquete é colocado em proximidade com os tecidos gengivais, a endotoxina aderida a ele poderia ser liberada continuamente, contribuindo com a inflamação gengival. Embora a atração da endotoxina aos

bráquetes metálicos seja bastante estável (Knoernschild et al., 1999), essa liberação pode ocorrer pois a endotoxina possivelmente apresenta uma baixa energia de superfície (Gagnon et al., 1994; Nelson et al., 1997), enquanto que os bráquetes metálicos apresentam uma elevada energia de superfície (Eliades et al. 1995).

No entanto, a relação específica entre a endotoxina bacteriana aderida aos bráquetes e a resposta biológica dos tecidos frente à liberação contínua de endotoxina desses sítios, ainda é desconhecida.

Segundo Knoernschild et al. (1999), a variedade de efeitos da endotoxina presente na região crevicular sugere que esse seja um importante fator envolvido na inflamação dos tecidos periodontais. Tendo em vista que os bráquetes são muitas vezes colocados próximos da região crevicular, a afinidade com a adesão da endotoxina pode aumentar sua concentração no sulco gengival e continuamente expor os tecidos à endotoxina, predispondo essas regiões à inflamação.

Esse fato poderia explicar, em parte, porque mesmo pacientes com higiene bucal satisfatória apresentam, algumas vezes, inflamação persistente nos tecidos gengivais.

Dos Resultados do Grupo Experimental

(Uso de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%)

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 (Amitha e Munshi, 1995; Gehlen et al., 2000; Auschill et al., 2005; Lessa et al., 2007; Maruo et al. 2008). 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 deste agente antimicrobiano sobre os patógenos periodontais, na clínica ortodôntica, ainda não tinha sido verificada por meio de técnicas moleculares.

A clorexidina é uma biguanida (Hidalgo e Dominguez, 2001), descoberta na década de 40 por pesquisadores que buscavam desenvolver agentes antimalária (Parson, 1974). Embora nunca tenha sido utilizada no tratamento da malária, este agente antimicrobiano é amplamente utilizado na área médica, para o tratamento de queimaduras e anti-sepsia da pele, mãos e braços (Hidalgo e Dominguez, 2001), entre outras utilizações. A clorexidina tem sido empregada topicamente para o controle do biofilme dental desde 1959, porém foi a partir do estudo clássico de Loe et al., em 1976, que o seu uso se popularizou na Odontologia, particularmente em função do seu amplo espectro de ação, ou seja, sua eficácia contra microrganismos gram-positivos, gram-negativos, aeróbios, anaeróbios facultativos, leveduras e vírus (Hidalgo e Dominguez, 2001).

A atividade antimicrobiana da clorexidina origina-se de sua carga positiva em pH fisiológico, facilitando sua adesão de forma não específica à parede bacteriana, carregada negativamente. Esta interação ocasiona uma alteração no equilíbrio osmótico bacteriano, com extravasamento de potássio e fósforo e precipitação do citoplasma, com conseqüente morte da bactéria (Hidalgo e Dominguez, 2001). Adicionalmente, a adesão deste agente antimicrobiano à bactéria e às glicoproteínas salivares interfere na formação da película adquirida e na adsorção bacteriana ao dente (Rolla e Melsen, 1975).

A atividade antimicrobiana da clorexidina, *in vivo*, em parte é decorrente do seu efeito prolongado (substantividade), que é a propriedade de se adsorver, reversivelmente, à mucosa bucal, película adquirida, proteínas salivares e hidroxiapatita (Rolla et al., 1971), sendo lentamente liberada na cavidade bucal por até 24 horas (Gjerme et al., 1974). Quando utilizada topicamente, a clorexidina é uma substância segura, com baixo potencial de toxicidade (Loe et al., 1976; Fardal e Turnbull, 1986; Thylstrup e Fejerskov, 2001), não ocasionando alterações nas bactérias nem induzindo a seleção de cepas mutantes resistentes (Sreenivasan e Gaffar, 2002).

Por outro lado, o uso prolongado da clorexidina pode ocasionar efeitos colaterais, como pigmentação marrom-amarelada da estrutura dental e

restaurações, alterações na sensação gustativa (Fardal e Turnbull, 1986), sabor amargo e pigmentação do dorso da língua, entre outros (Fardal e Turnbull, 1986; Thylstrup e Fejerskov, 2001).

