



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Rodrigo Otávio Citó César Rêgo

**Avaliação clínica e microbiológica
periodontal de crianças e adolescentes
sob terapia ortodôntica com aparelhos
fixos ou removíveis**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, do Campus de Araraquara, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia (*Periodontia*).

Orientador: **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**

ARARAQUARA
2004

Rêgo, Rodrigo Otávio Citó César

Avaliação clínica e microbiológica periodontal de crianças e adolescentes sob terapia ortodôntica com aparelhos fixos ou removíveis. / Rodrigo Otávio Citó Cesar. – Araraquara : [s.n.], 2004.

118 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Gengivite 2. Aparelhos ortodônticos 3. Criança.
4. Adolescente 5. Dente – Microbiologia 6. Sondas DNA
7. Clonagem molecular. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646

Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

DADOS CURRICULARES

Rodrigo Otávio Citó César Rêgo

Nascimento: 23.01.1976 - Fortaleza - CE

Filiação: Sebastião César Rêgo Filho

Maria Iran Citó Rêgo

1993 – 1997 - Curso de Graduação em Odontologia na
Universidade Federal do Ceará

2000 – 2002 - Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
(Periodontia, nível de Mestrado) na Faculdade
de Odontologia de Araraquara – UNESP

2002 – 2004 - Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
(Periodontia, nível de Doutorado) na Faculdade
de Odontologia de Araraquara – UNESP

Julho/2003 – Fevereiro/2004 - Programa de Doutorado
com Estágio no Exterior (PDEE - CAPES) na *School of
Dental Medicine - State University of New York at
Buffalo*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Sebastião e à minha mãe Iran, pela dedicação e o estímulo à minha formação, pelo apoio a todas as minhas decisões e pelo exemplo de caráter que contribuíram para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Violet I. Haraszthy pela idéia original deste trabalho, pela oportunidade do estágio no exterior, pelos ensinamentos e pela forma que me recebeu nos Estados Unidos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli. Agradeço a amizade, o estímulo e a contribuição durante a realização de todo o Curso de Pós-Graduação. Obrigado pela confiança e pelos bons momentos de convivência.

Aos meus irmãos, Thereza e Fred, os meus cunhados Ricardo e Raquel, aos meus sobrinhos Ana Beatriz, Isabela e Carlos Eduardo. O incentivo e o carinho de vocês foi muito importante para esta conquista.

Ao casal Jeová e Mônica pela contribuição na realização deste sonho. Sem vocês eu não teria conseguido chegar onde estou chegando. Agradeço ainda o exemplo de amizade e competência profissional. Espero um dia fazer por alguém o que vocês fizeram por mim.

A todos os meus familiares especialmente a minha avó Lindalva, pelo incentivo à realização deste curso.

À Profa. Dra. Adriana Marcantonio pela oportunidade do estágio nesta Faculdade e pelo modo que me acolheu desde a minha chegada a Araraquara.

À minha amiga Cristiane Oliveira por sempre ter me incentivado e ajudado. Especialmente na execução deste trabalho.

Ao meu amigo Maurício Costa, pela ajuda neste trabalho e a disponibilidade de sempre ajudar.

Aos amigos Hilmo Filho, Tiago Rêgo, André Pessoa, Leonardo Ferro, Lícia Vasconcelos, Káthia Oliveira e Helano Freitas. A amizade de vocês serve de estímulo para esta realização.

Aos amigos Sérgio Santiago e Mestre Ivo pelos ensinamentos de vida, disponibilidade de sempre ajudar e aconselhar nas horas mais difíceis.

A Yeon Jung pela amizade e o estímulo para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara na pessoa da Diretora Profa. Dra. Adriana Marcantonio pela oportunidade da realização da Pós-Graduação.

Aos professores da Disciplina de Periodontia: Profs. Drs. Elcio Marcantonio Jr, Adriana Marcantonio, Benedito Egbert de Toledo, José Eduardo César Sampaio e Carlos Rossa Jr. pelos ensinamentos e pela convivência durante o decorrer do curso.

À Regina Lúcia, pela amizade, competência no trabalho e paciência de sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Ary dos Santos Pinto pela ajuda na realização deste trabalho.

A Profa. Carolina Chan Cirelli pela amizade e pela ajuda na execução da pesquisa.

À Profa. Dra. Denise Spolidorio pela amizade e por ter me ajudado nos primeiros passos na Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Sílvio Govoni pela contribuição na Análise Estatística

Aos meus grandes amigos conquistados em Araraquara: Cristina Oliveira, Rogério Margonar e Flávia Miyahara.

Aos colegas e funcionários do *Dep. of Oral Biology* da *State University of New York at Buffalo*: Shawn Jordan, Carol Parker, Homer Reynolds, Cathy Drdul e Jen Tworkowsky.

Aos colegas de Pós-Graduação em Periodontia

Aos amigos da "colônia cearense": Rinaldo Teles, Marjorie Teles, Haroldo Rodrigues, Paula Jacques e Emanuel Arraes e Carolina.

Aos amigos da "colônia brasileira" de Buffalo: Cláudia Queiroz, Marcelo Barata, Eloísa Padilha, Carlos Rossa Jr. e Heloísa

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia

Aos Professores e funcionários das Disciplinas de Ortodontia e Odontopediatria

Aos Professores e funcionários do GESTOS

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

A todos os pacientes e responsáveis que se dispuseram a participar deste estudo.

À CAPES pela concessão das Bolsas de Estudo, DS e PDEE (0225/03-7) e pelo financiamento deste estudo – PROAP.

SUMÁRIO

Introdução	10
Revisão de Literatura	13
1. Influência do tratamento ortodôntico sobre as condições clínicas e microbiológicas periodontais	14
1.1. Aparelhos Ortodônticos fixos	14
1.2. Aparelhos Ortodônticos removíveis	28
2. Utilização de sondas de DNA para a identificação de microrganismos	32
3. Clonagem e seqüenciamento da região 16S do DNA ribossômico (16S rDNA) a partir de amostras clínicas para a identificação de microrganismos	37
Proposição	42
Material e Método	43
Resultado	54
Discussão	69
Conclusão	81
Referências	82
Apêndices	
Apêndice A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	92
Apêndice B - Calibração	95
Apêndice C - Soluções utilizadas neste estudo	96

Apêndice D - Protocolo para extração de DNA	98
Apêndice E - Protocolo para amplificação de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR)	99
Apêndice F - Marcação das sondas de DNA	101
Apêndice G - Protocolo para detecção colorimétrica de membranas hibridizadas com sondas de DNA	102
Apêndice H - Protocolo utilizado para clonagem da 16S rDNA ...	103
Apêndice I - Dados clínicos absolutos dos participantes do estudo	105
Apêndice J - Dados estatísticos absolutos	111
Resumo	115
Abstract	117

Introdução

A instalação de aparelhos ortodônticos concomitante ao inadequado controle de higiene oral pode favorecer o acúmulo de placa bacteriana induzindo a ocorrência de gengivite^{1,3,13,29,32,46,50,62,82,95} e provocando alterações na microbiota subgengival^{29,46,67-69,75,76}, o que pode desencadear um processo de destruição periodontal.

Esses aparelhos são considerados fatores modificadores locais da doença periodontal, pois a presença de grampos, *brackets*, elásticos, fios, bases de acrílico e especialmente bandas ortodônticas facilitam o acúmulo de placa bacteriana devido ao aumento da área superficial para a sua retenção e à dificuldade de higienização^{34,87,94}. Ainda, foi demonstrado que periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomyetemcomitans* podem estar diretamente aderidos a estes dispositivos^{6,51}.

Alguns estudos têm relatado que a utilização de aparelhos ortodônticos por crianças e adolescentes aumenta significativamente os Índices de Placa e Gengival em comparação a pacientes que não os utilizam^{29,62,67,68,95} e que ocorre aumento da profundidade de sondagem em dentes bandados ou em dentes nos quais se encontram colados *brackets* ortodônticos^{3,29,50,82,95}.

Após a instalação de aparelhos ortodônticos removíveis ou fixos, tem sido relatadas mudanças qualitativa e quantitativa na composição da microbiota supra e subgengival^{1,7,10,11,29,46,67-69,75,76}. Tipos

morfológicos bacterianos associados ao estabelecimento da doença periodontal como espiroquetas, filamentosos, fusiformes e bastonetes Gram-negativos estão aumentados em detrimento da diminuição de cocos associados à saúde periodontal^{46,76}. A prevalência de espécies relacionadas à doença periodontal como *A. actinomycetemcomitans*, também está aumentada em indivíduos com aparelhos ortodônticos fixos e principalmente em sítios com *brackets* e bandas ortodônticas^{67-69,75}.

O advento da biologia molecular contribuiu para o aparecimento de novas técnicas para diagnóstico microbiológico como a utilização de sondas de DNA e a clonagem da região 16S do DNA ribossômico - 16S rDNA. A utilização das sondas de DNA é baseada na hibridização de uma sequência de DNA ou RNA por sequências específicas complementares que possibilitam a detecção e a identificação de microrganismos^{27,31}. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para a detecção de bactérias periodontopatogênicas em diversos estudos^{6,18,21,40,55,57,84,89,93}.

A 16S rDNA é uma região que apresenta alta variabilidade entre os microrganismos, conferindo uma identidade a cada espécie⁸⁸. A amplificação dessa região, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras de placa bacteriana e posterior clonagem e seqüenciamento de seus produtos, tem contribuído para uma reclassificação na taxonomia de microrganismos e um melhor entendimento do papel microbiano no processo etiopatológico da doença

periodontal^{47,52,71-73,78,80}. Essa técnica possibilita a identificação de bactérias não-cultiváveis ou até então desconhecidas e de um amplo espectro de microrganismos, permitindo a diferenciação entre bactérias geneticamente semelhantes.^{71,78} Conseqüentemente, pode-se obter uma resposta mais precisa da associação desses microrganismos com os processos de saúde periodontal, gengivite ou doenças periodontais.

Desta forma, o estudo dos parâmetros clínicos periodontais e da avaliação da microbiota subgengival de indivíduos que utilizam aparelhos ortodônticos, através desses métodos mais precisos, pode elucidar se a utilização dos mesmos facilita a colonização por microrganismos periodontopatogênicos predispondo ao desenvolvimento da doença periodontal.

Revisão de Literatura

Com o objetivo de obter-se um melhor entendimento dos assuntos abordados nesta tese, o capítulo de Revisão de Literatura foi redigido de acordo com o seguinte esquema:

1. Influência do tratamento ortodôntico nas condições clínicas e microbiológicas periodontais
 - 1.1. Aparelhos ortodônticos fixos
 - 1.2. Aparelhos ortodônticos removíveis
2. Utilização de sondas de DNA para a identificação de microrganismos
3. Clonagem e seqüenciamento da região 16S do DNA ribossômico (16S rDNA) a partir de amostras clínicas para a identificação de microrganismos.

1. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ORTODÔNTICO SOBRE AS CONDIÇÕES CLÍNICAS E MICROBIOLÓGICAS PERIODONTAIS

Esta Revisão de Literatura foi realizada, através de estudos clínicos publicados na língua inglesa, abordando a influência do tratamento ortodôntico com aparelhos fixos ou removíveis, durante a sua fase ativa, sobre as condições clínicas e microbiológicas periodontais.

1.1. Aparelhos Ortodônticos Fixos

Em 1964, Bloom e Brown¹¹, avaliaram os efeitos da utilização de aparelhos ortodônticos fixos sobre a microbiota oral. Amostras de saliva de 12 crianças e adolescentes de 10 a 17 anos foram submetidas à cultura bacteriana, sendo analisada a contagem total da microbiota aeróbia e anaeróbia de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella* e leveduras. Todos os tipos bacterianos aumentaram após a inserção dos aparelhos, mas apenas o aumento de *Lactobacillus* foi significativo. Um fato relevante observado foi que, quanto maior o número de bandas instaladas, maior foi o crescimento na quantidade dessas bactérias.

Baleseifen e Madonia¹⁰ examinaram, por meio de cultura bacteriana, indivíduos de 10 a 16 anos, quanto à presença de *Lactobacillus* e *Streptococcus*, antes e um mês após à inserção de aparelhos ortodônticos fixos. Verificaram que, na segunda avaliação, ocorreu um aumento significativo na contagem total de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*. Os autores sugeriram que a instalação de bandas e dos arcos resultou em uma superfície adicional para a retenção de restos alimentares, favorecendo o acúmulo dessas bactérias.

Zachrisson e Zachrisson⁹⁵ avaliaram 49 indivíduos com e 53 sem aparelhos fixos, com idades entre 11 e 13 anos, durante o período de tratamento ortodôntico. Medidas do Índice de Placa, Índice Gengival e da profundidade de sondagem foram realizadas antes, durante e após a remoção dos aparelhos. Após dois meses de utilização dos mesmos, observaram o desenvolvimento de gengivite hiperplásica nos pacientes que os utilizavam, embora estes apresentassem baixos níveis de placa. Ao final do tratamento, apesar do Índice de Placa significativamente menor do que o do grupo controle, esses indivíduos apresentavam Índice gengival e profundidade de sondagem significativamente maiores.

Kloehn e Pfeifer⁵⁰ examinaram cinquenta pacientes, de 11 a 17 anos de idade, a cada três meses durante o tratamento ortodôntico com aparelhos fixos. Relataram a ocorrência de hiperplasia gengival, principalmente na região posterior da arcada e em áreas interproximais.

Alstad e Zachrisson⁴ estudaram 77 crianças com idade média de 11,7 anos. Dezoito delas utilizavam aparelhos fixos multibandados, 20 possuíam bandas instaladas apenas nos primeiros molares permanentes e 39, não utilizavam, sendo estas consideradas como controle. Foram analisados os Índices de Placa e Gengival e o nível de inserção clínico. Os pacientes com aparelhos apresentavam baixos níveis de presença de placa ou de inflamação gengival, considerados bons ou excelentes. Não foram observadas diferenças significantes nem entre pacientes com e sem aparelhos nem entre os com aparelhos multibandados e os com bandas somente nos primeiros molares. Foi verificada perda de inserção média de 0,1 mm, mas também que não houve diferenças entre os grupos. Os autores atribuíram a falta de diferenças à cooperação dos indivíduos analisados em relação a um programa de prevenção e instrução de higiene oral realizado antes e durante o tratamento ortodôntico.

Lündstrom et al.⁶² estudaram 60 crianças e adolescentes, divididos em 4 grupos de acordo com os meios de higiene oral empregados. Independente desses meios, observaram aumento no acúmulo de placa ao longo do tratamento e sugeriram que esse processo era decorrente da presença de bandas, arcos e elásticos que dificultavam a execução de uma higienização adequada. Observaram alterações na gengiva e sugeriram que essas alterações não poderiam ser explicadas apenas pelo acúmulo de placa. Segundo os autores, isso poderia ser em

decorrência da instalação de bandas subgengivalmente, o que poderia estar causando danos diretos aos tecidos gengivais.

Boyd¹² examinou 24 pacientes com aparelhos fixos com idades entre 9 e 14 anos. Eles foram divididos em três grupos de acordo com o método empregado para higiene oral. Um grupo não recebeu instrução de higiene oral, enquanto os outros dois a receberam em visitas mensais até o quinto mês de tratamento. Além disso, em um destes, também foi recomendado o uso diário de evidenciadores de placa. Os pacientes que utilizaram evidenciadores apresentaram menos inflamação gengival do que os que não foram instruídos.

Durante dez meses, Huber et al.⁴⁵ avaliaram o efeito da profilaxia profissional em 14 adolescentes com aparelhos fixos. Mensalmente, esses indivíduos eram instruídos quanto a métodos adequados de higiene oral e recebiam profilaxia com taças de borracha em um lado das arcadas. Não foram verificadas diferenças nos índices de Placa e Gengival entre o lado que recebeu profilaxia e o que não recebeu, mas foi observada a redução dos dois índices nos dois grupos. Por outro lado, mesmo com a redução desses índices, o lado controle apresentou níveis de hiperplasia significativamente maiores do que os do lado teste. Isso pode ser atribuído ao fato dos aparelhos desses adolescentes serem multibandados.

Diamanti-Kipioti et al.²⁹ avaliaram o efeito do tratamento com aparelhos ortodônticos fixos sobre as condições clínicas e microbiológicas

periodontais. Foram estudados 12 indivíduos de 10 a 15 anos de idade, sendo 6 com aparelhos fixos – grupo experimental – e 6 com contenções removíveis usadas durante a fase de manutenção – grupo controle. Os indivíduos não receberam instrução de higiene oral. Os exames iniciais foram realizados uma semana antes da instalação das bandas, e, ao longo dos quatro meses do estudo, os indivíduos foram reexaminados a cada três a cinco semanas. Embora tenham apresentado um pequeno crescimento durante esse período, não ocorreram alterações significantes nos Índices de Placa e Gengival em nenhum dos grupos. O grupo experimental apresentou um aumento significativo na profundidade de sondagem, porém, como não foi evidenciada perda de inserção clínica, essas alterações foram decorrentes de hiperplasia gengival. Nesse grupo, medidas da profundidade de sondagem de 4 mm foram notadas no período de quatro a sete semanas após a bandagem e de 5 mm ao exame final. O exame microbiológico revelou que, no grupo experimental, ocorreu um aumento significativo na porcentagem de “bacteroides de pigmentação negra”, *Bacteroides intermedius* e *Actinomyces odontolyticus*. Assim, os autores sugeriram que, na ausência de um controle adequado de higiene oral, a instalação de bandas ortodônticas pode promover uma mudança no ecossistema local levando ao aparecimento de patógenos periodontais.

Além do tamanho da amostra estudada por esses autores ser questionável, outro fator relevante pode ser abordado: a utilização

apenas do primeiro molar superior direito como representativo da situação clínica de cada indivíduo. Desta forma, a interpretação desses resultados pode ter sido superestimada. Também é duvidoso o papel dos microrganismos, que se encontravam aumentados, como fator de risco para o desenvolvimento das doenças periodontais.

Em 1987, Sinclair et al.⁸² estudaram os efeitos do tratamento ortodôntico sobre os parâmetros clínicos periodontais e sobre a composição da microbiota subgengival de incisivos centrais (com *brackets*) e primeiros molares (com bandas) do lado direito das arcadas. Indivíduos entre 12 e 14 anos de idade foram examinados antes da inserção dos dispositivos e um ano após. Não foram observadas alterações no Índice de Placa nem na profundidade de sondagem. O Índice Gengival aumentou significativamente nos dentes com *brackets*, mas não entre os bandados. Em todos os dentes, foram observadas alterações significantes nas prevalências de *Streptococcus* e *Actinomyces*, mas não nas de fusobactéria, bacteróides e espiroquetas.

Huser et al.⁴⁶ avaliaram durante 90 dias, 10 indivíduos com aparelhos fixos com idades entre 11 e 23 anos. Em cada indivíduo, foram comparados dentes bandados (primeiros molares superiores) e não-bandados (segundos molares superiores). Ocorreram alterações significantes nos Índices de Placa e Gengival entre os dentes teste e os controle, assim como foi observado crescimento significativo na porcentagem de espiroquetas, bastonetes móveis, filamentosos e

fusiformes e diminuição de cocos nos dentes bandados. Por outro lado, não foram observadas alterações na microbiota dos dentes não-bandados.

Boyd e Baumrind¹³ avaliaram as condições clínicas periodontais de molares bandados ou com tubos colados, em 33 adolescentes durante 18 meses de tratamento com aparelhos fixos. Observaram que molares bandados apresentaram maior acúmulo de placa, mais inflamação gengival e maior aumento da profundidade de sondagem do que dentes nos quais haviam apenas tubos colados. Utilizando materiais semelhantes, segundos molares inferiores e superiores bandados ou apenas com dispositivos colados, Alexander³ também observou essas mesmas alterações clínicas em 23 adolescentes ao longo de 12 meses. Relatou que o aumento na profundidade de sondagem encontrada era devido à hiperplasia gengival.