Em 1997, Anderson et al. compararam clinicamente o efeito de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%, 2 vezes ao dia, por 1, 2 e 3 meses, em 30 adolescentes sob tratamento ortodôntico. Após 3 meses, o índice de descoloração apresentou maiores escores no grupo que empregou os bochechos com clorexidina, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle (bochechos com solução placebo). Os autores concluíram que o uso da clorexidina sob a forma de bochechos, em adição à higiene bucal mecânica, foi eficaz na redução do biofilme dental e da gengivite, em adolescentes sob tratamento ortodôntico.

No presente estudo, não foram relatados efeitos colaterais significativos após o 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, a qual não interferiu negativamente na estética, segundo relato de alguns pacientes. Possivelmente, isso ocorreu em função da baixa concentração 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.

O protocolo de utilização do gluconato de clorexidina a 0,12%, sob a forma de 2 bochechos diários de 30 segundos, por 30 dias, empregado no presente estudo, ocasionou uma redução estatisticamente significativa ($p=0,01$) na contagem total de microrganismos, evidenciando a eficácia dos bochechos com solução à base de clorexidina na redução de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos em bráquetes metálicos *in vivo*.

Quando os microrganismos foram avaliados por complexos, observou-se no presente estudo que após a realização dos bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12% no grupo Experimental, a redução no número de microrganismos do complexo laranja foi estatisticamente significativa

($p=0,04$). Esse fato é relevante pois, de acordo com Sockransky et al. (1998), alterações provocadas no complexo laranja poderiam prevenir uma colonização subsequente por microrganismos do complexo vermelho, que são patógenos periodontais mais agressivos. Concordamos com Featherstone (2006), quando afirmou que com o uso da clorexidina as bactérias podem não ser eliminadas, mas sim reduzidas, confirmando os resultados desse estudo.

Acreditamos que a falta de evidência estatística na redução de alguns microrganismos possa ter sofrido também a influência da localização geográfica desses microrganismos na estrutura do bráquete, incluindo saliências e reentrâncias, tornado-os de certa forma menos acessíveis à ação da solução antimicrobiana.

Por outro lado, embora o número de microrganismos tenha sofrido redução significativa após o uso dos bochechos com clorexidina, a quantidade de endotoxina detectada nos bráquetes sofreu elevação significativa após esse procedimento. Quando comparada ao grupo Controle (mediana de 0,6673 EU/ml) a quantidade de endotoxina no grupo Experimental foi maior (mediana de 1,2199 EU/ml), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$).

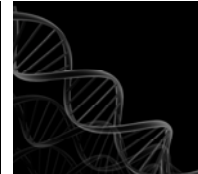
Em 2008, Lee et al. avaliaram o efeito do uso de solução de clorexidina a 0,02% como irrigante durante o debridamento ultra-sônico, em pacientes com periodontite. Observaram que a instrumentação ultra-sônica elevou os níveis de endotoxina circulante, após 5 minutos, independente do uso da clorexidina.

A elevação dos níveis de endotoxina nos bráquetes, após o uso da clorexidina, pode ser explicada pelo fato de que os bochechos com essa solução antimicrobiana ocasionou a morte de microrganismos Gram-negativos. Com a morte desses microrganismos, houve liberação de grande quantidade de endotoxina nas proximidades dos bráquetes. Como já observado por Knoernschild et al. (1999), a endotoxina bacteriana de microrganismos Gram-negativos apresenta alta afinidade por bráquetes metálicos, ligando-se a eles.

Esse fato apresenta relevância, pois pode também explicar, em parte, a observação de inflamação gengival mesmo em pacientes que estão fazendo uso de agentes antimicrobianos, para o controle químico do biofilme dental. Até o momento, não há trabalhos publicados avaliando as repercussões clínicas desse conhecimento, nem avaliando possíveis métodos para remoção ou inativação da endotoxina presente em bráquetes ortodônticos.

Tendo em vista a observação de uma alta prevalência de patógenos periodontais na microbiota de bráquetes metálicos, estudos adicionais são necessários, envolvendo o uso de técnicas de biologia molecular e diferentes protocolos de uso da clorexidina, variando-se a concentração e forma de aplicação, com acompanhamento por períodos mais longos. Esses estudos podem conduzir a um controle clínico adequado dos microrganismos periodontopatogênicos, em pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo. Além disso, o desenvolvimento de procedimentos clínicos ou agentes antimicrobianos que apresentem ação sobre a endotoxina bacteriana torna-se necessário, em função de que, após o uso dos bochechos, houve aumento da quantidade de endotoxina nos bráquetes metálicos.