Dubey et al.³² avaliaram a presença de placa bacteriana e de gengivite em pacientes, com idades entre 11 e 21 anos, que usavam aparelhos fixos ou removíveis e em indivíduos que não os utilizavam. Verificaram que indivíduos com aparelhos fixos apresentaram maiores Índices Gengival e de Placa do que os com aparelho removível e do que os sem aparelho.

Petti et al.⁷⁶ examinaram, durante os sete meses iniciais de tratamento com aparelhos ortodônticos fixos, possíveis alterações nos parâmetros clínicos e microbiológicos periodontais. Foram avaliados a

presença de placa bacteriana, o sangramento papilar e a profundidade de sondagem assim como, através de microscopia e cultura, a contagem total de bactérias, as porcentagens de cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-negativos, bastonetes móveis, espiroquetas e a presença de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*. Os exames foram feitos no momento da instalação dos aparelhos, seis a oito semanas após e seis a sete meses após. Não foram encontradas diferenças significantes entre os parâmetros clínicos avaliados. Na placa bacteriana supragengival, foi verificado um aumento significativo na contagem total de bactérias, na porcentagem de bastonetes Gram-negativos, bastonetes móveis e espiroquetas. Na placa bacteriana subgengival, houve um aumento significativo na contagem bacteriana, na porcentagem de bastonetes Gram-negativos, bastonetes móveis e espiroquetas e um decréscimo na porcentagem de cocos Gram-positivos. *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em apenas um paciente. *P. gingivalis* foi encontrado em dois pacientes no primeiro exame, em três no segundo e em três no terceiro; entretanto, nenhum paciente apresentou esta bactéria continuamente nos três exames. Assim, os autores apontaram o fato de que o aumento da contagem de espiroquetas poderia ser um indicativo de risco para o desenvolvimento de doença periodontal. Por outro lado, considerando a baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* sugeriram que esse risco é baixo⁷⁶.

Paolantonio e um grupo de colaboradores investigaram os parâmetros clínicos periodontais e a presença de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos durante o tratamento com aparelho ortodôntico fixo. Os dados foram publicados em quatro artigos científicos^{67-69,75}. No primeiro deles, um estudo transversal revelou que os indivíduos, com idades entre 12 e 20 anos, que utilizavam aparelho há pelo menos seis meses, apresentavam diferenças significantes quanto à presença de sangramento gengival e de *A. actinomycetemcomitans* em relação aos indivíduos que não utilizavam aparelho. Através de cultura, *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em 85% dos indivíduos do grupo experimental e em 28,5% dos do grupo controle. Foi estudado ainda se existiam diferenças entre dentes bandados e dentes com *brackets*, mas isso não foi evidenciado em nenhum dos parâmetros avaliados⁶⁷.

Em 1997 publicaram um estudo longitudinal, realizado ao longo de três anos, em que foram avaliados 70 indivíduos, metade com aparelho fixo há pelo menos seis meses e metade sem aparelho⁶⁸. Os parâmetros analisados foram os mesmos do artigo anterior, além de ter sido realizada a avaliação da profundidade de sondagem e do nível de inserção clínico. Diferenças significantes foram encontradas tanto no exame inicial como três anos após, entre os dois grupos, quanto à presença de placa bacteriana, sangramento gengival e profundidade de sondagem. Nenhum dos indivíduos avaliados apresentou alterações de 2 mm ou mais no nível clínico de inserção. *A. actinomycetemcomitans* foi

encontrado em 86% e 80% dos indivíduos com aparelho, no exame inicial e três anos após, assim como em 16,6% e 26,6% dos indivíduos do grupo controle respectivamente. Essas diferenças entre os dois grupos foram significantes⁶⁸.

Seguindo as hipóteses levantadas com esses trabalhos, em 1999 Paolantonio et al.⁶⁹ examinaram, no mesmo paciente, a influência dos aparelhos fixos sobre os parâmetros clínicos e a colonização por *A. actinomycetemcomitans*. Vinte e quatro indivíduos, com idades entre 18 e 22 anos, foram acompanhados durante 16 semanas, sendo as 12 primeiras semanas com aparelho instalado e mais 4 semanas sem os aparelhos. Os aparelhos foram instalados em apenas uma das arcadas (grupo teste), enquanto a outra arcada, livre de aparelho, foi utilizada como controle. Assim como nos outros dois trabalhos, as análises clínicas e microbiológicas foram realizadas nas regiões mésio-vestibulares dos primeiros molares e disto-vestibulares de incisivos laterais. Inicialmente, não foram verificadas diferenças nos parâmetros clínicos entre os grupos, mas, após a 4^a e até a 12^a semana, ocorreram aumentos significantes nos dois grupos e diferenças significantes entre os mesmos, pois, no grupo teste, houve um aumento três vezes maior na porcentagem de presença de placa e de sangramento gengival. Quatro semanas após a remoção dos aparelhos, foi verificada uma redução na porcentagem desses índices, não havendo mais diferenças significantes entre os dois grupos. Quando da inserção dos aparelhos, *A. actinomycetemcomitans* foi

encontrado em apenas um paciente, em um sítio do grupo teste e em dois sítios do controle. Em pelo menos um sítio, após quatro e oito semanas, a bactéria foi isolada de 19 e 20 indivíduos do grupo teste, respectivamente. Por outro lado, apenas um paciente do grupo controle, o mesmo de quem o microrganismo fora isolado inicialmente, continuou a apresentá-lo. Estes resultados persistiram até a 12^a semana. Quatro semanas após a remoção dos aparelhos, nove indivíduos apresentavam *A. actinomycetemcomitans* nos sítios teste e apenas um nos sítios controle. Tanto as diferenças entre os grupos teste e controle como a redução observada no grupo teste ao final do estudo foram significantes. Assim, os autores sustentaram a hipótese de que o tratamento ortodôntico com aparelhos fixos favorece a colonização por *A. actinomycetemcomitans*, visto que, no mesmo paciente, foi isolado, na grande maioria, de sítios com bandas ou *brackets*, e que, após a remoção dos aparelhos, ocorreu diminuição na colonização.

Recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores publicou uma avaliação semelhante às anteriores, porém analisando, em cada indivíduo, apenas um canino submetido à retração distal, e utilizando o canino contralateral, com *brackets*, mas sem ativação, e o antagonista, sem *brackets*, como controle⁷⁵. Verificaram 21 indivíduos de 12 a 22 anos ao longo de 28 dias. No 28º dia, a porcentagem de sítios positivos para a presença de placa e de sangramento gengival e a média de profundidade de sondagem foram significativamente maiores do que as do exame

inicial, em ambos os caninos teste e seus contralaterais, mas não nos antagonistas. Ao exame inicial, *A. actinomycetemcomitans* não foi encontrado em nenhum dos 21 indivíduos. Entretanto, no 28º dia, foi isolado de 11 caninos teste e de treze contralaterais, mas de nenhum antagonista. Assim, procuraram demonstrar que a piora nas condições clínicas está mais relacionada a colonização por *A. actinomycetemcomitans* do que à força ortodôntica⁷⁵.

Diedrich et al.³⁰ relataram os achados dos efeitos das bandas ortodônticas sobre os tecidos periodontais. Espécimes oriundos de dois cadáveres de 9 e 19 anos de idade foram estudados tendo sido avaliados molares e pré-molares superiores e inferiores bandados. Macroscopicamente, observaram que as margens das bandas nas regiões vestibular e lingual ficavam localizadas supragengivalmente, mas subgengivalmente em praticamente todas as faces proximais. Histologicamente, foi verificada que a gengiva interdental de todos os dentes avaliados apresentavam lesão gengival estabelecida. Em um molar inferior do indivíduo de nove anos, que tivera a banda instalada por seis meses, foi encontrada a presença de infiltrado leucocitário e de exsudato inflamatório na região das fibras transseptais. Ainda, pôde ser evidenciado o estabelecimento de periodontite devido aos danos severos ao tecido conjuntivo de inserção, ao nível da junção cimento-esmalte na região mesial do mesmo dente. A capacidade de selamento do cimento (ionômero de vidro) empregado para fixar as bandas também foi avaliada

nesse estudo. Oitenta e cinco por cento das margens cervicais e oclusais das bandas apresentaram defeitos ou erosões no cimento, onde era encontrado acúmulo de placa bacteriana, principalmente na região interdental³⁰.

Speer et al.⁸⁶ avaliaram a influência da utilização de aparelhos ortodônticos fixos nos parâmetros clínicos periodontais e na composição da microbiota de sete adultos que haviam sido submetidos à terapia periodontal. Todos os pacientes apresentavam bolsas periodontais maior que 4 mm no início da terapia ortodôntica. Seis semanas após a instalação dos aparelhos, os pacientes apresentaram uma redução no número de sítios periodontais com sangramento à sondagem, porém nenhuma alteração na média da profundidade de sondagem. Através de cultura bacteriana, foi constatada uma diminuição na colonização por *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythensis*), *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros* (*Micromonas micros*). Citando Ericsson et al.³⁵, que reportaram a formação de bolsas periodontais infra-ósseas, após movimentos ortodônticos de inclinação, em sítios periodontalmente tratados sem controle adequado de higiene, relataram que esta seria a primeira publicação demonstrando que uma situação inicial de doença periodontal crônica não levaria, por si só, a efeitos deletérios durante a terapia ortodôntica. Atribuíram a melhora nos sinais clínicos e microbiológicos à toxicidade dos íons, principalmente de níquel, liberados

durante o processo natural de corrosão dos aparelhos, os quais seriam responsáveis pela redução dos níveis microbianos investigados⁸⁶. Por outro lado, essas informações podem não ser tão consistentes como é afirmado no artigo. Os dados são analisados apenas descritivamente, em detrimento de uma análise estatística que evidencie diferenças significantes entre os dados encontrados. Ainda, carece de uma melhor caracterização dos sítios periodontais e dos tipos de movimentos ortodônticos empregados.

1.2. Aparelhos Ortodônticos Removíveis

Existe uma carência quanto à publicação de artigos científicos referentes à influência do tratamento ortodôntico com aparelhos removíveis nas condições periodontais. Foram discutidos os dados de seis artigos^{1,7,32,37,74,76} e, em quatro deles^{1,,32,74,76}, a avaliação foi realizada concomitantemente à avaliação da influência de aparelhos fixos.

Addy et al.¹, avaliaram por meio de cultura, a presença de *Candida* em três grupos de indivíduos de 12 a 16 anos que utilizavam aparelhos ortodônticos fixos, aparelhos removíveis superiores ou que não os utilizavam (grupo controle). No mesmo estudo, foi comparada clinicamente a placa bacteriana presente nos indivíduos que utilizavam aparelho removível e nos do grupo controle. *Candida* foi encontrada em 51% dos indivíduos com aparelho fixo, 56% dos com aparelho removível e 46% dos do grupo controle. Entretanto essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Também, nenhuma diferença foi observada quanto a presença de placa entre os indivíduos com aparelho removível e o grupo controle. Por outro lado, quando essa avaliação foi feita apenas entre os usuários de aparelho removível, observou-se que as faces palatinas apresentavam significativamente mais placa do que as vestibulares superiores, enquanto no grupo controle foi observado o contrário. Os autores sugeriram que a presença do aparelho removível na região palatina impede uma limpeza natural ou mecânica adequada, favorecendo o acúmulo de placa.

Goultschin e Zilberman³⁷ avaliaram crianças e adolescentes, com idade entre 10 e 17 anos, sob tratamento com placas de Hawley quanto à presença de placa bacteriana e inflamação gengival. Em alguns pacientes, escolhidos aleatoriamente, foram feitos alívios de 2 mm a 3 mm aquém da margem gengival dos aparelhos, na área correspondente entre o canino e o último molar do lado direito. Após quatro meses, não foram observadas alterações significativas no índice de Placa nesses dentes. Porém, os pacientes que tiveram seus aparelhos aliviados apresentaram um Índice Gengival significativamente maior, assim como foi observada hiperplasia gengival, fato que não ocorreu nos pacientes do outro grupo.

Arendorf e Addy⁷ estudaram longitudinalmente o acúmulo de placa bacteriana e a presença de *Candida* em indivíduos de 8 a 17 anos que utilizavam aparelho ortodôntico removível superior. Os exames clínicos e microbiológicos foram feitos imediatamente antes da instalação dos aparelhos, cinco meses após a instalação e cinco meses após a remoção dos mesmos. A prevalência de *Candida* apresentou elevados níveis na região anterior e posterior do palato durante o período de utilização do aparelho, o que significa que o aparelho favoreceu o acúmulo desses microrganismos durante a terapia. A média do Índice de Placa não aumentou significativamente com o tratamento ortodôntico, mas a queda dessa média foi significativa após a remoção do aparelho. Quando analisado por faces e arcadas, houve um decréscimo na média

do Índice durante a terapia, exceto nas faces palatais superiores, onde houve um aumento dessa média.

Pender⁷⁴ avaliou, durante 4 meses, a influência do controle de higiene profissional, em 8 indivíduos de 10 a 14 anos que utilizavam aparelho removível superior. Mensalmente, os pacientes receberam profilaxia com taça de borracha em um dos hemiarcos. O autor observou que, mesmo com o controle profissional, ocorreu um aumento significativo dos Índices de Placa e Gengival em toda a arcada superior, sendo este último mais relevante nas faces palatinas.

As presenças de placa bacteriana e de gengivite também foram avaliadas por Dubey et al.³² Os resultados indicaram que os pacientes com aparelhos removíveis apresentavam Índice Gengival significativamente maior do que os do grupo controle. Isto não foi observado para o Índice de Placa.

Petti et al.⁷⁶ examinaram longitudinalmente, durante os primeiros 7 meses de tratamento, os parâmetros clínicos periodontais de 15 pacientes portadores de aparelhos removíveis com idades entre 7 e 15 anos. As medidas da profundidade de sondagem, a presença de placa e o sangramento papilar não apresentaram diferenças significantes entre os exames realizados no início, no momento da instalação dos aparelhos e no exame final. Os mesmo autores também avaliaram, por meio de microscopia ótica, microscopia de campo escuro e cultura bacteriana, a microbiota supra e subgengival desses pacientes. Ao segundo exame,

seis a oito semanas após a instalação dos aparelhos, observou-se um decréscimo significativo na quantidade de cocos Gram positivos na placa bacteriana supragengival, assim como um aumento na contagem de espiroquetas. Esta contagem manteve-se até o período final de sete meses. A contagem de bastonetes móveis também aumentou entre o segundo exame e o último. Na placa subgengival, houve um aumento significativo na contagem de espiroquetas ao longo do estudo. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em apenas um paciente, ao segundo exame. *P. gingivalis* foi detectado inicialmente em 4 dos 15 pacientes, em 3, 6 a 8 semanas após e em apenas 2 após 7 meses. Os autores utilizaram os seus achados como indicativos de risco para o desenvolvimento da doença periodontal. Embora tenha ocorrido um aumento significativo na contagem de espiroquetas, não ocorreram alterações nos parâmetros clínicos periodontais. Sendo assim, os autores sugeriram que pacientes sob terapia com aparelhos removíveis não apresentavam risco para o desenvolvimento de doença periodontal⁷⁶.

2. UTILIZAÇÃO DE SONDAS DE DNA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A utilização de sondas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) é um dos meios disponíveis para a identificação microbiana^{22,61,97}. Essa técnica consiste na hibridização de seqüências de nucleotídeos complementares a segmentos do DNA do microrganismo alvo.

Para que ocorra a hibridização, o DNA alvo é desnaturado, ou seja, a dupla fita é separada. Quando se utiliza uma sonda com seqüência complementar a de uma das fitas, ocorre a hibridização indicando a presença do microrganismo procurado. As sondas necessitam ser marcadas de forma a permitir algum tipo de visualização. Os marcadores podem ser enzimáticos, radioativos, fluorescentes ou quimiluminescentes^{22,27,81,97}.

A técnica da hibridização com sondas de DNA possui as vantagens de detectar bactérias não cultivadas ou não viáveis, ser de rápida execução, possuir relativo baixo custo, apresentar sensibilidade e especificidade maior que os métodos de cultura e de detectar microrganismos específicos. Entretanto, não determina resistência ou sensibilidade aos antibióticos e existe a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outros microrganismos^{8,16,60,97}.

Existem três tipos principais de sondas de DNA: as sondas de genoma completo ou genômicas, as sondas clonadas ou de DNA recombinante e as sondas de oligonucleotídeos. As sondas de genoma

completo são preparadas a partir do isolamento do DNA do microrganismo investigado. Possuem a vantagem de apresentarem alta sensibilidade além serem de fácil construção, pois o genoma bacteriano é utilizado para a hibridização^{27,88}. Por outro lado, isso também pode ser uma desvantagem, pois há a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas entre espécies geneticamente muito relacionadas^{27,61}.

Socransky et al.⁸⁴ descreveram a técnica de hibridização com sondas de DNA pela qual pode ser analisada a presença de diferentes microrganismos em várias amostras de placa bacteriana ao mesmo tempo. Essa técnica é denominada *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Na língua inglesa, a palavra *checkerboard* significa tabuleiro de damas. No dispositivo usado para a hibridização, as amostras são colocadas paralelas umas às outras e as sondas de DNA perpendiculares a elas, formando uma figura de um tabuleiro de damas. Tradicionalmente, essa técnica utiliza sondas genômicas para a hibridização, mas sondas de oligonucleotídeos também podem ser usadas^{72,84}. Após a sua descrição, essa técnica tem sido amplamente empregada devido a possibilidade de análise de centenas de hibridizações simultaneamente^{6,20,21,39,40,85,93}. Porém, como na técnica são utilizadas sondas genômicas, há uma maior possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, levando a ocorrência de resultados falso-positivos^{22,31,81}.

As sondas clonadas são confeccionadas por meio da clonagem de segmentos aleatórios ou de função específica do DNA do

microrganismo alvo^{58,81}. São mais específicas, ocorrem menos reações cruzadas com a sua utilização, entretanto necessitam de validação precisa além de a sua construção ser mais laboriosa. Assim como as sondas genômicas, são consideradas sondas grandes pois podem ter entre centenas e milhares de bases^{2,8,27,60,91}.

As sondas de oligonucleotídeos são produzidas a partir de uma sequência específica do microrganismo investigado. Frequentemente é utilizada uma sequência presente na região 16S do DNA ribossômico (16SrDNA). Essa região possui sequências de nucleotídeos com alta variabilidade, específicas para cada microrganismo^{19,24,31,64}. Estas sondas são consideradas sondas pequenas apresentando, usualmente, entre 10 e 50 bases^{8,27,61,81,88}. Quando são utilizadas, uma diferença de uma base em sua sequência é suficiente para distinguir espécies muito relacionadas⁸⁸. Sendo assim, dentre os três tipos de sondas, são as que apresentam maior especificidade e menos reações cruzadas porque hibridizam regiões específicas de cada espécie bacteriana^{27,31,88}.

As sondas de oligonucleotídeos vêm sendo utilizadas em diversos estudos com diferentes propósitos^{18,23,26,31,43,55,57,64,65,89,90}. Demolon et al.²⁶ verificaram a presença de periodontopatógenos em defeitos ósseos tratados com regeneração tecidual guiada associados ou não à antibioticoterapia. Listgarten et al.⁵⁷ utilizaram sondas de oligonucleotídeos para analisar a presença de *B. forsythus* (*Tannerella forsythensis*), *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em indivíduos de

famílias de pacientes com periodontite agressiva. Conrads et al.²³ examinaram a presença de periodontopatógenos em crianças e adultos periodontalmente saudáveis. Moter et al.⁶⁵ utilizaram sondas de oligonucleotídeos para detectar espiroquetas cultivadas e não-cultivadas em pacientes com “periodontite de progressão rápida”.

Haraszthy et al.⁴³ analisaram a presença de *B. forsythus* (*T. forsythensis*), *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em placas ateromatosas de paciente submetidos a cateterismo. Lee et al.⁵⁵ e Choi et al.¹⁸ verificaram, respectivamente, a microbiota periodontopatogênica de coreanos com periodontite agressiva e a com periodontite crônica. Tanner et al.⁸⁹ e, recentemente, Tsai et al.⁹⁰ avaliaram um sistema automatizado, que utiliza sondas de oligonucleotídeos, para ser utilizado em consultório com outros métodos para a detecção de *B. forsythus* (*T. forsythensis*) e *P. gingivalis*.

As sondas de DNA apresentam um limite de detecção de até 10^2 células^{8,97}. Na técnica de *Checkerboard* o limite de detecção pode variar entre 10^5 e 10^6 células⁸⁴. Dix et al.³¹ verificaram que o limite de detecção de sondas de oligonucleotídeos é de 10^3 células. Tsai et al.⁹⁰ relataram que o limite para a detecção de sondas de oligonucleotídeos específicas para *T. forsythensis* e *P. gingivalis* é de 5×10^5 UFC. Alguns pesquisadores têm amplificado o DNA alvo previamente à hibridização com sondas de oligonucleotídeos^{18,43,55,65}. Inicialmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é empregada para amplificar a 16SrDNA.

Após essa amplificação, as sondas, específicas para cada microrganismo, com seqüências complementares a essa região são utilizadas. Esse artifício aumenta o limite de detecção das sondas, sua especificidade e sensibilidade, assim como assegura que o material genético do microrganismo esteja presente, servindo como um controle positivo da reação¹⁸.

Como descrito, a hibridização com sondas de DNA vem sendo utilizada para avaliar a microbiota periodontal. Com o advento da clonagem e seqüenciamento da 16S rDNA a partir de amostras clínicas e a descoberta de novas bactérias ou “filotipos” (espécies não reconhecidas ou não cultivadas), novas sondas podem ser construídas para sua detecção^{17,53,72,79}, assim, contribuindo para esclarecer o potencial patogênico dos microrganismos perante as doenças periodontais.

3. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S DO DNA RIBOSSÔMICO (16S rDNA) A PARTIR DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.

A 16S rDNA é uma região presente em todos os procariotos a qual apresenta seqüências muito conservadas, comuns a todas as bactérias, e seqüências muito variadas, específicas a cada espécie⁸⁸. Recentemente têm sido publicados estudos em que, a partir de amostras de placa bacteriana, a 16S rDNA é amplificada através de PCR e seus produtos são clonados e seqüenciados^{33,47,48,52,71-73,78,80}.

Pelo método mais comum, os produtos da PCR são ligados por meio de uma enzima (DNA ligase) a plasmídeos, que são utilizados como vetores de clonagem, e então são inseridos em *Escherichia coli*. Após um período de crescimento, os plasmídeos são extraídos e seqüenciados. As seqüências podem ser comparadas às disponíveis em bases de dados, como o GenBank^Φ, EMBL^{ΙΟ} e DDBJ^Κ, onde constantemente são depositadas seqüências de uma grande variedade de microrganismos.

A partir dessa técnica pode-se identificar um amplo espectro de bactérias, incluindo bactérias não cultivadas ou até então desconhecidas e proceder à diferenciação entre espécies muito próximas^{33,71,72,78,80}. Por outro lado, a difícil execução e o alto custo de

^Φ GenBank (www.ncbi.nlm.nih/GenBank)

^{ΙΟ} EMBL - European Molecular Biology Laboratory (www.ebi.ac.uk/embl)

^Κ DDBJ - DNA Data Bank of Japan (www.ddbj.nig.ac.jp)

reagentes e equipamentos utilizados são as principais desvantagens, o que a torna ainda pouco aplicada.

Essa mesma técnica tem sido utilizada para verificar a diversidade bacteriana em pacientes com doença periodontal agressiva^{47,71}, crônica^{71,80} ou necrosante⁷², gengivite⁵², saúde periodontal^{71,78}, abscessos dento alveolares³³, gangrena oral⁷³ (*Cancrum oris*) e gengivite necrosante⁷¹. Embora haja apenas poucos estudos documentados nos quais a clonagem e o sequenciamento da 16S rDNA tenha sido empregada, algumas informações relevantes foram obtidas. No estudo mais abrangente, Paster et al.⁷¹ sugeriram que a microbiota subgengival é composta por cerca de quatrocentas espécies, mas apenas metade delas foram cultivadas. Ainda, um número maior de espécies ou “filotipos” (espécies não reconhecidas ou não cultivadas) foi relacionado a sinais clínicos de saúde ou doença periodontal.

Paster et al.⁷¹ verificaram que determinadas espécies e “filotipos” eram encontradas apenas em pacientes com doença periodontal e não em pacientes com saúde periodontal. Dentre as espécies estavam *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis*, já reportados como patógenos associados à doença periodontal, e outros não, como *Abiotrophia adiascens*, *Filifactor alocis*, *Atopobium rimae* e clones do filo recém-classificado TM7.

Da mesma forma, Hutter et al.⁴⁷ verificaram que espécies como *Treponema socranskii* subsp. *buccale*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* estão associadas à doença periodontal. Sakamoto et al.⁷⁸ verificaram uma grande variedade de microrganismos na saliva de pacientes com “periodontite do adulto”, “periodontite de progressão rápida” e saúde periodontal. Sugeriram que bactérias dos gêneros *Abiotrophia* e *Peptostreptococcus* possam estar relacionadas à doença periodontal pois também foram encontradas somente em amostras de pacientes com periodontite⁷⁸.

Kroes et al.⁵² verificaram, em sítios de um paciente com gengivite, a presença de *Abiotrophia defectiva*, *Gemella haemolysans*, *Lautropia mirabilis* e *Campylobacter concisus*, assim como de alguns clones sem similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados. Em lesões de gangrena oral (*Cancrum oris*), uma doença muito prevalente em alguns países da África, Paster et al.⁷³ verificaram a presença de 67 espécies ou “filotipos”, 25 das quais não cresceram *in vitro*.

Dymock et al.³³ observaram que um tipo de clone encontrado em abscessos dento-alveolares poderia ser uma nova espécie do gênero *Prevotella*, enquanto outros se mostraram relacionados a bactérias Gram-negativas aeróbias nunca detectadas na microbiota oral. Em lesões de periodontite necrosante de pacientes HIV-positivos, Paster

et al.⁷² observaram que *Bulleidia extructa* e espécies ou “filotipos” dos gêneros *Dialister*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* e do filo TM7 foram os mais encontrados. Entretanto, os patógenos periodontais *P. gingivalis* e *T. forsythensis* não foram detectados.

Sakamoto et al.⁸⁰ seqüenciaram, após clonagem, amostras de um paciente com periodontite crônica, antes e três meses após o tratamento periodontal. Observaram que *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium saphenum*, outros clones de *Eubacterium*, *Filifactor alocis*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* estavam presentes antes do tratamento, mas não após, enquanto espécies de *Veillonella* e *Streptococcus* estavam presentes depois, mas não antes da terapia.

Observa-se que uma grande variedade de microrganismos é identificada, muitos até então nunca descritos ou considerados sem relação com os tipos de doenças periodontais^{47,48,52,71,78}. Isso possibilita que esses microrganismos sejam posteriormente investigados. A partir das seqüências dos novos microrganismos identificados, seqüências de oligonucleotídeos específicos podem ser desenhados para serem utilizados por meio de técnicas de biologia molecular^{17,53,72,79}.

Embora os estudos ainda sejam escassos e o número de amostras avaliadas pequeno, acredita-se que, em um futuro próximo, o método de clonagem e seqüenciamento da 16S rDNA, a partir de amostras clínicas, possa estar mais disponível. Assim poderá se

caracterizar de forma mais precisa quais microrganismos estão envolvidos e qual o seu papel no início e na progressão das doenças periodontais.

Proposição

Os objetivos deste estudo foram avaliar os parâmetros clínicos periodontais e a composição da microbiota subgengival de crianças e adolescentes que utilizam aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis comparados com os de indivíduos da mesma faixa etária que não utilizam esses dispositivos.

Paralelamente, foi avaliada a diversidade bacteriana subgengival de dentes bandados e de dentes utilizados para reter grampos.

Material e Método

➤ Seleção da Amostra

Este foi um estudo transversal, do tipo caso-controle, constituído por 92 pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 6 e 17 anos, selecionados entre aqueles que são atendidos regularmente nas Clínicas de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Foram selecionados 30 pacientes que utilizavam aparelho ortodôntico fixo inferior e superior (Grupo FIX) e 18 que utilizavam aparelho ortodôntico removível superior (Grupo REM) há pelo menos 6 meses. Os aparelhos fixos deveriam conter bandas instaladas nos primeiros molares permanentes e *brackets* colados em pré-molares e dentes anteriores (Figura 1). Os removíveis deveriam conter grampos nos primeiros molares superiores permanentes, tendo sido analisados indivíduos com placa de Hawley ou aparelho extra bucal removível. Estes aparelhos contém uma base de acrílico que recobre o palato duro, retida por grampos de Adams nos primeiros molares permanentes, e um arco vestibular anterior (Figura 2).



FIGURA 1 - Aparelho ortodôntico fixo com bandas instaladas nos primeiros molares permanentes e *brackets* colados em pré-molares e dentes anteriores

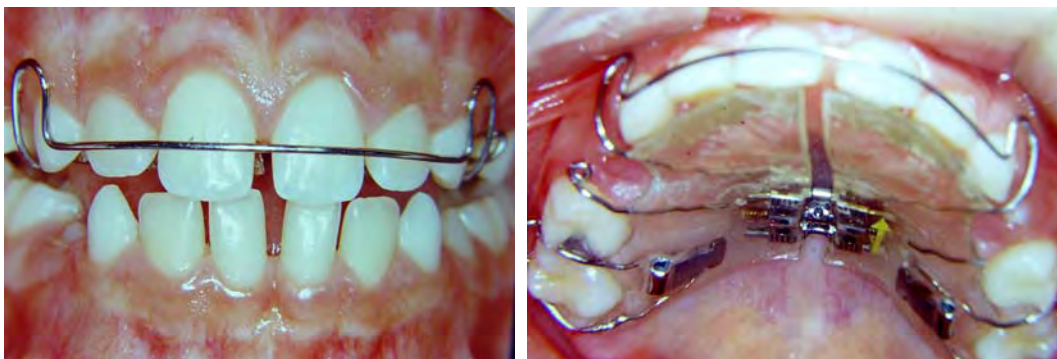


FIGURA 2 - Aparelho ortodôntico removível. Presença do arco anterior e dos grampos de retenção nos primeiros molares permanentes superiores

Dois grupos controle (Grupos C-FIX e C-REM) foram formados com o mesmo número e por indivíduos com a mesma idade de seus respectivos grupos teste (Grupos FIX e REM) e deveriam apresentar média menor ou igual a 30% dos sítios periodontais com sangramento marginal.

Os indivíduos não deveriam ser fumantes, ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses, antibioticoterapia nos

últimos três meses, apresentar doenças periodontais agudas, alterações sistêmicas que interferissem nas condições periodontais, utilizar medicamentos associados ao crescimento gengival, anticoncepcionais ou estar em períodos de gravidez ou lactação. Ainda, não deveriam apresentar cárie cervical ou qualquer tipo de prótese. O tipo de maloclusão não foi utilizado como critério de seleção.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Todos os indivíduos e responsáveis foram informados sobre os propósitos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Apêndice A).

➤ **Procedimentos Clínicos**

O exame clínico foi realizado em todos os dentes presentes exceto nos terceiros molares. Consistiu na avaliação dos seguintes parâmetros:

- Índice de Placa (LÖE⁵⁹, 1967);
- Índice Gengival (LÖE⁵⁹, 1967);
- sangramento à sondagem;
- profundidade de sondagem, que foi o valor obtido a partir da margem gengival até o fundo do sítio periodontal e
- nível de inserção clínico, que foi o valor obtido a partir da junção cimento-esmalte até o fundo do sítio periodontal.

Os dados obtidos com os Índices de Placa e Gengival foram, respectivamente, dicotomizados em ausência (escores 0 e 1) e presença de placa dentária visível (escores 2 e 3) e em ausência (escores 0 e 1) e presença de sangramento marginal (escores 2 e 3). Esses dados foram distribuídos para análise de acordo com a porcentagem de sítios com presença de placa dentária visível e de sangramento marginal, respectivamente.

Os parâmetros clínicos profundidade de sondagem e nível de inserção clínico foram examinados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual), exceto nos portadores de aparelho fixo, nos quais o sítio vestibular não foi mensurado. Medidas do nível de inserção clínico não foram realizadas em dentes com bandas ortodônticas, uma vez que, na maioria das vezes, foram instaladas intra-sulcularmente, o que inviabilizou a mensuração.

O exame clínico periodontal foi realizado por um examinador, previamente calibrado (Apêndice B), com a utilização da sonda periodontal PCP-UNC 15^γ.

^γ Hu-Friedy Mfg. Co. Inc. - Chicago, IL - EUA.

➤ **Procedimentos Microbiológicos**

Coleta das Amostras

Previamente à coleta, a placa bacteriana supragengival foi removida e a área isolada com roletes de algodão estéreis. Amostras de placa bacteriana subgengival foram coletadas com a inserção de um cone de papel estéril^o (tamanho 35 ou 40) no sítio mais profundo de cada dente selecionado por 20 segundos. Nos pacientes que utilizavam aparelhos fixos, foram coletadas de 4 dentes com bandas ortodônticas (primeiros molares permanentes - Grupo B) e de 4 dentes permanentes sem as mesmas e com *brackets* ortodônticos colados (Grupo BK). Nos pacientes que utilizavam aparelhos removíveis, foram coletadas de dentes utilizados para reter seus grampos (primeiros molares superiores permanentes - Grupo G) e 4 outros dentes permanentes (grupo NG). Nos pacientes dos grupos controle (C-FIX e C-REM), as amostras foram coletadas de 4 dentes permanentes.

Nos Grupos BK, NG, C-FIX e C-REM, os dentes também foram selecionados de acordo com a maior profundidade de sondagem apresentada. Nos grupos controle, quando fosse observada igualdade nessa medida, as amostras eram coletadas de primeiros molares e incisivos centrais permanentes.

Após a coleta, as amostras de cada grupo foram agrupadas e imersas em microtubos contendo 1 mL de solução de Ringer (Apêndice

^o Endopoints Indústria e Comércio Ltda. Paraíba do Sul, RJ - Brasil

C) e armazenados sob temperatura de -70°C. Quando finalizados os procedimentos de coleta, os microtubos foram enviados, acondicionados em gelo seco, ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Oral da *State University of New York at Buffalo* - EUA.

Avaliação Microbiológica

As amostras foram avaliadas por meio de sondas de oligonucleotídeos específicas, oriundas de seqüências da região 16S do DNA ribossômico (16S rDNA) e por meio da clonagem e do seqüenciamento da 16S rDNA.

As sondas de oligonucleotídeos foram utilizadas para avaliar a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Capnocytophaga* sp., *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, espiroquetas, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ss. *vincentii*, *Micromonas micros*, *Neisseriaceae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema* sp. As seqüências das sondas de oligonucleotídeos^α e suas respectivas referências estão dispostas na Tabela 1.

^α Invitrogen Life Technologies. Carlsbad, CA - EUA

TABELA 1 - Sequência de oligonucleotídeos dos microorganismos investigados e respectivas referências.

MICROORGANISMOS	SEQUÊNCIA (5' - 3')
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ³⁴	CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GCC
<i>C. rectus</i> ²¹	CAA GCT ACT TAA TCT CCG TTC GAC
<i>Capnocytophaga</i> sp. ²¹	CCC ATT TAA ACC TTG GTA AGG TTC C
<i>E. corrodens</i> ²¹	ACC GTC AGC AAA AAG TGG TAT TAG CAC
<i>F. nucleatum</i> ²¹	GGT TTC CCC GAA GGG ACA TGA AAC
Espiroquetas ²¹	CGA CTT TGC ATG STT AAR AC
<i>F. vincentii</i> ²¹	ACT TCA CAG CTT TGC GAC TCT CTG TTC
<i>M. micros</i> ¹⁸	AGC CCT TCT TAC ACC GAT AAA TCT
Neisseriaceae ²¹	CCT CTG TAC CGA CCA TTG TAT GAC
<i>P. gingivalis</i> ²¹	GCA GTT TCA ACG GCA GGG CTG AAC G
<i>P. intermedia</i> ³¹	GGT CCT TAT TCG AAG GGT AAA TGC
<i>Treponema</i> sp. ¹⁸	GGC AGT AGG GGT TGC GCT CGT T
<i>T. forsythensis</i> ³¹	CGT ATC TCA TTT TAT TCC CCT GTA

Extração e Amplificação do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se a matriz de extração de DNA InstaGene™^Ψ (Apêndice D). A 16S rDNA foi amplificada através da reação da cadeia de polimerase (PCR), como descrita previamente⁴³ (Apêndice E).

Hibridização

Aos 50 µL do produto obtido com a PCR, foram adicionados 50 µL de solução de desnaturação (Apêndice C), em seguida submetidos a aquecimento a 100°C por 3 minutos. Finalmente, foram adicionados 50 µL de solução de neutralização (Apêndice C).

Dez microlitros da solução final foram aplicados, sob vácuo, com o uso de dispositivos apropriados^η, em membranas de *nylon* carregadas positivamente^ζ (Figura 3). As membranas foram então colocadas em uma câmara de vácuo e incubadas a 80°C por 2 horas, e submetidas a banho em solução pré-hibridizante (Apêndice C) a 45°C por 2 horas.

As sondas de oligonucleotídeos foram marcadas com digoxigenina (Apêndice F), diluídas em solução pré-hibridizante e

^Ψ Bio-Rad Laboratories. Hercules, CA - EUA

^η Bio-Dot Apparatus - Bio-Rad Laboratories. Hercules, CA - EUA

^ζ Nylon Membranes Positively Charged - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

utilizadas para hibridizar as membranas por um período de 12 horas sob temperatura de 45°C.

Após lavagens sucessivas com soluções salinas e soluções tampão, as membranas foram imersas em solução de anticorpos para digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina[†] e em solução corante (Apêndices C e G). Quando da presença do DNA do microrganismo investigado na membrana, sinais visuais são produzidos pela precipitação da solução corante reagindo com a fosfatase alcalina. Desta forma, a presença ou ausência de sinais visuais na membrana indicam, respectivamente, a presença ou ausência dos microrganismos investigados (Figura 4). Previamente, com a utilização de cepas de alguns dos microrganismos investigados, as sondas foram ajustadas para detectar pelo menos 10³ células.

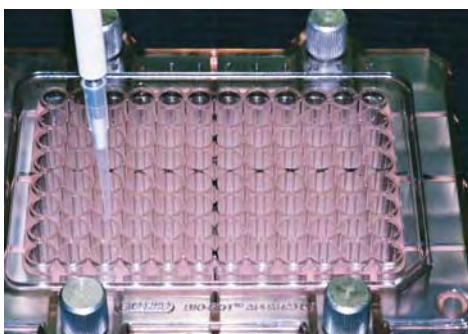


FIGURA 3 - Dispositivo utilizado para aplicação do DNA nas membranas de *nylon*

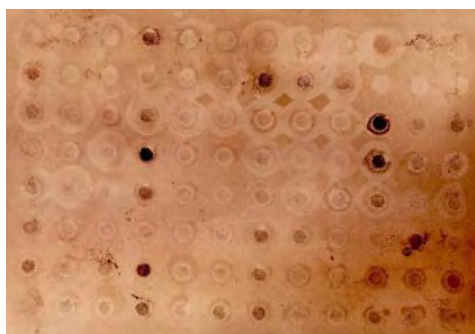


FIGURA 4 - Membrana após processos de hibridização e visualização

[†]Anti-Digoxigenin-AP - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

Clonagem e Seqüenciamento da 16S rDNA

Para avaliar a diversidade bacteriana subgingival duas amostras, uma obtida de dentes bandados (Grupo B) e outra de dentes utilizados para reter grampos (Grupo G), foram escolhidas de acordo com a maior profundidade de sondagem e a presença de sangramento marginal.