6 CONCLUSÃO



CONCLUSÃO

Considerando as condições específicas deste trabalho, com base nos resultados obtidos no estudo clínico randomizado com o uso da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e do teste *Limulus Amebocyte Lysate*, pôde-se concluir que:

- Os bráquetes metálicos dos pacientes do grupo Controle encontravam-se contaminados com elevadas quantidades de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos dos complexos laranja e vermelho, com maiores níveis para os microrganismos do complexo laranja. Assim, essas espécies podem se consideradas componentes importantes da microbiota de indivíduos com aparelhos ortodônticos fixos.

- O número total de microrganismos e o número de microrganismos do complexo laranja foram estatisticamente menores no grupo Experimental, em comparação ao Controle, o que evidenciou a eficácia dos bochechos com solução à base de clorexidina.

- Quando comparada ao grupo Controle, a quantidade de endotoxina no grupo Experimental foi estatisticamente maior.

- Os bochechos com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% podem ser úteis, na prática clínica, com a finalidade de reduzir os níveis de microrganismos periodontopatogênicos Gram-negativos, em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos. No entanto, em função do aumento da quantidade de endotoxina nos bráquetes após o uso dos bochechos, estudos adicionais são necessários com a finalidade de desenvolver procedimentos clínicos ou agentes antimicrobianos que tenham ação sobre a endotoxina presente nos bráquetes metálicos.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS*

1. Adriaens LM, Alessandri R, Spörri S, Lang NP, Persson GR. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol*. 2009 Jan;80(1):72-81.
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. Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol 2000*. 2002;29:207-22.
4. Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA, Varboncoeur AP. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. *J Periodontol*. 1974 Sep;45(9):672-5.
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 Jan;133(1):91-4.
6. Amitha H, Munshi AK. Effect of chlorhexidine gluconato mouthwash on the plaque microflora in children using intra oral appliances. *J Clin Pediatr Dent*. 1995; 20:23-9.
7. Anderson GB, Bowden J, Morrison EC, Caffesse RG. Clinical effects of chlorhexidine mouthwashes on patients undergoing orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1997 Jun;111(6):606-12.

* De acordo com as Normas Internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP/USP (2003).

8. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthodontist* 2002; 72(4): 338-43.
9. Antal-Szalmas P, Striyp JA, Weersink AJ, Verhoef J, Van Kessel KP. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1997 Jun;61(6):721-8.
10. Ärtun J, Brobakken BO. Prevalence of carious white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *Eur J Orthod.* 1986;8(4):229-34.
11. Atack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. *J Periodontol.* 1996 Feb;67(2):78-85.
12. Auschill TM, Hein M, Hellwig E, Follo M, Scullean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobials agents on early in situ biofilms formation. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 147-52.
13. Bagatin-Rossi CR. Formação de biofilme e corrosão em aparelhos disjuntores de Haas, com e sem utilização de agente antimicrobiano: estudo *in situ*. [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Univ. de São Paulo; 2007.
14. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Hemoglobin and LPS act in synergy to amplify the inflammatory response. *J Dent Res.* 2007 Sep;86(9):878-82.
15. Brêtas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MAN. Effect of 0,4% stannous fluoride gel on mutans streptococci in relation to elastomeric rings and steel ligatures in ortjodontic patients. *J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005; 127:428-33.
16. Brightman LJ, Terezhalmly GT, Greenwell H, Jacobs M, Endlow DH. The effects of a 0.12 per cent chlorhexidine gluconate mouthrinse on orthodontic patients aged 11 through 17 with established gingivitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*1991; 100: 324-329.