A partir de cada amostra, o DNA foi extraído (Apêndice D) e a 16S rDNA amplificada através da PCR⁴³ (Apêndice E). Os produtos obtidos foram purificados^θ e clonados^Ω em *Escherichia coli* (Apêndice H). Cinquenta clones foram aleatoriamente escolhidos e, após crescimento por 12 horas, a 37°C, em caldo de Luria-Bertani^κ (LB), os plasmídeos foram isolados^λ e sequenciados^π.

A identificação das seqüências foi realizada por meio do *software* NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) de acordo com a maior semelhança entre as seqüências obtidas e as disponíveis na base de dados.

^θ High Pure PCR Product Purification Kit - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

^Ω TA Cloning[®] Kit - Invitrogen Life Technologies. Carlsbad, CA - EUA

^κ Sigma Aldrich. St. Louis, MO - EUA

^λ QIAprep Spin Miniprep Kit - QIAGEN Inc. Valencia, CA - EUA

^π Roswell Park Cancer Institute. Buffalo, NY - EUA

➤ **Análise Estatística**

Todos os dados clínicos obtidos foram submetidos ao Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação desses dados entre os grupos, foram utilizados o Teste *t* não-pareado, quando os dados apresentavam normalidade, ou o Teste de *Mann-Whitney*, quando os dados não apresentavam normalidade.

Para comparar a presença dos grupos bacterianos ou bactérias avaliadas entre o Grupo FIX e seu controle (C-FIX) e entre os grupos B e BK, foi utilizado o Teste do *Quiquadrado*. Analogamente, para comparar a presença dos mesmos entre o grupo REM e seu controle (C-REM) e entre os grupos G e NG, foi utilizado o Teste *Exato de Fisher*.

Em todos os procedimentos, adotou-se um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada. A análise dos dados foi realizada com a utilização dos *softwares* GraphPad Prism^ω e NCSS^δ.

^ω Graph Pad Software Inc. San Diego, CA - EUA

^δ NCSS Statistical Software. Kaysville, UT - EUA

Resultado

➤ Descrição da Amostra

A distribuição dos dados relativos a idade e sexo dos participantes deste estudo está apresentada na Tabela 2. Quatro indivíduos participaram dos dois grupos controle (C-FIX e C-REM).

TABELA 2 - Distribuição por idade, sexo e raça dos participantes do estudo

	FIX	C-FIX	REM	C-REM
N	30	30	18	18
Idade	14,5 ± 1,7	14,2 ± 1,7	9,6 ± 1,5	9,3 ± 1,9
Sexo	16 m / 14 f	14 m / 16 f	10 m / 8 f	10 m / 8 f
Raça	24 b / 2 m / 4 n	29 b / 1n	15 b / 2 m / 1 n	16 b / 2 n

FIX - pacientes com aparelho fixo

C-FIX - grupo controle / fixo

REM - pacientes com aparelho removível

C-REM - grupo controle / removível

Idade em anos

m - sexo masculino, f - sexo feminino

b - branco, m - mulato, n - negro

➤ Parâmetros Clínicos

Os parâmetros clínicos avaliados referentes ao Índice de Placa, Índice Gengival e à profundidade de sondagem estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, de acordo com o grupo teste e seu

respectivo grupo controle. Os números absolutos estão disponíveis nos Apêndice I. Excetuando-se os casos isolados de recessão gengival em seis pacientes dos grupos teste e quatro dos grupos controle, não foi detectada perda de inserção clínica. Como não foram encontradas bolsas periodontais associadas à perda de inserção clínica, o Índice Gengival foi considerado como medida de sangramento à sondagem.

A profundidade de sondagem apresentada refere-se a todos os sítios mensurados nos dentes bandados (primeiros molares permanentes) ou utilizados para reter grampo (primeiros molares superiores permanentes) e seus análogos nos seus respectivos grupos controle.

TABELA 3 - Distribuição dos parâmetros clínicos periodontais dos Grupos FIX e C-FIX.

	FIX	C-FIX
IP	66,8% ± 29,6%	47,7% ± 32,3%
IG	43,0% ± 16,5%	15,6% ± 11,0%
IP / 1 ^{os} MP	80,3% ± 30,7%	58,8% ± 35,9%
IG / 1 ^{os} MP	64,3% ± 24,2%	20,6% ± 17,1%
PS / 1 ^{os} MP	2,9 mm ± 0,3 mm	2,5 mm ± 0,5 mm

IP - Índice de Placa

IG - Índice Gengival

PS - profundidade de sondagem

MP - molares permanentes

Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos FIX e C-FIX para todos os parâmetros clínicos avaliados, como observada nos Gráficos 1 e 2.

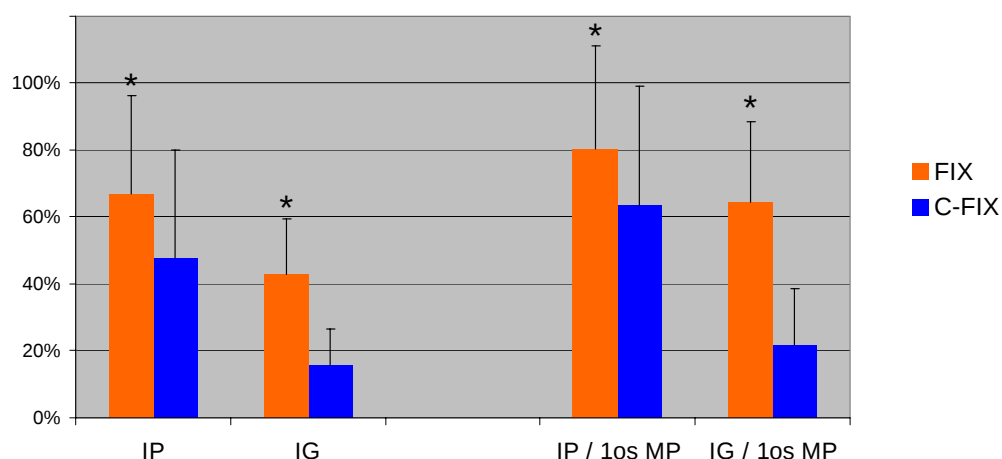


GRÁFICO 1 - Apresentação gráfica dos valores de IP e IG dos Grupos FIX e C-FIX (* - estatisticamente significativa - $p < 0,05$).

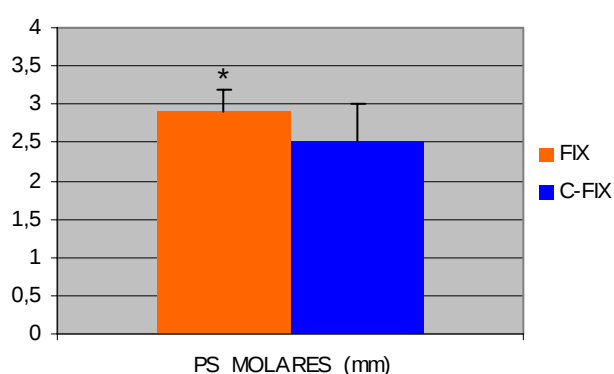


GRÁFICO 2 - Apresentação gráfica dos valores de PS dos primeiros molares permanentes Grupos FIX e C-FIX (* - estatisticamente significativa - $p < 0,05$).

TABELA 4 - Distribuição dos parâmetros clínicos periodontais dos Grupos REM e C-REM.

	REM	C-REM
IP	58,7% ± 29,2%	14,3% ± 12,5%
IG	19,8% ± 14,5%	8,8% ± 6,2%
IP / 1 ^{os} MPS	77,8% ± 28,0%	31,3% ± 34,4%
IG / 1 ^{os} MPS	30,6% ± 30,4%	13,9% ± 18,1%
PS / 1 ^{os} MPS	2,3 mm ± 0,3 mm	2,3 mm ± 0,3 mm

IP - Índice de Placa

IG - Índice Gengival

PS - profundidade de sondagem

MPS - molares superiores permanentes

Quando se comparou os Grupos REM e C-REM, verificou-se diferenças estatisticamente significantes para os parâmetros IP, tanto em relação a toda a arcada dentária como em relação apenas aos dentes utilizados para reter grampos e seus análogos do Grupo C-REM. O parâmetro IG apresentou uma diferença estatisticamente significativa apenas quando se comparou toda a arcada. Não foi observada diferença significativa na profundidade de sondagem dos primeiros molares superiores permanentes entre os dois grupos (Gráficos 3 e 4).

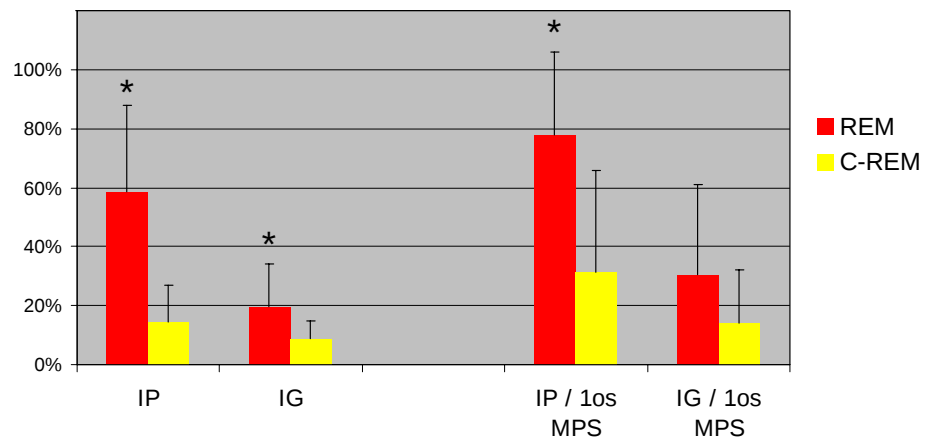


GRÁFICO 3 - Apresentação gráfica dos valores de IP e IG dos Grupos REM e C-REM (*estatisticamente significativa - $p < 0,05$).

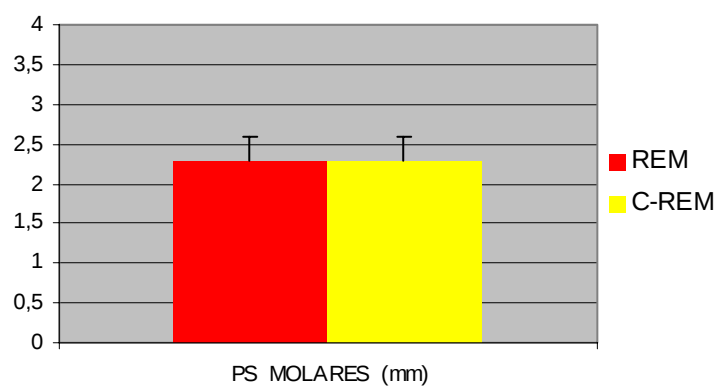


GRÁFICO 4 - Apresentação gráfica dos valores de PS dos primeiros molares superiores permanentes dos Grupos REM e C-REM

➤ Parâmetros Microbiológicos

Os dados da Tabela 5 e do Gráfico 5 apresentam os valores da profundidade de sondagem média e os da maior profundidade de sondagem dos sítios coletados para análise microbiológica dos Grupos FIX e C-FIX. O Grupo FIX foi representado pelas maiores profundidades de sondagem encontradas nos Grupos B e BK. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as profundidades de sondagem médias e do maior sítio coletado dos indivíduos dos Grupos FIX e C-FIX, mas não entre as dos Grupos B e BK.

TABELA 5 - Distribuição da PS média e do maior sítio coletado nos Grupos B, NB, FIX e C-FIX

GRUPO	SÍTIOS COLETADOS (MAIOR PS)	SÍTIOS COLETADOS (PS MÉDIA)
B	4,1 mm $\pm$ 0,7 mm	3,6 mm $\pm$ 0,4 mm
BK	4,1 mm $\pm$ 0,9 mm	3,6 mm $\pm$ 0,7 mm
FIX	4,4 mm $\pm$ 0,7 mm	3,6 mm $\pm$ 0,5 mm
C-FIX	3,7 mm $\pm$ 1,0 mm	3,2 mm $\pm$ 0,9 mm

B - dentes bandados

BK - dentes com *brackets*

FIX - dentes bandados e com *brackets* (B e BK)

C-FIX - grupo controle / fixo

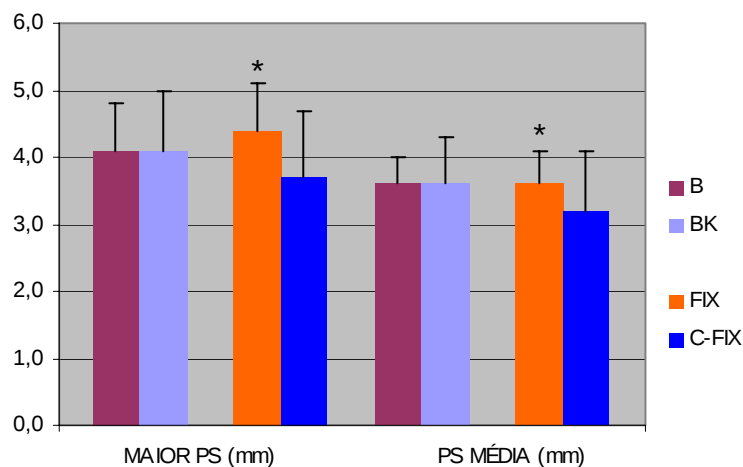


GRÁFICO 5 - Representação gráfica da PS média e do maior sítio coletado nos Grupos B, BK, FIX e C-FIX (*- estatisticamente significante - $p < 0,05$).

Da mesma forma, os dados da Tabela 6 e do Gráfico 6 apresentam os valores da profundidade de sondagem média e os da maior profundidade de sondagem dos sítios coletados para análise microbiológica dos Grupos REM e C-REM. O Grupo REM foi representado pelas maiores profundidades de sondagem encontradas nos Grupos G e NG. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os Grupos REM e C-REM nem entre os Grupos G e NG.

TABELA 6 - Distribuição da PS média e do maior sítio coletado nos Grupos G, NG, REM e C-REM.

GRUPO	SÍTIOS COLETADOS (MAIOR PS)	SÍTIOS COLETADOS (PS MÉDIA)
G	3,0 mm $\pm$ 0,8 mm	2,6 mm $\pm$ 0,5 mm
NG	2,8 mm $\pm$ 0,4 mm	2,5 mm $\pm$ 0,4 mm
REM	3,2 mm $\pm$ 0,5 mm	2,5 mm $\pm$ 0,3 mm
C-REM	2,9 mm $\pm$ 0,4 mm	2,6 mm $\pm$ 0,4 mm

G - dentes utilizados para reter grampos

NG - dentes permanentes sem grampos

REM - dentes utilizados para reter grampos (G e NG)

C-REM - grupo controle / removível

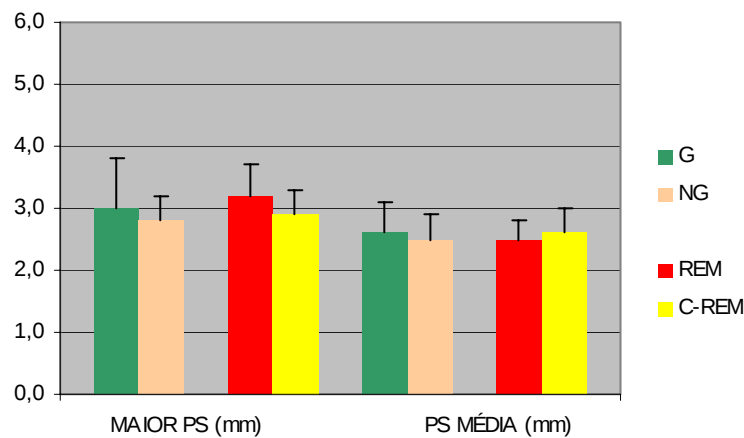


GRÁFICO 6 - Representação gráfica da PS média e do maior sítio coletado nos Grupos G, NG, REM e C-REM.

Análise Microbiana

Comparou-se a prevalência bacteriana entre indivíduos dos grupos teste e dos respectivos grupos controle e, dentro dos grupos teste, entre dentes bandados e com *brackets* (B x BK) e utilizados e não utilizados para reter grampos (G x NG). Quando da avaliação entre indivíduos, foram consideradas a prevalência nos grupos teste, as prevalências bacterianas nos sítios B e BK para o Grupo FIX e nos sítios G e NG para o Grupo REM.

Na Tabela 7 está apresentada a prevalência bacteriana dos sítios dos Grupos B e BK e dos indivíduos dos Grupos FIX e C-FIX.

No Gráfico 7 está representada a prevalência bacteriana nos Grupos FIX e C-FIX. Houve diferença estatisticamente significativa entre as prevalências de todos os microrganismos avaliados, exceto para os da

família *Neisseriaceae*. As prevalências nos Grupos B e BK estão representadas no Gráfico 8. Não foi verificada diferença significativa entre essas prevalências para nenhuma das bactérias investigadas.

TABELA 7 - Prevalência bacteriana nos Grupos B, BK, FIX e C-FIX

BACTÉRIAS	B	BK	FIX	C-FIX
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	47%	43%	70%	23%
<i>C. rectus</i>	83%	77%	87%	50%
<i>Capnocytophaga</i> sp.	60%	63%	80%	37%
<i>E. corrodens</i>	47%	43%	67%	37%
Espiroquetas	50%	40%	70%	17%
<i>F. nucleatum</i>	70%	53%	83%	37%
<i>F. vincentii</i>	67%	57%	83%	30%
<i>M. micros</i>	60%	60%	77%	33%
<i>Neisseriaceae</i>	53%	60%	80%	57%
<i>P. gingivalis</i>	70%	57%	87%	47%
<i>P. intermedia</i>	50%	40%	70%	40%
<i>T. forsythensis</i>	70%	57%	83%	40%
<i>Treponema</i> sp.	53%	30%	73%	23%

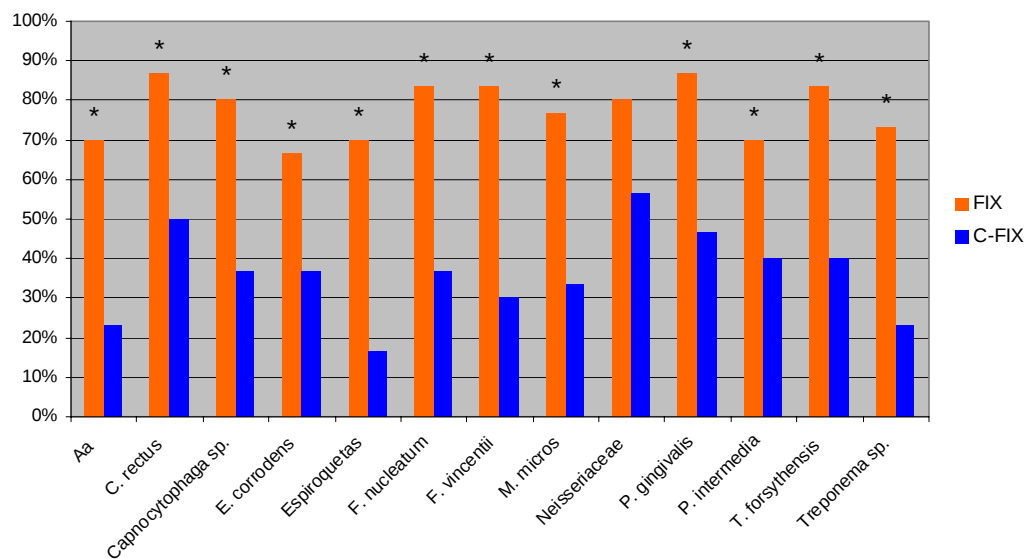


GRÁFICO 7 - Representação gráfica da prevalência bacteriana nos Grupos FIX e C-FIX (*estatisticamente significante - $p < 0,05$).

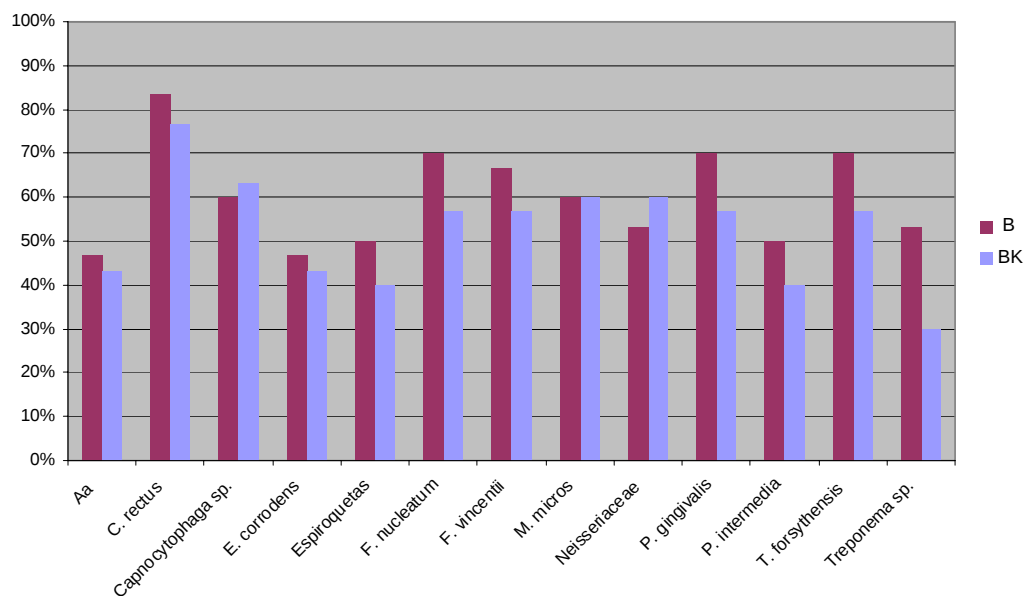


GRÁFICO 8 - Representação gráfica da prevalência bacteriana nos Grupos B e BK (*estatisticamente significante - $p < 0,05$).

A Tabela 8 apresenta a prevalência bacteriana dos sítios dos Grupos G e NG e dos indivíduos dos Grupos REM e C-REM.

TABELA 8 - Prevalência bacteriana nos Grupos G, NG, REM e C-REM

BACTÉRIAS	G	NG	REM	C-REM
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	50%	72%	89%	28%
<i>C. rectus</i>	50%	39%	72%	33%
<i>Capnocytophaga</i> sp.	22%	17%	22%	28%
<i>E. corrodens</i>	67%	72%	83%	39%
Espiroquetas	39%	33%	67%	22%
<i>F. nucleatum</i>	50%	61%	67%	44%
<i>F. vincentii</i>	39%	50%	56%	44%
<i>M. micros</i>	39%	33%	50%	22%
<i>Neisseriaceae</i>	33%	72%	72%	28%
<i>P. gingivalis</i>	28%	44%	50%	33%
<i>P. intermedia</i>	56%	39%	56%	39%
<i>T. forsythensis</i>	33%	39%	50%	22%
<i>Treponema</i> sp.	17%	11%	28%	22%

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *Neisseriaceae*, *E. corrodens* e espiroquetas entre os Grupos REM e C-REM (Gráfico 9). Entre os Grupos G e NG foi encontrada diferença

significante apenas para a prevalência da família *Neisseriaceae* (Gráfico 10).

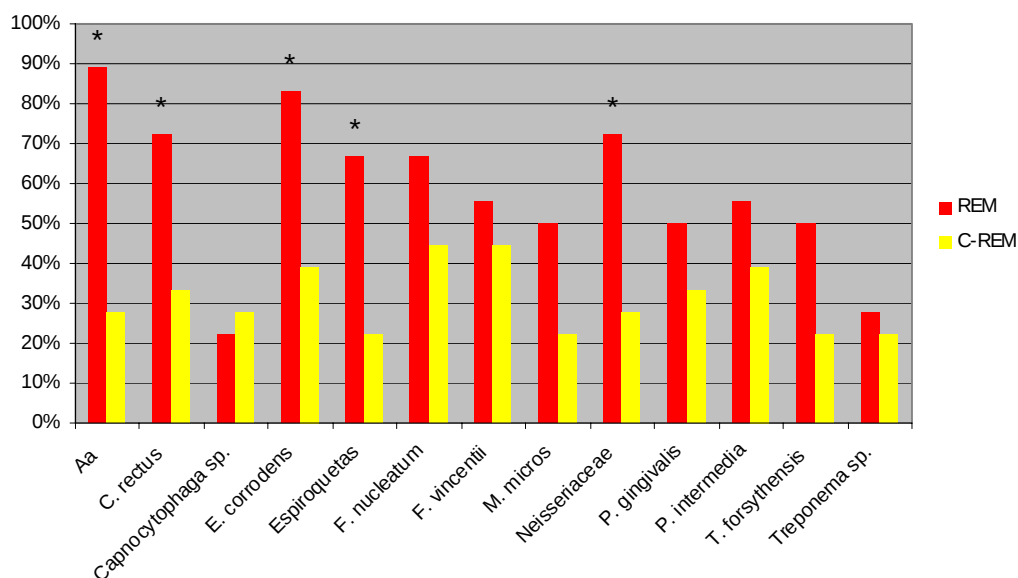


GRÁFICO 9 - Representação gráfica da prevalência bacteriana nos Grupos REM e C-REM (*estatisticamente significante $p < 0,05$).

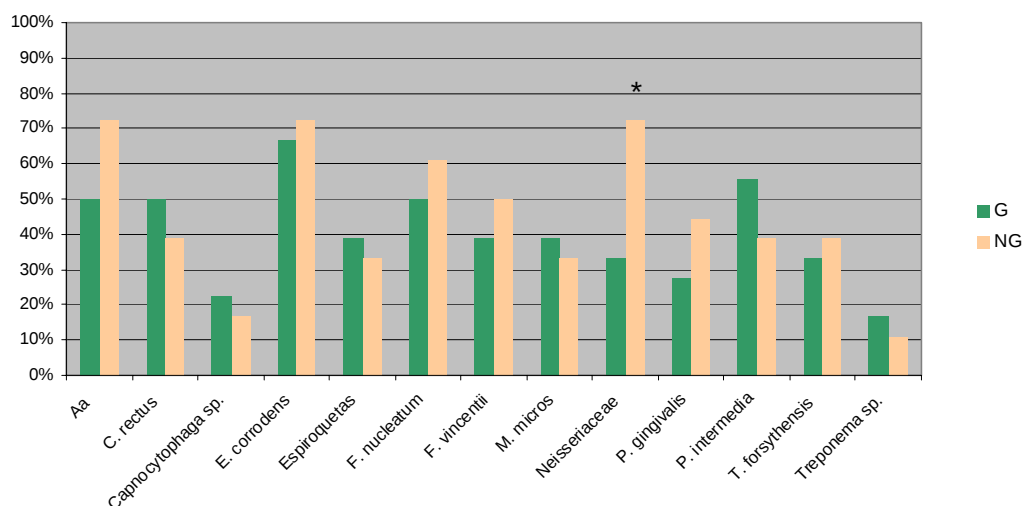


GRÁFICO 10 - Representação gráfica da prevalência bacteriana nos Grupos G e NG (*estatisticamente significante - $p < 0,05$).

Clonagem e Seqüenciamento da 16S rDNA

As Tabelas 9 e 10 apresentam, respectivamente, os resultados obtidos com o seqüenciamento dos clones de uma amostra coletada de dentes bandados e de uma de dentes utilizados para reter grampos.

TABELA 9 – Identificação dos clones obtidos de uma amostra de dentes bandados

BACTÉRIA OU “FILOTIPO”	n	%
<i>Actinomyces</i> sp.	1	2%
<i>Bacteroides</i> cf. <i>forsythus</i> oral clone BU063	3	6%
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1	2%
<i>Eikenella corrodens</i>	2	4%
<i>Eikenella</i> sp.	1	2%
<i>Fusobacterium alocis</i>	1	2%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5	10%
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss. <i>vincentii</i>	3	6%
<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone BS011	1	2%
<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone CZ006	1	2%
<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone EU021	4	8%
<i>Gemella haemolysans</i>	1	2%
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	1	2%
<i>Lautropia</i> sp. oral clone AP009	1	2%
<i>Leptotrichia buccalis</i>	1	2%
<i>Leptotrichia hofstadii</i>	1	2%
<i>Mycoplasma faucium</i>	1	2%
<i>Neisseria flava</i>	8	16%
<i>Neisseria pharyngis</i>	1	2%
<i>Porphyromonas</i> sp. oral clone BS077	2	4%
<i>Prevotella denticola</i>	1	2%
<i>Prevotella</i> sp. cepa oral B31FD	1	2%
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	2%
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	2%
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	2%
<i>Streptococcus mitis</i> bv2	1	2%
<i>Treponema genomosp.</i>	1	2%
<i>Treponema</i> sp.	3	6%
TOTAL	50	100%

TABELA 10 - Identificação de clones obtidos de uma amostra de dentes utilizados para reter grampos

BACTÉRIA OU “FILOTIPO”	n	%
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1	2%
bacteria não cultivada	1	2%
bacteria não cultivada <i>inhufec A-1</i>	1	2%
Bacteria da divisão TM7 (candidata)	1	2%
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1	2%
<i>Capnocytophaga</i> sp. P1 oral clone P4GA	1	2%
Cocos gram - / <i>Proteobacterium</i>	3	6%
<i>Eubacterium</i> sp. oral clone EW053	1	2%
<i>Eubacterium</i> sp.	1	2%
<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	1	2%
<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone BS011	1	2%
<i>Haemophilus segnis</i>	4	8%
<i>Haemophilus</i> sp. oral clone JM053	3	6%
<i>Leptotrichia</i> sp. oral clone BU064	1	2%
<i>Leptotrichia</i> sp. oral clone DR011	1	2%
<i>Neisseria flava</i>	3	6%
<i>Neisseria genomosp.</i> P1	1	2%
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	2%
<i>Neisseria pharyngis</i>	1	2%
<i>Neisseria sicca</i>	1	2%
<i>Porphyromonas</i> sp. oral clone BS077	1	2%
<i>Porphyromonas</i> sp. oral clone DP023	3	6%
<i>Porphyromonas</i> sp. oral clone EP003	1	2%
<i>Prevotella oris</i>	2	4%
<i>Prevotella</i> sp. cepa oral B31FD	1	2%
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	2%
<i>Streptococcus</i> sp. oral clone BM035	7	14%
<i>Terrahaemophilus aromaticivorans</i>	2	4%
<i>Fusobacterium</i> sp. não cultivada	2	4%
<i>Veillonella</i> sp. oral clone AA050	1	2%
TOTAL	50	100%

Discussão

Esse estudo procurou verificar se existiam alterações nos parâmetros clínicos e na microbiota subgengival entre crianças e adolescentes sob terapia ortodôntica com aparelhos fixos ou removíveis e indivíduos da mesma idade, sem aparelhos e com níveis aceitáveis de higiene oral ou com gengivite leve³⁶.

Foi verificado que indivíduos com aparelhos ortodônticos fixos apresentavam maior presença de placa visível e maior sangramento marginal do que indivíduos do grupo controle. Isto é condizente com os achados de outros autores^{3,29,50,62,82,95}. Quando comparados apenas os dentes bandados (primeiros molares permanentes) com seus análogos no grupo controle, verificou-se maior acúmulo de placa e maior sangramento marginal, assim como já publicado^{29,68,95}. Também foi observado aumento da profundidade de sondagem, mas como relatado em outros estudos^{29,45,50,95}, isto foi devido à hiperplasia gengival, já que não foi detectada perda de inserção clínica associada ao aumento da profundidade de sondagem em nenhum indivíduo.

Por outro lado, em alguns estudos não foram observadas diferenças nos parâmetros clínicos periodontais durante o tratamento ortodôntico com aparelhos fixos^{4,12,45,76}. Essa falta de diferença pode ser atribuída a um melhor controle de higiene por parte dos participantes desses estudos em relação aos de outros^{4,76} ou a métodos mais rigorosos de higiene oral empregados^{12,45}. Boyd¹² observou que crianças e

adolescentes com aparelhos fixos submetidos a reforço de instrução de higiene oral mensal e uso de evidenciadores de placa na higiene diária, apresentavam menos inflamação gengival do que os que não foram submetidos a essa rotina. Huber et al.⁴⁵ observaram menor acúmulo de placa e menos inflamação gengival ao longo do tratamento com aparelhos fixos em pacientes submetidos a profilaxia profissional e instrução de higiene oral mensal. Com isso pode-se sugerir que não apenas a mera presença dos aparelhos, mas esta presença associada à falta de um adequado controle de higiene por parte do paciente são responsáveis pela piora dos parâmetros clínicos periodontais. É válido ressaltar que, até a introdução da colagem direta de *brackets*, os aparelhos ortodônticos fixos eram multi-bandados⁹⁴, o que dificultava ainda mais a higiene e favorecia as alterações nesses parâmetros.

Em relação à microbiota subgengival, foram observadas diferenças significantes entre as prevalências de *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* sp., *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *F. vincentii*, *M. micros*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* e *Treponema* sp. e espiroquetas em indivíduos com aparelhos fixos e indivíduos que não os utilizavam.

Estes achados são semelhantes aos encontrados por outros autores ao analisarem indivíduos da mesma faixa etária com aparelhos fixos^{29,46,67-69,75,76}. Paolantonio et al.⁶⁷⁻⁶⁹ e Perinetti et al.⁷⁵ observaram aumento na prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com

aparelhos fixos e em sítios com *brackets* e bandas ortodônticas. Diamanti-Kipioti et al.²⁹ observaram aumento na prevalência de “bacteroides de pigmentação negra” e Huser et al.⁴⁶, assim como Petti et al.⁷⁶ observaram aumento de espiroquetas. Também foi decrito que *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *F. vincentii* estavam aderidos a *brackets* ortodônticos⁶. Entretanto, Petti et al.⁷⁶ não verificaram alterações na prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* assim como Sinclair et al.⁸² não observaram na de espiroquetas ao longo do tratamento ortodôntico. Speer et al.⁸⁶ verificaram uma diminuição na colonização por *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *M. micros*, mas em pacientes adultos com periodontite que foram submetidos a tratamento periodontal e à terapia ortodôntica com aparelhos fixos.

Existem poucos estudos disponíveis abordando os efeitos da utilização de aparelhos ortodônticos removíveis sobre as condições clínicas e microbiológicas periodontais^{1,7,32,37,74,76}. Neste estudo foram encontradas diferenças significantes entre usuários de aparelhos removíveis e indivíduos que não os utilizavam para a presença de placa visível em toda a arcada e apenas nos dentes retentores de grampos e para sangramento marginal em toda a arcada, mas não nos retentores. A média de profundidade de sondagem nestes dentes foi igual tanto para os indivíduos do grupo teste como para os do controle. Diferente do

observado nos dentes retentores de grampo, dentes bandados apresentaram profundidade de sondagem e sangramento marginal maiores do que as de seus análogos no grupo controle. Mesmo sendo esse aumento na profundidade de sondagem na forma de hiperplasia gengival, pode-se sugerir que as bandas ortodônticas afetam mais o periodonto do que os grampos de retenção. A instalação das bandas intra-sulculamente e a retirada dos aparelhos removíveis para a higienização diária podem explicar esses achados.

É controverso se a utilização de aparelhos removíveis provoca alterações nos parâmetros clínicos periodontais. Petti et al.⁷⁶ não observaram alterações nos Índice de Placa e Gengival nem na profundidade de sondagem. Goultschin e Ziberman³⁷ não observaram alterações nos Índices de Placa e Gengival. Dubey et al.³² verificaram aumento apenas do Índice Gengival, mas não do Índice de Placa. Arendorf e Addy⁷ observaram uma diminuição neste Índice, mas Pender observou aumento nos Índices de Placa e Gengival. Addy¹ e Arendorf e Addy⁷ relataram que as faces palatinas de usuários de aparelho removível superior apresentavam maior acúmulo de placa bacteriana do que as faces vestibulares. Da mesma forma, Pender⁷⁴ observou que isso acontecia em relação ao sangramento gengival, o que não foi observado no presente estudo (dados não apresentados).

Avaliando a microbiota subgengival, Petti et al.⁷⁶ observaram que ocorreu um aumento de espiroquetas após sete meses da instalação

de aparelhos removíveis. Isso é condizente com os achados do presente estudo, no qual foram verificadas diferenças significantes na prevalência desse tipo de microrganismos além de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *C. rectus* e dos da família *Neisseriaceae*.

Embora não tenha sido realizada essa comparação, os indivíduos com aparelhos fixos apresentaram valores dos parâmetros clínicos periodontais maiores do que os com aparelhos removíveis. Isso indica que as bandas e os *brackets* podem ser um fator deletério maior do que os grampos e os arcos dos aparelhos removíveis. Da mesma forma, apresentaram um número maior de espécies ou grupos bacterianos significativamente elevado em relação ao seu respectivo grupo controle.

No presente estudo foram utilizadas sondas de DNA de oligonucleotídeos para análise microbiológica. Dentre os três tipos de sondas, as sondas de oligonucleotídeos são as que apresentam maior especificidade e menos reações cruzadas porque hibridizam regiões específicas de cada espécie^{27,31,61,88}. Altas prevalências bacterianas foram encontradas tanto em indivíduos com aparelhos removíveis como nos com aparelhos fixos. Isso pode ser explicado pelo limite de detecção das sondas de oligonucleotídeos³¹ (em torno de 10^3 células) associado ao fato do DNA alvo ter sido amplificado por PCR previamente à hibridização com as sondas. Uma quantidade pequena de DNA pode ter sido amplificada e assim detectada pelas sondas. Uma das vantagens desse procedimento

prévio é a certeza da presença do material genético a ser hibridizado^{18,43,55}.

Utilizando os mesmos procedimentos, PCR e sondas de oligonucleotídeos, Lee et al.⁵⁵ avaliaram indivíduos adultos coreanos com periodontite agressiva. Em sítios doentes e saudáveis desses indivíduos, encontraram respectivamente altas prevalências de *P. gingivalis* (96,8% e 56,4%), *Treponema* sp. (96,8% e 66,7%), *A. actinomycetemcomitans* (75% e 33%), *T. forsythensis* (94% e 48,7%), *M. micros* (88,9% e 43,6%) e *P. intermedia* (96,8% e 41%). Apesar de os pacientes avaliados neste estudo – crianças e adolescentes com gengivite sob terapia com aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis – possuírem características diferentes, prevalências relativamente altas também foram encontradas 87% e 50% para *P. gingivalis*, 73% e 28% para *Treponema* sp., 70% e 89% para *A. actinomycetemcomitans*, 83% e 50% para *T. forsythensis*, 77% e 50% para *M. micros* e 70% e 56% para *P. intermedia*, respectivamente.

Um fato interessante foi a alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans* encontrada, 89% e 70% em pacientes com aparelhos removíveis e fixos respectivamente. A alta prevalência dessa bactéria em adolescentes e adultos jovens com aparelhos ortodônticos fixos foi relatada em outros estudos^{67-69,75}. A prevalência dessa e de outras bactérias podem variar em diferentes países ou regiões⁹⁶. Colombo et al.²¹, utilizando sondas genômicas de DNA e *checkerboard*,

encontraram uma prevalência de *A. actinomycetemcomitans* de 53% em sítios proximais de brasileiros adultos saudáveis. Numa população semelhante, utilizando PCR, Avila-Campos e Velasquez-Melendez⁹ observaram uma prevalência de 70%. Aos resultados obtidos pelo presente estudo, pode-se acrescentar que existe uma alta prevalência desta bactéria na população brasileira.

Semelhantes aos achados da presente pesquisa, os resultados de outros estudos reportaram a presença de periodontopatógenos em crianças e adolescentes sem sinais clínicos de destruição periodontal. Yang et al.⁹³ detectaram, por meio de sondas genômicas de DNA e *Checkerboard*, a presença de *P. gingivalis* e *T. forsythensis* em 69% e em 29%, respectivamente, de crianças de 18 a 48 meses de idade. Kimura et al.⁴⁹, utilizando PCR, observaram prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens* e *Capnocytophaga* sp. em torno de 50% em crianças de até 12 anos de idade. Utilizando a mesma técnica, Okada et al.⁶⁶ verificaram em crianças de 2 a 12 anos, prevalências de *T. forsythensis* e de *C. rectus* de 63,9% e 100%, respectivamente. Hamlet et al.⁴¹ relataram a presença de *T. forsythensis* em adolescentes com e sem perda de inserção clínica de 86% e 36% respectivamente. Da mesma forma que Hamlet et al.⁴¹, também utilizando PCR, Lammel et al.⁵⁴ observaram, em indivíduos de zero a 18 anos, prevalências de cerca de 48% para *A. actinomycetemcomitans* e 53% para *P. gingivalis* em todas as faixas etárias.