17. Brusca M, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa A. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganism *in vitro*. *Angle Orthodontis* 2007; 77: 331-336.
18. Consolaro A, Consolaro M. *Controvérsias na Ortodontia & Atlas de Biologia da Movimentação Dentária*. 1 ed: Dental Press; 2008.
19. Costa Neto PLO. *Estatística*. 2a ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher; 2002.
20. Daly CG, Seymour GJ, Kieser JB. Bacterial endotoxin: a role in chronic inflammatory periodontal disease? *J Oral Pathol*. 1980 Jan;9(1):1-15.
21. Denton GW. Chlorhexidine. In: Block SS, editors. *Disinfection, sterilization, preservations*. 4th ed. Philadelphia:Ed. Lea & Febiger; 1991.p.274-89.
22. 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 Mar;133(3):435-9.
23. Diedrich P. Microbial colonization and various cleaning procedures for orthodontic appliances. *Fortschr Kieferorthop* 1989;50:231-9.
24. 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(4):467-70.
25. Doucet P, Lowenstein M. [Osteoclasts activation by bacterial endotoxins during periodontal diseases]. *Med Sci (Paris)*. 2006 Jun-Jul;22(6-7):614-20.
26. Dutil S, Meriaux A, de Latremoille MC, Lazure L, Barbeau J, Duchaine C. Measurement of airborne bacteria and endotoxin generated during dental cleaning. *J Occup Environ Hyg*. 2009 Feb;6(2):121-30.

27. Eliades T, Eliades G, Brantley WA. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995 Oct;108(4):351-60.
28. Faltermeier A, Burgüers R, Rosentritt. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic materials. *Am J Orthop* 2008; 133: S99-103.
29. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986; 112(6): 863-9.
30. Farmacopéia brasileira. Métodos físicos: esterilização pelo calor. 4ª ed. – Parte I. São Paulo: Atheneu; 1988. p.1-3.
31. Featherstone JDB. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMD Oral Health* 2006; 15;6 Suppl 1:S8.
32. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul 1;132(1):6-13.
33. Fejerskov O, Kidd E. Cárie Dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Ed Santos, 2005.
34. 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 Oct;54(1):27-36.
35. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais.* 3a rd. Porto Alegre: Artmed; 2002.
36. Gagnon F, Knoernschild KL, Payant L, Tompkins GR, Litaker MS, Schuster GS. Endotoxin affinity for provisional restorative resins. *J Prosthodont.* 1994 Dec;3(4):228-36.

37. Gehlen I, Netuschill L, Georg T, Reich E, Berg R, Katsaros. The influence of a 0.2% Chlorhexidine Mouthrinse on Plaque Regrowth in the Orthodontic Patients. *J Orofac Orthop* 2000; 61: 138-148.
38. 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 May;19(3):193-200.
39. Gjermo P. Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol*. 1974; 1: 143-52.
40. Goteiner D, Craig RG, Ashmen R, Janal MN, Eskin B, Lehrman N. Endotoxin levels are associated with high-density lipoprotein, triglycerides, and troponin in patients with acute coronary syndrome and angina: possible contributions from periodontal sources. *J Periodontol*. 2008 Dec;79(12):2331-9.
41. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbioal complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology Immunology* 2008; 23:196-205.
42. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine induced cytotoxicity. *Toxicol in Vitro* 2001;15: 271-6.
43. Huser MC, Baehni PC, Lang R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1990 Mar;97(3):213-8.
44. 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 Feb;36(2):132-41.
45. Ishihara Y, Nishihara T, Maki E, Noguchi T, Koga T. Role of interleukin-1 and prostaglandin in in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res*. 1991 May;26(3 Pt 1):155-60.

46. Jenkins WM, Papapanou PN. Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents. *Periodontol 2000*. 2001;26:16-32.
47. Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holiday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:348-54.
48. Knoernschild KL, Rogers HM, Lefebvre CA, Fortson WM, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999 Jun;115(6):634-9.
49. Knoernschild KL, Tompkins GR, Lefebvre CA, Griffiths LL, Schuster GS. Effect of pH on *Porphyromonas gingivalis* endotoxin affinity for resins. *Int J Prosthodont*. 1996 May-Jun;9(3):239-47.
50. Knoernschild KL, Tompkins GR, Schuster GS, Lefebvre CA, Russell CM. Effect of treatment concentration on lipopolysaccharide affinity for two alloys. *Dent Mater*. 1997 Mar;13(2):111-7.
51. Kolstad R, Petti H. A safe, effective germicide-deodorizer for removable appliances. *J Clin Orthod* 1983; 17:56-7.
52. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1995 Nov;22(11):885-90.
53. Lee MK, Ide M, Coward PY, Wilson RF. Effect of ultrasonic debridement using a chlorhexidine irrigant on circulating levels of lipopolysaccharides and interleukin-6. *J Clin Periodontol*. 2008 May;35(5):415-9.
54. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol* 2005;43:260-5.