As bactérias avaliadas neste estudo estavam presentes em indivíduos do grupo controle assim como em indivíduos com aparelhos ortodônticos; entretanto, estes últimos, em sua maioria, apresentaram prevalências significativamente maiores. Isto pode ser devido à modificação do ambiente subgengival pelo uso dos aparelhos, o que facilitou o aumento dessas bactérias nesse ambiente. Entretanto, não foi detectada perda de inserção clínica associada a aumento na profundidade de sondagem. Assim, de acordo com as limitações e características da técnica microbiológica empregada, não se pode afirmar que a prevalência aumentada de algumas espécies periodontopatogênicas como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythensis* possa significar um risco maior para o desenvolvimento de um processo de destruição periodontal.

Para análise da diversidade bacteriana, foi realizada a amplificação da 16S rDNA a partir de amostras clínicas seguida de clonagem e seqüenciamento^{17,47,52,71-73,78}. Esse procedimento foi realizado a partir de amostras de placa bacteriana de sítios periodontais de primeiros molares permanentes bandados ou retentores de grampos provenientes de dois pacientes que apresentavam gengivite, um com cada tipo de aparelho.

Com a utilização deste método, uma variedade de microrganismos não cultivados ou não detectados pelas sondas de DNA foi encontrada. Da amostra de dentes retentores de grampo, foi possível

identificar espécies ou “filotipos” como *Abiotrophia defectiva*, *Prevotella oris*, *Terrahaemophilus aromaticivorans* – um clone não presente na cavidade oral –, várias espécies de *Neisseria*, cocos Gram-negativos não cultivados do filo *Proteobacteria*, clones orais do gênero *Porphyromonas* e um “filotipo” candidato a pertencer ao filo recém descrito TM7. Da amostra de dentes bandados, pôde-se observar a presença de *Bacteroides cf. forsythus* - clone oral BU063, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, outros clones orais de *Fusobacterium*, *Gemella haemolysans*, *Lautropia* sp. - clone oral AP009, *Mycoplasma faucium*, *Prevotella denticola*, *Treponema* sp. e vários clones de *Neisseria flava*.

Abiotrophia defectiva foi encontrada por Kroes et al.⁵² em um paciente com gengivite, mas Sakamoto et al.⁷⁸ sugeriram que espécies pertencentes a esse gênero possam estar associadas às periodontites. Paster et al.⁷¹ detectaram essa bactéria somente em pacientes com periodontite crônica ou periodontite “refratária”. Kumar et al.⁵³ observaram a associação de *Prevotella denticola* com periodontite crônica. Paster et al.⁷¹ encontraram *Lautropia* sp. – clone oral AP009 apenas em indivíduos com periodontite “refratária” e *Mycoplasma faucium*, um raro microrganismo encontrado em humanos⁷⁷, apenas em pacientes com periodontite crônica ou “refratária”.

Brinig et al.¹⁴ relataram que bactérias da divisão TM7 estão mais prevalentes em sítios que apresentam periodontite leve do que em sítios saudáveis ou com periodontite severa. Os autores sugeriram a

possibilidade destes microrganismos encontrarem no ambiente de estágios iniciais de doença periodontal requisitos para sua sobrevivência ou que, com a progressão da doença, o ambiente torne-se favorável para a competição de outras espécies, levando a supressão das TM7¹⁴. Como no presente estudo o indivíduo avaliado apresentava gengivite, é possível que estas espécies não sejam necessariamente virulentas ou não estejam presentes em quantidade suficiente para induzir um processo de destruição periodontal. Por outro lado, como foram associadas a doenças periodontais por outros autores podem representar um risco para que isso aconteça.

Em ambos os pacientes, foram detectados clones de espécies de *Leptotrichia* e *Capnocytophaga*, relacionadas à gengivite em crianças¹⁵. Também foi observada uma elevada prevalência (16%) de clones do gênero *Neisseria*. Isto é condizente com os resultados encontrados por meio das sondas de DNA, pelos quais pôde ser observada uma alta prevalência de espécies da família *Neisseriaceae*, da qual também pertencem os gêneros *Kingella* e *Eikenella*. Entretanto a maioria dos clones de *Neisseria* pertencem à espécie *N. flava*, um comensal da orofaringe⁸³. É possível que haja uma predileção por espécies do gênero *Neisseria* nos sítios subgengivais da população estudada. Novos estudos serão necessários para confirmar esta hipótese e verificar sua patogenicidade, pois bactérias desse gênero foram encontradas em pacientes com periodontite “refratária”²⁰.

A alta prevalência encontrada de periodontopatógenos como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythensis*, por meio das sondas de oligonucleotídeos, em indivíduos sem destruição periodontal como os deste estudo, pode ser devida à presença de tipos clonais de baixa virulência⁷⁰. Existem clones de *A. actinomycetemcomitans* que podem produzir dez vezes mais leucotoxina do que outros⁴². *P. gingivalis* apresenta genes *fimA* de tipos distintos associados a saúde ou a doença periodontal^{5,63}. Tipos clonais menos virulentos dessas duas espécies podem ter sido detectados neste estudo. Existe um tipo de *Bacteroides* recém descrito, *Bacteroides cf. forsythus* - clone oral BU063, geneticamente muito próximo a *T. forsythensis*⁷¹. Esse novo tipo está relacionado à saúde periodontal enquanto *T. forsythensis* está à periodontite⁵⁶. O clone BU063 foi encontrado entre clones oriundos de amostras de dentes bandados. Esse achado também pode explicar a alta prevalência de *T. forsythensis* observada por meio das sondas de DNA (83%). As sondas utilizadas são específicas para a 16S rDNA, porém a diferenciação entre o clone BU063 e *T. forsythensis* está presente entre as regiões 16S e 23S do DNA ribossômico⁵⁶. Portanto, existe a possibilidade das sondas detectarem o tipo clonal relacionado à saúde periodontal.

Os resultados obtidos por meio da clonagem da 16S rDNA ainda são deficientes em razão do pequeno número de clones e de pacientes avaliados nesse e em outros estudos^{33,47,52,72,73,78,80}. Como

comentado por Paster et al.⁷¹, para que haja uma associação de espécies ou “filotipos” específicos com as doenças periodontais ou com saúde periodontal, será necessário que se analise várias amostras clínicas em estudos clínicos bem controlados.

Dentro das limitações de um estudo caso-controle como este, pode-se sugerir que tanto os aparelhos removíveis como os fixos atuam, em indivíduos que os utilizam, como fatores modificadores, favorecendo alterações nos parâmetros clínicos periodontais e na microbiota subgengival, pelo menos quando comparados a pacientes periodontalmente mais saudáveis.

Conclusão

- Aparelhos ortodônticos fixos e removíveis estão associados ao maior acúmulo de placa visível e de inflamação gengival em crianças e adolescentes se comparados aos que não os utilizam.
- Dentes bandados apresentaram maior acúmulo de placa visível, inflamação gengival e maior profundidade de sondagem (hiperplasia gengival) do que seus análogos nos indivíduos que não utilizavam aparelhos ortodônticos.
- A utilização de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis está associada a uma maior prevalência de patógenos relacionados às doenças periodontais em crianças e adolescentes quando comparados aos que não os utilizam.
- A utilização da clonagem da região 16S do DNA ribossômico, a partir de amostras clínicas de dentes bandados e retentores de grampo, possibilitou a identificação de espécies e grupos bacterianos não cultivados ou pouco conhecidos.

Referências*

1. ADDY, M. et al. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. **Br. J. Orthod.**, London, v.9, n.3, p.158-163, July 1982.
2. ALBANDAR, J. M.; OLSEN, I. Nucleic acid probes as potential tools in oral microbial epidemiology. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.18, n.2, p.88-94, Apr. 1990.
3. ALEXANDER, S. A. Effects of orthodontic attachments on the gingival health of permanent second molars. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.100, n.4, p.337-340, Oct. 1991.
4. ALSTAD, S.; ZACHRISSON, B. U. Longitudinal study of periodontal condition associated with orthodontic treatment in adolescents. **Am. J. Orthod.**, St. Louis, v.76, n.3, p.277-286, Sept. 1979.
5. AMANO, A., M. et al. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. **J Dent Res**, Chicago, v.79, n.9, p.1664-1668, Sept. 2000.
6. ANHOURY, P. D. et al. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. **Angle Orthod.**, Appleton, v.72, n.4, p.338-343, Aug. 2002.
7. ARENDORF, T.; ADDY, M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.12, n.5, p.360-368, May 1985.
8. ARMITAGE, G. C. Periodontal diseases: diagnosis. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.1, n.1, p.37-215, Nov. 1996.
9. AVILA-CAMPOS, M. J.; VELASQUEZ-MELENDZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.44, n.1, p.1-5, Jan-Feb 2002.
10. BALENSEIFEN, J. W.; MADONIA, J. V. Study of dental plaque in orthodontic patients. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.49, n.2, p.320-324, Mar./Apr. 1970.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NSR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. 2002. 24 p.

11. BLOOM, R. H.; BROWN, L. R. A study of the effects of orthodontic appliances on the oral microbial flora. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.17, p.658-667, May 1964.
12. BOYD, R. L. Longitudinal evaluation of a system for self-monitoring plaque control effectiveness in orthodontic patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.10, n.4, p.380-388, July 1983.
13. BOYD, R. L.; BAUMRIND, S. Periodontal considerations in the use of bonds or bands on molars in adolescents and adults. **Angle Orthod.**, Appleton, v.62, n.2, p.117-126, Summer 1992.
14. BRINIG, M. M. et al. Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.69, n.3, p.1687-1694, Mar. 2003.
15. CALIFANO, J. V. Position paper: periodontal diseases of children and adolescents. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.11, p.1696-1704, Nov. 2003.
16. CHEN, C.; SLOTS, J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.20, p.53-64, June 1999.
17. CHOI, B. K. et al. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, n.5, p.1889-1895, May 1994.
18. CHOI, B. K. et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.9, p.1387-1394, Sept. 2000.
19. CHUBA, P. J. et al. Synthetic oligodeoxynucleotide probes for the rapid detection of bacteria associated with human periodontitis. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.134, p.1931-1938, July 1988.
20. COLOMBO, A. P. et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.25, n.2, p.169-180, Feb. 1998.
21. COLOMBO, A. P. et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n.4, p.360-369, Apr. 2002.

22. CONRADS, G. DNA probes and primers in dental practice. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.35, suppl 1, p.S72-S77, Sept. 2002.
23. CONRADS, G. et al. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. **J. Periodontol.**, Chicago, v.67, n.10, p.994-1003, Oct. 1996.
24. CONRADS, G. et al. DNA-probes for the differentiation of Capnocytophaga species. **Mol. Cell Probes**, London, v.11, n.5, p.323-328, Oct. 1997.
25. DAVIES, T. M. et al. The effect of orthodontic treatment on plaque and gingivitis. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.99, n.2, p.155-161, Feb. 1991.
26. DEMOLON, I. A. et al. Effects of antibiotic treatment on clinical conditions and bacterial growth with guided tissue regeneration. **J. Periodontol.**, Chicago, v.64, n.7, p.609-616, July 1993.
27. DEWHIRST, F. E., PASTER, B. J. DNA Probe analysis for the detection of periodontopathic bacteria in clinical samples. In: HAMADA, S.; HOLT, S. C.; MCGHEE, J. R. **Periodontal disease: pathogens & host immune responses**. Tokyo: Quintessence Pub. Co., 1991. cap. 27, p. 367-378.
28. DEWHIRST, F. E. et al. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n.3, p.196-202, June 2000.
29. DIAMANTI-KIPIOTI, A., GUSBERTI, F. A.; LANG, N. P. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.14, n.6, p.326-333, July 1987.
30. DIEDRICH, P. et al. Effects of orthodontic bands on marginal periodontal tissues. A histologic study on two human specimens. **J. Orofac. Orthop.**, München, v.62, n.2, p.146-156, Mar. 2001.
31. DIX, K. et al. Species-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.2, p.319-323, Feb. 1990.
32. DUBEY, R.; JALILI, V. P.; GARG, S. Oral hygiene and gingival status in orthodontic patients. **J. Pierre Fauchard Acad.**, New Delhi, v.7, n.2, p.43-54, June 1993.

33. DYMOCK, D. et al. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.3, p.537-542, Mar. 1996.
34. ELIADES, T.; ELIADES, G.; BRANTLEY, W. A. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.108, n.4, p.351-360, Oct, 1995.
35. ERICSSON, I. et al. The effect of orthodontic tilting movements on the periodontal tissues of infected and non-infected dentitions in dogs. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.4, n.4, p.278-293. Nov. 1977.
36. GLANS, R.; LARSSON, E.; OGAARD, B. Longitudinal changes in gingival condition in crowded and noncrowded dentitions subjected to fixed orthodontic treatment **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v 124, n.12, p.679-682, Dec. 2003.
37. GOULTSCHIN, J.; ZILBERMAN, Y. Gingival response to removable orthodontic appliances. **Am. J. Orthod.**, St. Louis, v.81, n.2, p.147-149, Feb. 1982
38. GRIFFEN, A. L. et al. Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.11, p.3239-3242, Nov. 1998.
39. HAFFAJEE, A. D. et al. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.19, n.2, p.84-91, Feb. 1992.
40. HAFFAJEE, A. D. et al. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.24, n.5, p.324-334, May 1997.
41. HAMLET, S., R. et al. Persistent colonization with Tannerella forsythensis and loss of attachment in adolescents. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.83, n.3, p.232-235, Mar. 2004.
42. HARASZTHY, V. I. et al. Evidence for the role of highly leukotoxic Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.6, p.912-922, June 2000.

43. HARASZTHY, V. I. et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.10, p.1554-1560, Oct. 2000.
44. HO, H. P.; NIEDERMAN, R. Effectiveness of the Sonicare sonic toothbrush on reduction of plaque, gingivitis, probing pocket depth and subgingival bacteria in adolescent orthodontic patients. **J. Clin. Dent.** Yardley, v.8, n.1 spec., p.15-19, 1997.
45. HUBER, S. J.; VERNINO, A. R.; NANDA, R. S. Professional prophylaxis and its effect on the periodontium of full-banded orthodontic patients. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.91, n.4, p.321-327, Apr. 1987.
46. HUSER, M. C., BAEHNI, P. C.; LANG, R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.97, n.3, p.213-218, Mar. 1990.
47. HUTTER, G., U. et al. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. **Microbiology**, Washington v.149, pt 1, p.67-75, Jan. 2003.
48. KAZOR, C. E. et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.41, n.2, p.558-563, Feb. 2003.
49. KIMURA, S. et al. Periodontopathic bacterial infection in childhood. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n.1, p.20-26, Jan. 2002.
50. KLOEHN, J. S.; J. S. PFEIFER. The effect of orthodontic treatment on the periodontium. **Angle Orthod.**, Appleton, v.44, n.2, p.127-134, Apr. 1974.
51. KNOERNSCHILD, K. L. et al. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.115, n.6, p.634-639, June 1999.
52. KROES, I.; LEPP, P. W.; RELMAN, D. A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v.96, n.25, p.14547-14552, Dec. 1999.
53. KUMAR, P. S. et al. New bacterial species associated with chronic periodontitis. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.82, n.5, p.338-344, May 2003.

54. LAMELL, C. W. et al. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.3, p.1196-1199, Mar. 2000.
55. LEE, J. W. et al. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.9, p.1329-1335, Sept. 2003.
56. LEYS, E. J. et al. Association of *Bacteroides forsythus* and a novel *Bacteroides* phylotype with periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n.3, p.821-825, Mar. 2002.
57. LISTGARTEN, M. A.; WONG, M. Y.; LAI, C. H. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. **J. Periodontol.**, Chicago, v.66, n.2, p.158-164, Feb. 1995.
58. LIU, L. et al. Species-specific DNA probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis* from adult Chinese periodontal patients and healthy subjects. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.7, p.1000-1006, July 2003.
59. LOE, H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. **J. Periodontol.**, Chicago, v.38, n.6, p. 610-616, Nov./Dec, 1967.
60. LOESCHE, W. J. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, n.12, p.1102-1109, Dec. 1992.
61. LOOMER, P. M. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.34, p.49-56, Feb. 2004.
62. LUNDSTROM, F.; HAMP, S. E.; NYMAN, S. Systematic plaque control in children undergoing long-term orthodontic treatment. **Eur. J. Orthod.**, London, v.2, n.1, p.27-39, 1980.
63. MISSAILIDIS, C. G. et al. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.19, n.4, p.224-229, Aug. 2004.

64. MONCLA, B. J. et al. Use of synthetic oligonucleotide DNA probes for the identification of *Bacteroides gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.2, p.324-327, Feb. 1990.
65. MOTER, A. et al. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.5, p.1399-1403, May 1998.
66. OKADA, M.; HAYASHI, F; NAGASAKA, N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.28, n.6, p.576-582, June 2001.
67. PAOLANTONIO, M. et al. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients wearing orthodontic appliances. A cross-sectional study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.2, p.112-118, Feb. 1996.
68. PAOLANTONIO, M. et al. Clinical significance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young individuals during orthodontic treatment. A 3-year longitudinal study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.24, n.9, pt. 1, p.610-617, Sept. 1997.
69. PAOLANTONIO, M. et al. Site-specific subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in orthodontic patients. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.115, n.4, p.423-428, Apr. 1999.
70. PAPAPANOU, P. N. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.7, n.1, p.54-61, Dec. 2002.
71. PASTER, B. J. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.183, n.12, p.3770-3783, June 2001.
72. PASTER, B. J. et al. Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.7, n.1, p.8-16, Dec. 2002.
73. PASTER, B. J. et al. Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n.6, p.2187-2191. June 2002.
74. PENDER, N. Aspects of oral health in orthodontic patients. **Br. J. Orthod.**, London, v.13, n.2, p.95-103, Apr. 1986.

75. PERINETTI, G. et al. Longitudinal monitoring of subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and crevicular alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities around orthodontically treated teeth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.31, n.1, p.60-67, Jan. 2004.
76. PETTI, S.; BARBATO, E; SIMONETTI D'ARCA, A. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. **New Microbiol.**, Pavia, v.20, n.1, p.55-62, Jan. 1997.
77. RAWADI, G., A. et al. Phylogenetic position of rare human mycoplasmas, *Mycoplasma faucium*, *M. buccale*, *M. primatum* and *M. spermatophilum*, based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Reading, v.48, p.305-359, Jan. 1998.
78. SAKAMOTO, M. et al. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v.44, n.8, p.643-652, 2000.
79. SAKAMOTO, M. et al. Detection of novel oral phylotypes associated with periodontitis. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.217, n.1, v. 19, p.65-69, Nov, 2002.
80. SAKAMOTO, M. et al. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 53, n.6, p.563-571, June 2004.
81. SAVITT, E. D.; KEVILLE, M. W.; PEROS, W. J. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.35, Suppl., p.153S-159S, 1990.
82. SINCLAIR, P. M. et al. Changes in gingiva and gingival flora with bonding and banding. **Angle Orthod.**, Appleton, v.57, n.4, p.271-278, Oct. 1987.
83. SMITH, N. H. et al. Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of *argF*, *recA*, *rho*, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v.16, n.6, p.773-783, June 1999.
84. SOCRANSKY, S. S. et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, Natick, v.17, n.4, p.788-792, Oct. 1994.

85. SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen v.25, n.2, p.134-144, Feb. 1998.
86. SPEER, C. et al. Investigations on the influencing of the subgingival microflora in chronic periodontitis. A study in adult patients during fixed appliance therapy. **J. Orofac. Orthop.**, München, v.65, n.1, p.34-47, Jan. 2004.
87. SUKONTAPATIPARK, W. et al. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. **Eur. J. Orthod.**, London, v.23, n.5, p.475-484, Oct. 2001.
88. TANNER, A. et al. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v.5, p.26-51, June 1994.
89. TANNER, A. C. et al. Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.33, n.2, p.105-117, Feb. 1998.
90. TSAI, C. Y. et al. A rapid DNA probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.30, n.1, p.57-62, Jan. 2003.
91. VAN STEENBERGEN, T. J. et al. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.10, p.955-959, Oct. 1996.
92. WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R. B.; GREENE, R. C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.9, p.1942-1946, Sept. 1990.
93. YANG, E. Y. et al. Periodontal pathogen detection in gingiva/tooth and tongue flora samples from 18- to 48-month-old children and periodontal status of their mothers. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.17, n.1, p.55-59, Feb. 2002.
94. ZACHRISSON, B. U. Cause and prevention of injuries to teeth and supporting structures during orthodontic treatment. **Am. J. Orthod.**, St. Louis, v.69, n.3, p.285-300, Mar. 1976.
95. ZACHRISSON, S.; ZACHRISSON, B. U. Gingival condition associated with orthodontic treatment. **Angle Orthod.**, Appleton, v.42, n.1, p.26-34, Jan. 1972.

96. ZAMBON, J. J. Periodontal diseases: microbial factors. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.1, n.1, p.879-925. Nov. 1996.
97. ZAMBON, J. J.; HARASZTHY, V. I. The laboratory diagnosis of periodontal infections. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.7, p.69-82. Feb. 1995.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu _____ brasileiro,

nascido em ____/____/____, portador do RG nº _____ residente a _____

_____, na cidade de _____ Estado de _____, na qualidade de _____

brasileiro, nascido em ____/____/____, portador do RG nº _____ residente à _____ na cidade de _____

Estado de _____, concordo na sua participação voluntária na pesquisa:

“Avaliação clínica e microbiológica periodontal de pacientes sob terapia ortodôntica com aparelhos fixos e removíveis” e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem dúvidas sobre a sua participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Fui esclarecido que a referida pesquisa tem como objetivo analisar as condições clínicas periodontais e a presença de bactérias periodontopatogênicas em diferentes nichos de sua boca. Para tanto, ele/ela será submetido a exame clínico e será feita a coleta de placa bacteriana em alguns dentes, na saliva, no dorso da língua e no aparelho ortodôntico que ele/ela utiliza. Ele/ela não receberá nenhuma forma de tratamento odontológico como parte do estudo. Caso necessite de tratamento periodontal o seu nome será colocado em uma lista de espera da Disciplina de Periodontia. Ele/ela receberá ainda, na data do exame instruções de higiene oral e orientações relativas ao problema periodontal quando existente. Se forem detectadas outras alterações bucais em dentes ou mucosas será feito o encaminhamento para a realização do tratamento necessário.

Telefones para contato:

Comitê de Ética em Pesquisa / FOAr – UNESP: (16) 2016432

Rodrigo Rêgo: (16) 2016369

Prof. Dr. Joni Cirelli: (16) 2016375

APÊNDICE A

- 2- Fui esclarecido que a realização da pesquisa não implica em riscos para os participantes e apresenta como benefícios a detecção de alterações periodontais existentes, orientações relativas a estas e instruções de higiene oral quando necessárias.
- 3- Estou ciente de que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas a esta e que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.
- 4- Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém será garantido o sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.
- 5- Estou ciente que a participação na pesquisa não acarretará em nenhum gasto da minha parte, a não ser os provenientes de despesas de transporte até a Faculdade e desta para minha residência. Não havendo o ressarcimento destas.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, ____ de _____ de ____.

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

Rodrigo Otávio Citó César Rêgo
Pesquisador Responsável

Telefones para contato:

Comitê de Ética em Pesquisa / FOAr – UNESP: (16) 2016432

Rodrigo Rêgo: (16) 2016369

Prof. Dr. Joni Cirelli: (16) 2016375

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa



Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA PERIODONTAL DE PACIENTES SOB TERAPIA ORTODÔNTICA COM APARELHOS ORTODÔNTICOS FIXOS E REMOVÍVEIS", sob o protocolo nº 14/03, de responsabilidade do Pesquisador (a) RODRIGO OTÁVIO CITO CÉSAR RÊGO, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 02 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "PERIODONTAL CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF PATIENTS UNDER ORTHODONTIC THERAPY WITH FIXED AND REMOVABLE APPLIANCES", protocol number 14/03, under Dr RODRIGO OTÁVIO CITO CÉSAR RÊGO responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 02 (Two) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 18 de junho de 2003.

Profª Drª Mirian Aparecida Onofre
Coordenadora

APÊNDICE B

CALIBRAÇÃO

Oito pacientes com idades entre 7 e 16 anos, quatro com aparelho ortodôntico fixo e quatro sem, foram escolhidos aleatoriamente. Foram submetidos a dois exames clínicos, em intervalo de um dia, sendo analisados a profundidade de sondagem e o nível de inserção clínico. No total, 147 dentes e 882 sítios foram avaliados. As concordâncias entre os dois exames estão dispostas na Tabela 11.

TABELA 11 - Valores percentuais de concordância de profundidade de sondagem (PS) e de nível de inserção clínico (NIC) entre os dois exames

PARÂMETRO CLÍNICO	EXATO	± 1 mm
PS	91%	98%
NIC	98%	100%

APÊNDICE C

SOLUÇÕES UTILIZADAS NESTE ESTUDO

- Solução de Ringer
 - NaCl ----- 8,6 g/L
 - NaK ----- 0,3 g/L
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ---- 0,33 g/L
- Solução de Desnaturação^Y
 - 0,5 N NaOH
 - 1,5 N NaCl
- Solução de Neutralização^Y
 - 1 M Tris-HCl, pH 8,0
 - 1,5 M NaCl
- Tampão SSC (20X)
 - 3 M NaCl
 - 300 mM Citrato de Sódio
 - pH 7,5
- Solução Pré- Híbridoizante^Y
 - 5X SSC [1:3 (v/v) água deionizada/SSC 20X]
 - 0,1% N - lauroilsarcosina
 - 0,02% SDS
 - 1% (m/v) reagente bloqueador[♦]
- Solução salina de alta concentração^Y
 - 2X SSC [1:9 (v/v) água deionizada/SSC 20X]
 - 0,1% SDS
- Solução salina de baixa concentração^Y
 - 0,5 X SSC [1:39 (v/v) água deionizada/SSC 20X]
 - 0,1% SDS
- Tampão Genius 1^Y
 - 150 mM NaCl
 - 100 mM Tris-HCl, pH 7,5

^Y *The Genius System User Guide for Filter Hybridization*. Boehringer-Mannheim – Indianapolis, IN - EUA.

[♦] Blocking Reagent for Nucleic Acid Hybridization - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

- Tampão Genius 2^Y
 - 2 % (m/v) reagente bloqueador[♦] / Tampão Genius 1
- Tampão Genius 3^Y
 - 100 mM NaCl
 - 100 mM Tris-HCl, pH 9,5
 - 50 mM MgCl₂
- Solução de anticorpos
 - 1:5000 (v/v) Anti-digoxigenina-fosfatase alcalina^τ / Tampão Genius 2
- Solução corante^Y
 - 45 µL - Solução de NBT [75 mg/ml de sal de NBT[♣] (nitroblue tetrazolium) em 70% (v/v) de dimetilformamido]
 - 35 µL - 5-bromo- 4-cloro-3-indoil-fosfato^κ (X-fosfato)
 - 10 mL - Tampão Genius 3

^Y *The Genius System User Guide for Filter Hybridization*. Boehringer-Mannheim - Indianapolis, IN - EUA.

[♦] Blocking Reagent for Nucleic Acid Hybridization - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

^τAnti-Digoxigenin-AP - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

[♣] Boehringer-Mannheim - Indianapolis, IN - EUA.

^κ Sigma Aldrich. St. Louis, MO - EUA

APÊNDICE D

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA

- As amostras foram homogeneizadas em um agitador de tubos, à máxima velocidade, por um minuto.
- 200 µl de cada amostra foram transferidas para um novo tubo e então centrifugadas (10 min/14.000 rpm).
- O sobrenadante foi removido e adicionou-se 200 µL da matriz InstaGene™^Ψ, seguido por incubação a 56°C por 30 min.
- Após agitação por dez segundos, os tubos foram colocados sob temperatura de 100°C por oito minutos.
- Finalmente, após agitação por dez segundos, os tubos foram centrifugados (3 min/14.000 rpm), obtendo-se um sobrenadante contendo o DNA extraído.

^Ψ Bio-Rad Laboratories. Hercules, CA - EUA

APÊNDICE E

PROTOCOLO PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A PCR foi realizada com a utilização de *primers*^ε específicos para a amplificação da 16S rDNA descritos por Wilson et al.⁹²:

- POMOD 5'-AGAGTTTGATCA/CTGG-3'
- PC3MOD 5'-GGACTAC/TAGGGTATCTAAT-3'

Para os procedimentos de hibridização com sondas de DNA e de clonagem, foram utilizados volumes finais de 50 µL e 100 µL respectivamente. Para o volume final de 50 µL, foi utilizado 20 µL da solução com o DNA extraído (Apêndice D), Tampão para PCR com MgCl₂[◇], 0,2 µM de dNTP Mix[◇], 1,25 U de *Taq* polimerase[◇] e volume correspondente a 100 ng de cada *primer*^ε. Valores correspondentes foram utilizados para o volume final de 100 µL.

A amplificação^σ foi realizada com um ciclo inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 96°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

^ε Invitrogen Life Technologies. Carlsbad, CA - EUA

[◇] Promega Co. Madison, WI - EUA

^σ GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer. Norwalk, CT - EUA

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (30µg/L) . Os *primers* utilizados amplificam a região de 789 pares de bases (Figura 5).

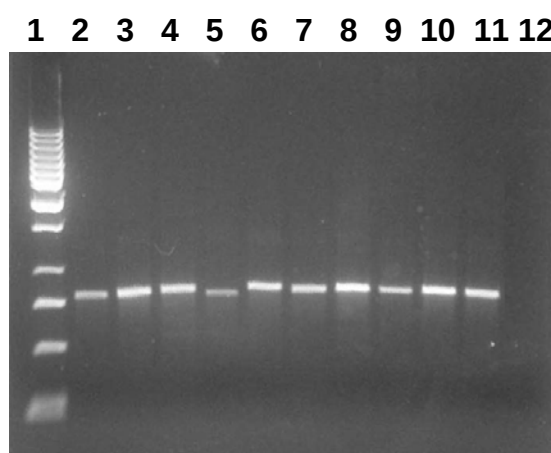


FIGURA 5 – Linha 1: Marcador de peso molecular[§] (1kb); Linhas 2-10: amostras amplificadas; Linha 11: Controle Positivo (*A. actinomycetemcomitans* ATCC 700685); Linha 12: Controle negativo: água^p

[§] Fermentas Inc. - Hanover, MD - EUA

^p PCR Water - MoBio Laboratories, Inc. Carlsbad, CA - EUA

APÊNDICE F

MARCAÇÃO DAS SONDAS DE DNA

As sondas de DNA foram marcadas com digoxigenina através da enzima Terminal Transferase[▲] utilizando-se a solução recomendada pelo fabricante:

TABELA 12 - Solução utilizada para marcação das sondas de DNA

REAGENTE	VOLUME
5X Tampão de reação	4 µL
CoCl ₂	4 µL
Digoxigenina-dUTP	2 µL
Oligonucleotídeos	variável (300 pmol)
dATP	1 µL
Terminal Transferase	1 µL
Água	até 20 µL
TOTAL	20 µL

A solução final foi incubada a 37°C por 15 minutos e imediatamente após colocada em gelo. Foi diluída em 20 mL de solução pré-hibridizante (Apêndice C) e conservada sob -20°C até a sua utilização.

[▲] DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

APÊNDICE G

PROTOCOLO PARA DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE MEMBRANAS HIBRIDIZADAS COM SONDAS DE DNA[†]

Após hibridização com as sondas de DNA, as membranas devem ser banhadas seguidamente em diferentes soluções (Apêndice C):

- Solução salina de alta concentração, duas vezes por 5 minutos;
- Solução salina de baixa concentração, duas vezes por 15 minutos, a 45°C;
- Tampão Genius 1 por 1 minuto;
- Tampão Genius 2 por 30 minutos;
- Solução de anticorpos por 30 minutos;
- Tampão Genius 1, duas vezes por 15 minutos;
- Tampão Genius 3 por 2 minutos;
- Solução corante, por 12 h, em recipiente fechado e opaco;
- Tampão Genius 1 por 5 minutos.

[†] Adaptado de *The Genius System User Guide for Filter Hybridization*. Boehringer-Mannheim - Indianapolis, IN - EUA.

APÊNDICE H

PROTOCOLO UTILIZADO PARA CLONAGEM DA 16S rDNA

A clonagem da 16S rDNA foi realizada por meio do TA Cloning[®] Kit^Ω segundo as recomendações do fabricante. Os produtos da PCR foram purificados^θ e utilizados na Reação de Ligação (Tabela 13):

TABELA 13 - Reagentes e volumes da Reação de Ligação

REAGENTES	VOLUME
produto da PCR	~ 10 ng
10X Tampão de Ligação	1 µL
pCR [®] 2.1 vector (25 ng/µl)	2 µl
Água estéril	até o volume de 9 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
VOLUME FINAL	10 µL

- esta solução foi incubada a 14°C por 12 horas;
- após uma rápida centrifugação, esta solução foi colocada em gelo;
- tubos contendo células competentes One Shot[®] foram descongelados em gelo, e 1 µL da Reação de Ligação foi adicionado, seguido de incubação em gelo por 30 minutos;

^Ω Invitrogen Life Technologies. Carlsbad, CA - EUA

^θ High Pure PCR Product Purification Kit - Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN - EUA.

- foram submetidos a um choque térmico por exatamente 30 segundos a 42°C e colocados novamente em gelo;
- 250 µL de meio SOC foram adicionados aos tubos e então incubados a 37°C por 1 hora;
- 50 µL dessa solução final foram semeados em placas de meio Luria-Bertani^κ contendo 50 µg/mL de ampicilina^κ e X-Gal^κ;
- as placas foram incubadas por pelo menos 18 h e colocadas a 4°C por 2 a 3 h para permitir o desenvolvimento de cor;
- colônias brancas foram escolhidas aleatoriamente para o seqüenciamento (Figura 6).

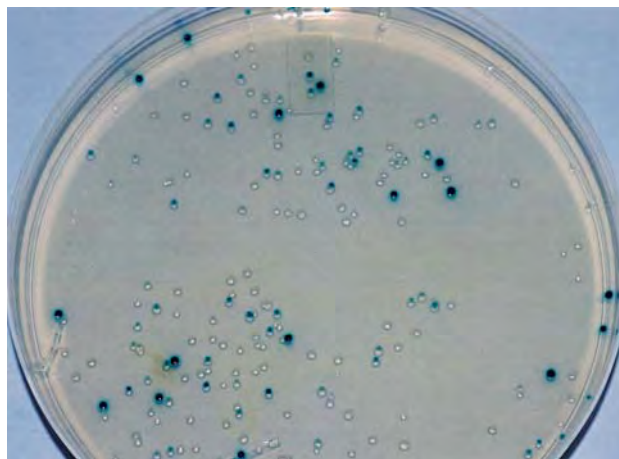


FIGURA 6 - Clones (colônias brancas) e colônias de *E. coli* sem produtos de PCR ligados aos plasmídeos (azuis)

^κ Sigma Aldrich. St. Louis, MO - EUA

GRUPO C-FIX

CÓDIGO	SEXO	IDADE	RAÇA	PV%	SM%	PS média OS col	> PS OS col	PS 1os MP	PV% 1os MP	SM% 1os MP
C2	f	12	b	6,7	3,8	2,3	3,0	2,1	12,5	6,3
C3	m	14	b	42,0	29,7	3,0	4,0	2,6	68,8	75,0
C11	f	15	b	0,0	2,7	2,0	2,0	1,6	0,0	18,8
C13	f	14	n	44,6	12,5	2,8	3,0	2,1	56,3	12,5
C14	f	14	b	42,9	24,1	2,3	3,0	1,9	75,0	43,8
C21	f	11	b	15,7	19,4	2,8	3,0	2,1	25,0	31,3
C22	m	13	b	32,1	23,2	3,0	4,0	2,5	31,3	31,3
C26	m	14	b	82,1	28,6	3,3	4,0	2,6	100,0	50,0
C31	m	12	b	93,5	28,7	3,3	4,0	2,6	93,8	43,8
C32	m	14	b	38,5	16,3	3,0	3,0	2,6	100,0	18,8
C33	f	12	b	0,0	9,2	2,3	3,0	1,8	0,0	0,0
C34	f	12	b	68,3	25,0	3,3	4,0	2,2	75,0	25,0
C35	m	12	b	23,8	8,8	3,0	3,0	3,1	18,8	0,0
C36	f	15	b	55,4	5,4	3,5	4,0	2,0	75,0	6,3
C37	m	16	b	61,6	3,6	3,8	4,0	3,1	87,5	12,5
C38	m	16	b	97,3	21,4	4,3	5,0	2,9	93,8	37,5
C39	f	15	b	92,9	9,8	4,5	5,0	3,2	100,0	25,0
C40	m	15	b	58,9	12,5	4,0	4,0	2,8	75,0	25,0
C41	f	16	b	51,8	17,0	3,0	3,0	2,5	68,8	18,8
C42	f	15	b	89,3	29,2	4,3	5,0	2,9	87,5	18,8
C43	m	12	b	94,6	28,6	3,0	3,0	2,6	100,0	6,3
C44	f	13	b	38,5	0,0	3,0	3,0	2,5	93,8	0,0
C45	f	17	b	26,8	9,8	3,9	4,0	3,8	25,0	12,5
C46	m	15	b	78,7	18,5	4,5	5,0	3,4	81,3	6,3
C47	m	15	b	3,6	6,3	3,0	3,0	2,2	6,3	6,3
C48	f	13	b	76,8	15,2	3,3	4,0	2,5	81,3	31,3
C49	m	16	b	78,8	7,7	3,8	4,0	2,8	75,0	18,8
C50	f	16	n	0,9	2,7	2,3	3,0	2,3	0,0	6,3
C51	m	17	n	25,9	19,6	2,3	3,0	1,7	50,0	25,0
C52	f	16	n	8,0	4,5	2,0	2,0	2,0	6,3	6,3
média		14,2		47,7	15,6	3,2	3,7	2,5	58,8	20,6
desvio padrão		1,7		32,3	11,0	0,9	1,0	0,5	35,9	17,1
mediana		14,5		43,8	13,8	3,0	3,5	2,5	75,0	18,8

f - feminino
m - masculino
b - branco
n - negro
m - mestiço

PV - placa visível
SM - sangramento marginal
PS - prof. de sondagem
OS - sítios controle