55. Leng SX, Elias JA. Interleukin-11 inhibits macrophage interleukin-12 production. *J Immunol.* 1997 Sep 1;159(5):2161-8.
56. Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci* 2004;12:93-8.
57. 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 Jun; 131(6):705.e11-7.
58. Leung NM, Chen R, Rudney JD. Oral bacteria in plaque and invading buccal cells young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 130: 698.e18.
59. Lim BS, Lee S, Lee J, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133: 882-8.
60. Lo BA, Di Marco R, Milazzo I, Nicolosi D, Calì G, Rossetti B, Blandino G. Microbiological and clinical periodontal effects of fixed orthodontic appliances in pediatric patients. *New Microbiol.* 2008 Apr;31(2):299-302.
61. Loe H, Schiott CR, Glavind L, Kaning T. Two years oh use of chlorhexidine in man. General design and effects. *J Periodont Res.* 1976; 11:135-4.
62. Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC. Characterization of inhibitory effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis in vitro. *Infect Immun.* 1995 Sep;63(9):3287-96.
63. Ludwig JD, Avis KE. Recovery of endotoxin preparations from the surface of glass capillary tubes. *J Parent Sci Technol* 1989;43:276-8.
64. Maidwell-Smith M, Wilson M, Kieser JB. Lipopolysaccharide (endotoxin) from individual periodontally involved teeth. *J Clin Periodontol.* 1987 Sep;14(8):453-6.

65. Magno AFF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Faria G, Nelson-Filho P. *In vivo* evaluation of contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthoped 2008; 133(4 suppl):S104-9.
66. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. BMC Oral Health 2006; 6 (Suplemento 1): S14.
67. Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. J Endod. 2008 Mar;34(3):268-72.
68. Martins-Ortiz MF, Freitas PZ, Nelson-Filho P, Consolaro A. Por que se preocupar com a higienização dos aparelhos? Dental Press Orthodon Ortop Facial 2004;9: 30-32.
69. Maruo IT, Rosa EAR, Maruo H, Tanaka O, Guariza F, Ignácio AS, Camargo ES. Effects of chlorhexidine mouth rinse on Streptococci counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. Orthop Craniofac Res 2008; 11: 136-142.
70. 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 Oct;35(10):885-96.
71. Máximo MB, de Mendonça AC, Renata Santos V, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. Clin Oral Implants Res. 2009 Jan;20(1):99-108.
72. McCoy SA, Creamer HR, Kawanami M, Adams DF. The concentration of lipopolysaccharide on individual root surfaces at varying times following in vivo root planing. J Periodontol. 1987 Jun;58(6):393-9.

73. McDevitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol*. 2000 Feb;71(2):156-63.
74. Mochizuki S, Kobayashi M, Suzuki T, Oikawa A, Koseki T, Nishihara T, Hasegawa K. Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2004 Oct;39(5):333-43.
75. Moraes SR, Siqueira Júnior JF, Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. 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.
76. Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol*. 1977 Jan;118(1):362-8.
77. Moshrefi A. Chlorhexidine. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 2002; 50:5-9.
78. Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2006; 130:275.e17-275.e22.
79. 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 Jun;20(6):571-7.
80. Nelson SK, Knoernschild KL, Robinson FG, Schuster GS. Lipopolysaccharide affinity for titanium implant biomaterials. *J Prosthet Dent*. 1997 Jan;77(1):76-82.

81. Nelson-Filho P, Leonardo ML, Silva LAB, Assed S. Radiografic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcuim hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. J Endod 2002;28:694-6.
82. Novitsky TJ, Schmidt-Gegenbach J, Remillard JF. Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces. J Parent Sci Technol 1986;40:284-6.
83. Olympio KP, Bardal PA, de M Bastos JR, Buzalaf MA. Effectiveness of a chlorhexidine dentifrice in orthodontic patients: a randomized-controlled trial. J Clin Periodontol. 2006; 33(6): 421-6.
84. Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. Oral Microbiol Immunol. 2009 Jun;24(3):183-9.
85. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. Angle Orthodontist 2007; 77: 1090-1095.
86. Parson JC. Chemoterapy of dental plaque – a review. J Periodontol 1974; 45: 177-86.
87. Peixoto, ITA. Avaliação de protocolos clínicos para a desinfecção de aparelhos ortodônticos removíveis (cultura microbiana e MEV). [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Univ. de São Paulo; 2007.
88. Poole S. Pyrogen testing of polypeptide and protein drugs. In: Hider RC, Barlow D. (eds). Polypeptide and protein drugs: production, characterization, and formulation. Chichester: Ellis Horwood; 1991. p.146-53.
89. Ren L, Leung WK, Darveau RP, Jin L. The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. J Periodontol. 2005 Nov;76(11):1950-9.

90. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992; 267:26-33.
91. Rizzo AA. Absorption of bacterial endotoxin into rabbit gingival pocket tissue. *Periodontics*. 1968 Apr;6(2):65-70.
92. Robinson FG, Knoernschild KL, Sterrett JD, Tompkins GR. Porphyromonas gingivalis endotoxin affinity for dental ceramics. *J Prosthet Dent*. 1996 Feb;75(2):217-27.
93. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):550-8.
94. Rolla G, Melsen B. The mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975; 54:57-62.
95. Rolla G, Loe H, Schiott CR. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch oral Biol*. 1971; 16: 1109-16.
96. 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.
97. Roux S, Orcel P. Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res*. 2000;2(6):451-456.
98. Ruviere DB, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child*, 2007;74(2):118-23.
99. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Gonçalves RB, Machion L, Sallum AW, Sallum EA. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:363-6.

100. Schwartz J, Stinson FL, Parker RB. The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. *J Periodontol*. 1972 May;43(5):270-6.
101. Sari E, Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontics patients. *Angle Orthod* 2007;77(5): 881-4.
102. Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000 Oct;27(10):758-62.
103. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964 Feb;22:121-35.
104. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani C.A. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.
105. Silva LA, Silva RAB, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2008;19(4):296-300.
106. Silva, RAB, Leonardo MR, Faccioli LH, Medeiros AI, Nelson-Filho P. Effect of different methods of sterilization on the inactivation of bacterial endotoxin (LPS) in endodontic files. *Braz J Microbiol* 2007;38:270-2.
107. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res*. 2009;88(1):61-5.
108. Siqueira Júnior JF, Rôças IN, Souto R, 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.

109. Sosroseno W, Bird PS, Seymour GJ. Nitric oxide production by a human osteoblast cell line stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Feb;24(1):50-5.
110. Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 1989 Mar;4(1):47-51.
111. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 135–87.
112. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.
113. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:352-62.
114. Socransky SS, Smith CL, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin A E. "Checkerboard" DNA-DNA Hybridization. *Biotechniques* 1994; 17: 788-790.
115. Sreenivasan PK, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol*. 2002; 29:965-74.
116. Steinberg D, Eyal S. Initial biofilms formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004; 31:1041-5.
117. Sudjalim TR, Woods MG, Manton DJ, Reynolds EC. Prevention of demineralization around orthodontic brackets in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007; 131(6):705.e1-9.
118. Syed SA, Loesche WJ. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. *Infect Immun*. 1978 Sep;21(3):821-9.

119. Takahashi N, Kobayashi M, Takaki T, Takano K, Miyata M, Okamatsu Y, Hasegawa K, Nishihara T, Yamamoto M. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Jun;23(3):259-64.
120. Teles RP, Patel M, Socransky SS, Haffajee AD. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):784-94.
121. 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 Jan;135(1):95-8.
122. Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 2nd ed. São Paulo: Editora Santos; 2001.
123. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1995 Oct;66(10):852-9.
124. Twohy CW, Duran AP. Extraction of bacterial endotoxin from medical devices. *J Parent Sci Technol* 1986;40:287-91.
125. United States Pharmacopeia XXIII. USP Convention inc., Twinbrook Parkway, Rockville, MD, January 1, 1995.
126. 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 Aug;23(4):282-90.
127. Zachrisson BU, Zachrisson S. Gingival condition associated with partial orthodontic treatment. *Acta Odontol Scand*. 1972 Mar;30(1):127-36.
128. Youravong N, Teanpaisan R, Chongsuivatwong V, Geater AF, Dahlen G. Microbiology in toothbrush samples from children exposed to lead in southern Thailand. *Acta Odontol Scand*. 2007 Feb; 65(1):22-8.

ANEXO



ANEXO

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 – FÓRP/USP
GDR/gdr

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

REMBERTO MARCELO ARGANDOÑA VALDEZ

*Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social*

*Avenida do Café, s/n - CEP 14040-904
Ribeirão Preto – SP
2009*

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](#)