col - sítios coletados
1os MP - primeiros molares permanentes

APÊNDICE I - DADOS CLÍNICOS ABSOLUTOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO
GRUPO FIX

CÓDIGO	SEXO	IDADE	RAÇA	PV%	SM%	PS média B col	> PS B col	PS média BK col	> PS BK col	> PS (B e BK)	PS média (B e BK)
F1	f	12	b	45,8	29,2	3,3	4,0	3,5	4,0	4,0	3,4
F2	m	15	b	68,8	46,9	3,5	4,0	4,5	5,0	5,0	4,0
F3	m	11	n	74,0	42,7	3,8	5,0	5,0	5,0	5,0	4,4
F4	m	14	w	74,1	67,9	3,3	4,0	3,5	4,0	4,0	3,4
F5	f	12	m	45,8	59,4	3,5	4,0	4,3	5,0	5,0	3,9
F7	m	16	b	48,2	45,5	4,5	5,0	3,0	3,0	5,0	3,8
F8	f	14	b	89,3	69,6	3,8	5,0	4,3	5,0	5,0	4,0
F9	m	16	b	24,0	54,2	3,5	4,0	3,0	3,0	4,0	3,3
F10	m	16	b	24,0	34,4	3,5	4,0	3,3	4,0	4,0	3,4
F11	m	17	b	80,4	48,2	3,5	4,0	4,3	5,0	5,0	3,9
F12	m	15	b	91,7	58,3	4,3	5,0	4,8	5,0	5,0	4,5
F13	m	17	m	20,5	25,9	3,5	4,0	3,0	3,0	4,0	3,3
F14	f	13	b	95,5	58,9	3,8	5,0	4,0	4,0	5,0	3,9
F15	m	15	n	57,1	60,7	4,3	5,0	4,5	5,0	5,0	4,4
F16	f	15	n	55,4	33,0	3,5	4,0	3,3	4,0	4,0	3,4
F17	m	14	b	67,9	47,3	3,8	4,0	4,3	5,0	5,0	4,0
F18	f	15	b	23,2	40,2	2,8	3,0	3,0	3,0	3,0	2,9
F19	m	16	b	95,4	50,9	3,0	3,0	4,0	5,0	5,0	3,5
F20	m	13	b	91,7	65,6	3,5	4,0	3,8	5,0	5,0	3,6
F21	f	14	b	100,0	36,6	3,5	4,0	4,0	4,0	4,0	3,8
F22	f	15	b	91,1	24,1	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
F24	f	15	b	70,5	33,9	3,3	4,0	2,5	3,0	4,0	2,9
F25	m	13	b	100,0	56,3	4,0	5,0	4,0	5,0	5,0	4,0
F26	f	13	b	75,9	33,0	3,8	4,0	3,3	4,0	4,0	3,5
F27	f	17	b	80,2	37,5	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0	4,0
F28	f	15	b	17,7	12,5	3,3	3,0	2,0	2,0	3,0	2,6
F29	m	12	n	100,0	18,0	4,0	4,0	3,5	4,0	4,0	3,8
F30	m	12	b	98,2	52,7	4,3	5,0	3,5	4,0	5,0	3,9
F31	f	16	b	96,4	42,9	3,8	4,0	3,8	5,0	5,0	3,8
F32	f	16	b	2,7	2,7	2,8	3,0	2,3	3,0	3,0	2,5
média		14,5		66,8	43,0	3,6	4,1	3,6	4,1	4,4	3,6
desvio padrão		1,7		29,6	16,5	0,4	0,7	0,7	0,9	0,7	0,5
mediana		15		74,0	44,2	3,5	4,0	3,6	4,0	5,0	3,8

f - feminino
m - masculino
b - branco
n - negro
m - mestiço

PV - placa visível
SM - sangramento marginal
PS - prof. de sondagem
B - sítios bandados
BK - sítios com brackets

col - sítios coletados
1^{os} MP - primeiros molares permanentes

APÊNDICE I - DADOS CLÍNICOS ABSOLUTOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO
GRUPO FIX

CÓDIGO	PS 1os MP	PV% 1os MP	SM% 1os MP
F1	2,6	43,8	62,5
F2	2,6	81,3	56,3
F3	3,4	87,5	37,5
F4	3,0	100,0	87,5
F5	3,1	100,0	100,0
F7	3,0	100,0	87,5
F8	3,2	100,0	87,5
F9	3,0	56,3	75,0
F10	2,9	31,3	81,3
F11	3,0	100,0	62,5
F12	3,1	100,0	96,9
F13	2,8	15,6	31,3
F14	2,9	100,0	56,3
F15	3,4	81,3	93,8
F16	2,8	93,8	75,0
F17	2,8	93,8	62,5
F18	2,2	25,0	56,3
F19	2,8	100,0	50,0
F20	2,7	100,0	62,5
F21	3,0	100,0	50,0
F22	2,8	100,0	56,3
F24	2,5	81,3	50,0
F25	3,5	100,0	87,5
F26	3,1	100,0	62,5
F27	3,1	96,9	40,6
F28	2,8	25,0	31,3
F29	3,6	100,0	25,0
F30	3,5	100,0	93,8
F31	3,1	93,8	100,0
F32	2,3	3,1	9,4
média	2,9	80,3	64,3
desvio padrão	0,3	30,7	24,2
mediana	3,0	98,4	62,5

f - feminino
m- masculino
b- branco
n-negro
m - mestiço

PV - placa visível
SM - sangramento marginal
PS - prof. de sondagem
B - sítios bandados
BK - sítios com brackets

col - sítios coletados
1^{os} MP - primeiros molares permanentes

APÊNDICE I - DADOS CLÍNIOS ABSOLUTOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO
GRUPO C-REM

CÓDIGO	SEXO	IDADE	RAÇA	PV%	SM%	PS média OS col	> PS OS col	PS 1os MPS	PV% 1os MPS	SM% 1os MPS
C15	m	9	b	29,2	12,5	2,8	3,0	2,4	62,5	25,0
C19	m	10	b	31,5	14,1	3,0	4,0	2,5	87,5	37,5
C2	f	12	b	6,7	3,8	2,3	3,0	2,0	0,0	0,0
C21	f	11	b	15,7	19,4	2,8	3,0	2,1	25,0	37,5
C33	f	12	b	0,0	9,2	2,0	2,0	1,8	0,0	0,0
C35	m	12	b	23,8	8,8	3,0	3,0	2,9	12,5	0,0
C53	f	11	n	8,3	17,7	2,0	2,0	2,0	0,0	37,5
C54	f	6	b	47,7	17,0	2,3	3,0	2,3	100,0	37,5
C55	m	7	n	22,7	12,5	2,3	3,0	2,4	87,5	37,5
C56	m	7	b	14,3	4,8	2,0	3,0	2,2	37,5	0,0
C57	m	10	b	15,3	15,3	2,3	3,0	2,8	62,5	37,5
C61	f	10	b	6,5	1,1	3,0	3,0	2,3	37,5	0,0
C62	f	8	b	5,4	0,0	3,0	3,0	2,3	12,5	0,0
C63	f	11	b	2,5	5,0	3,0	3,0	2,3	0,0	0,0
C64	m	7	b	15,6	3,1	2,5	3,0	2,4	25,0	0,0
C65	m	8	b	5,0	5,0	3,0	3,0	2,3	12,5	0,0
C66	m	9	b	3,8	1,9	3,0	3,0	1,9	0,0	0,0
C67	m	8	b	4,2	6,3	3,0	3,0	2,4	0,0	0,0
média		9,3		14,3	8,8	2,6	2,9	2,3	31,3	13,9
desvio padrão		1,9		12,5	6,2	0,4	0,4	0,3	34,4	18,1
mediana		9,5		12,5	6,2	2,8	3,0	2,3	18,8	0,0

f - feminino
m - masculino
b - branco
n - negro
m - mestiço

PV - placa visível
SM - sangramento marginal
PS - prof. de sondagem
OS - sítios controle

1^{os} MPS - primeiros molares permanentes superiores
col - sítios coletados

APÊNDICE I - DADOS CLÍNICOS ABSOLUTOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

GRUPO REM

CÓDIGO	SEXO	IDADE	RAÇA	PV%	SM %	PS média G col	> PS G col	PS média NG col	> PS NG col	> PS (G e NG)	PS média (G e NG)
R1	f	8	m	55,0	32,5	3,5	4,0	2,3	3,0	4,0	2,9
R2	f	11	b	21,7	27,2	2,5	3,0	2,5	3,0	3,0	2,5
R3	f	11	b	22,1	25,0	2,5	3,0	2,8	3,0	3,0	2,6
R4	f	10	b	17,7	20,8	3,0	3,0	2,8	3,0	3,0	2,9
R5	f	10	b	76,1	15,2	2,0	2,0	2,3	3,0	3,0	2,1
R6	m	9	m	66,7	17,7	3,0	3,0	2,5	3,0	3,0	2,8
R7	m	10	b	33,8	22,5	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	2,5
R8	m	7	b	63,8	10,0	2,3	3,0	2,3	3,0	3,0	2,3
R9	m	11	b	92,7	17,7	2,3	3,0	2,0	2,0	3,0	2,1
R10	m	9	n	100,0	63,8	2,8	3,0	2,8	3,0	3,0	2,8
R11	f	9	b	29,5	14,8	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	2,5
R12	m	9	b	43,2	4,5	2,0	2,0	2,8	3,0	3,0	2,4
R13	m	10	b	85,2	10,2	3,3	4,0	2,3	3,0	4,0	2,8
R14	m	11	b	100,0	31,8	2,5	4,0	2,0	2,0	4,0	2,3
R15	m	11	b	68,2	27,3	2,5	3,0	2,3	3,0	3,0	2,4
R16	m	11	b	52,2	4,3	3,5	4,0	3,0	3,0	4,0	3,3
R17	f	10	b	100,0	11,3	2,8	4,0	2,8	3,0	4,0	2,8
R18	f	6	b	29,5	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
média		9,6		58,7	19,8	2,6	3,0	2,5	2,8	3,2	2,5
desvio-padrão		1,5		29,2	14,5	0,5	0,8	0,4	0,4	0,5	0,3
mediana		10,0		59,4	17,7	2,5	3,0	2,5	3,0	3,0	2,5

f - feminino
m - masculino
b - branco
n - negro
m - mestiço

PV - placa visível
SM - sangramento marginal
PS - prof. de sondagem
G - sítios com grampo
NG - sítios sem grampo

col - sítios coletados
1^{os} MPS-primeiros molares permanentes superiores

APÊNDICE I - DADOS CLÍNICOS ABSOLUTOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

GRUPO REM

CÓDIGO	PS 1os MPS	PV% 1os MPS	SM% 1os MPS
R1	2,6	25,0	37,5
R2	2,1	100,0	87,5
R3	2,2	37,5	62,5
R4	2,2	50,0	12,5
R5	2,3	100,0	0,0
R6	2,3	100,0	37,5
R7	2,0	75,0	37,5
R8	2,2	100,0	0,0
R9	2,3	100,0	12,5
R10	3,1	100,0	87,5
R11	1,9	37,5	25,0
R12	2,0	100,0	0,0
R13	2,8	75,0	62,5
R14	2,3	100,0	62,5
R15	2,2	100,0	12,5
R16	2,8	50,0	12,5
R17	2,7	100,0	0,0
R18	2,0	50,0	0,0
		0,0	0,0
média	2,3	77,8	30,6
desvio-padrão	0,3	28,0	30,4
mediana	2,2	100,0	18,8

f - feminino
m - masculino
b - branco
n - negro
m - mestiço

PV - placa visível
SM - sangramento marginal
PS - prof. de sondagem
G - sítios com grampo
NG - sítios sem grampo

col - sítios coletados
1^{os} MPS-primeiros molares permanentes superiores

APÊNDICE J

DADOS ESTATÍSTICOS ABSOLUTOS

TABELA 14 - Teste estatístico empregado e valores absolutos obtidos para análise estatística dos dados clínicos dos grupos FIX (B e BK) e C-FIX

PARÂMETRO CLÍNICO	TESTE ESTATÍSTICO	VALOR DE p
IP	t - não pareado	0,0197
IG	t - não pareado	< 0,0001
IP / 1 ^{os} MP	<i>Mann - Whitney</i>	0,0022
IG / 1 ^{os} MP	t - não pareado	< 0,0001
PS / 1^{os} MP	t - não pareado	< 0,0001

ns – não significante

TABELA 15 - Teste estatístico empregado e valores absolutos obtidos para análise estatística dos dados clínicos dos grupos REM (G e NG) e C-REM

PARÂMETRO CLÍNICO	TESTE ESTATÍSTICO	VALOR DE p
IP	t - não pareado	< 0,0001
IG	t - não pareado	0,0053
IP / 1 ^{os} MSP	<i>Mann - Whitney</i>	0,0003
IG / 1 ^{os} MSP	<i>Mann - Whitney</i>	ns
PS / 1^{os} MSP	<i>Mann - Whitney</i>	ns

TABELA 16 - Teste estatístico empregado e valores absolutos obtidos para análise estatística dos valores da maior e da profundidade de sondagem média entre os Grupos FIX (B e BK) e C-FIX e REM (G e NG) e C-REM

	TESTE ESTATÍSTICO	VALOR DE p
SÍTIOS COLETADOS (MAIOR PS) B x BK	<i>Mann - Whitney</i>	ns
SÍTIOS COLETADOS (PS MÉDIA) B x BK	<i>t</i> - não pareado	ns
SÍTIOS COLETADOS (MAIOR PS) FIX x C-FIX	<i>Mann - Whitney</i>	0,0014
SÍTIOS COLETADOS (PS MÉDIA) FIX x C-FIX	<i>Mann - Whitney</i>	0,0071
SÍTIOS COLETADOS (MAIOR PS) G x NG	<i>Mann - Whitney</i>	ns
SÍTIOS COLETADOS (PS MÉDIA) G x NG	<i>t</i> - não pareado	ns
SÍTIOS COLETADOS (PS MÉDIA) REM x C-REM	<i>Mann - Whitney</i>	ns
SÍTIOS COLETADOS (MAIOR PS) REM x C-REM	<i>Mann - Whitney</i>	ns

TABELA 17 - Valores absolutos obtidos com o uso do Teste do Quiquadrado para a análise estatística das prevalências bacterianas nos Grupos FIX (B e BK) e C-FIX

BACTÉRIAS	B x BK	FIX x C-FIX
	VALOR DE <i>p</i>	VALOR DE <i>p</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ns	0,0003
<i>C. rectus</i>	ns	0,0023
<i>Capnocytophaga</i> sp.	ns	0,0007
<i>E. corrodens</i>	ns	0,0201
Espiroquetas	ns	< 0,0001
<i>F. nucleatum</i>	ns	0,0002
<i>F. vincentii</i>	ns	< 0,0001
<i>M. micros</i>	ns	0,0007
<i>Neisseriaceae</i>	ns	ns
<i>P. gingivalis</i>	ns	0,001
<i>P. intermedia</i>	ns	0,0195
<i>T. forsythensis</i>	ns	0,0012
<i>Treponema</i> sp.	ns	0,0001

TABELA 18 - Valores absolutos obtidos com o uso do Teste *Exato de Fisher* para a análise estatística das prevalências bacterianas nos Grupos REM (G e NG) e C-REM

BACTÉRIAS	G x NG	REM x C-REM
	VALOR DE <i>p</i>	VALOR DE <i>p</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ns	0,0005
<i>C. rectus</i>	ns	0,0437
<i>Capnocytophaga</i> sp.	ns	ns
<i>E. corrodens</i>	ns	0,0153
Espiroquetas	ns	0,0176
<i>F. nucleatum</i>	ns	ns
<i>F. vincentii</i>	ns	ns
<i>M. micros</i>	ns	ns
<i>Neisseriaceae</i>	0,0437	0,0184
<i>P. gingivalis</i>	ns	ns
<i>P. intermedia</i>	ns	ns
<i>T. forsythensis</i>	ns	ns
<i>Treponema</i> sp.	ns	ns

RÊGO, R. O. C. C. *Avaliação clínica e microbiológica periodontal de crianças e adolescentes sob terapia ortodôntica com aparelhos fixos ou removíveis*. Araraquara, 2004. 118 p. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros clínicos e microbiológicos periodontais de crianças e adolescentes sob terapia ortodôntica com aparelho fixo ou removíveis. Trinta indivíduos ($14,5 \pm 1,7$ anos - Grupo FIX) que utilizavam aparelhos fixos e 18 que utilizavam aparelho extra bucal removível ou placa de Hawley há pelo menos 6 meses ($9,6 \pm 1,5$ anos - Grupo REM) foram comparados a dois grupos controle, constituídos por indivíduos da mesma idade ($14,2 \pm 1,7$ anos - Grupo C-FIX e $9,3 \pm 1,9$ anos - Grupo C-REM) que não utilizavam esses dispositivos. Foi analisada a presença de placa bacteriana visível (IP), sangramento gengival (IG), profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção clínica (PIC). Amostras de placa bacteriana subgengival foram coletadas e analisadas por meio de sondas de oligonucleotídeos para *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *C. rectus*, *Capnocytophaga* sp. *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *F. vincentii*, *M. micros*, *Neisseriaceae*., *P. gingivalis*, *P. intermedia*, espiroquetas, *T. forsythensis* e *Treponema* sp. Diferenças significantes ($p < 0,05$) foram observadas entre os grupos FIX e C-FIX quanto aos parâmetros IP (66,8% e 47,7%), IG (43% e 15,6%), e

para as prevalências de todas as bactérias avaliadas, exceto as da família *Neisseriaceae*. Entre dentes bandados e seus análogos no grupo controle foram encontradas diferenças significantes para os parâmetros PV (80,3% e 58,8%), SM (64,3% e 20,6%) e PS (2,9 mm e 2,5 mm), respectivamente. Entre os grupos REM e C-REM, essas diferenças também foram observadas para IP (58,7% e 14,3%) e IG (19,8% e 8,8%) e para as prevalências de *Aa*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *Neisseriaceae* e espiroquetas. Entre os dentes retentores de grampo e seus análogos no grupo controle verificou-se diferenças significantes para IP (77,8% e 31,3%). Não foi verificado aumento da PS associado a PIC. Também foi avaliada a diversidade bacteriana subgingival de dentes bandados e de dentes utilizados para reter grampos por meio de clonagem da 16S rDNA a partir de amostras clínicas. Isso possibilitou a identificação de espécies e grupos bacterianos não cultivados e pouco conhecidos. A utilização de aparelhos ortodônticos está associada ao maior acúmulo de placa bacteriana, de inflamação gengival, da profundidade de sondagem e a uma maior prevalência de patógenos relacionados às doenças periodontais.

Palavras-chave: Gengivite; Aparelhos ortodônticos; Criança; Adolescente; Dente – Microbiologia; Sondas DNA; Clonagem molecular.

Clinical and microbiological evaluation of children and adolescents under orthodontic therapy with fixed or removable appliances.

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare clinical and microbiological parameters in children and adolescents with and without fixed or removable orthodontic appliances. Thirty subjects (mean age 14.5 ± 1.7 years) treated with fixed appliances and 18 treated with removable appliances for at least 6 months were selected as test groups, FIX and REM, respectively. The control groups were comprised of 30 subjects (mean age 14.2 ± 1.7 years - Group C-FIX) and 18 subjects (mean age 9.3 ± 1.9 years - Group C-REM) that did not receive orthodontic treatment. Clinical evaluations were made for plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PD) and clinical attachment loss (CAL). Subgingival plaque samples were collected from the patients and analyzed by oligonucleotide probes for the presence of *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *C. rectus*, *Capnocytophaga* sp. *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *F. vincentii*, *M. micros*, *Neisseriaceae.*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, spirochetes, *T. forsythensis* and *Treponema* sp. Additionally, two subgingival dental plaque samples from one subject of each test group were further analyzed by cloning and sequencing the amplified 16S rDNA. Significant differences were noted between FIX and C-FIX for PI (66.8% versus 47.7%), GI (43.8% versus 15.6%) and between the banded teeth in the FIX group and the analogous teeth in the C-FIX group for PI (80.3% versus 58.8%), GI (64.3% versus

20.6%) and PD (2.9 mm versus 2.5 mm). Significant differences were noted between FIX and C-FIX for all targeted bacteria but *Neisseriaceae*. Results: Significant differences were also noted between REM and C-REM for PI (58.7% versus 14.3%) and GI (19.8% versus 8.8%) and between the clasped teeth in the test group and the analogous teeth in the control group for PI (77.8% versus 31.3%). Significant differences were noted between the REM and C-REM for *Aa*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *Neisseriaceae*, and spirochetes. CAL associated with PD was not detected in any patient. Cloning and sequencing the 16S rDNA was able to identify a number of uncultivable and DNA probe-undetectable species. Orthodontic appliances are associated with increased plaque accumulation, gingival inflammation, probing depth and prevalence of periodontal diseases related pathogens.

Key words: Gingivitis; Orthodontic appliances; Child; Adolescent; Tooth – microbiology; DNA Probes; Molecular cloning.