

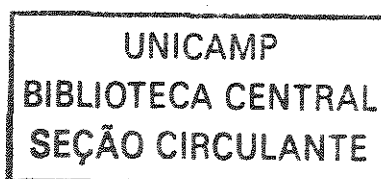
Emerson José Sallum
Cirurgião- dentista

**Avaliação clínica e microbiológica das condições
periodontais associadas ao uso de aparelhos
ortodônticos fixos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ortodontia.

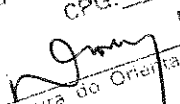
PIRACICABA

2002



Emerson José Sallum
Cirurgião- dentista

**Avaliação clínica e microbiológica das condições
periodontais associadas ao uso de aparelhos
ortodônticos fixos.**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-036/83
CPG. 06/09/2002

Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ortodontia.

Orientador- Prof. Dr. Darcy F. Nouer

Co-Orientador-Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Darcy F. Nouer

Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho

Prof. Dr. Marcio Zaffalon Casati

PIRACICABA

2002

UNIDADE	BC
CHAMADA	T/UNICAMP
	Sa 34a
EX	
OMBO BC/	52057
ROC.	16-124/03
C	☐
D	☒
REÇO	R\$ 11,00
ATA	12/02/03
A CPD	

CM00179056-9

08 ID 278429

Ficha Catalográfica

Sa34a Sallum, Emerson José.
Avaliação clínica e microbiológica das condições periodontais associadas ao uso de aparelhos ortodônticos fixos. / Emerson José Sallum. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
ix, 83f. : il.

Orientadores: Prof. Dr. Darcy F. Nouer, Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Gengivite. 2. Ortodontia. 3. Reação em cadeia de polimerase. I. Nouer, Darcy F. II. Sallum, Enilson Antonio. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 15 de Julho de 2002, considerou o candidato EMERSON JOSÉ SALLUM aprovado.

1. Prof. Dr. DARCY FLAVIO NOUER

2. Prof. Dr. GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO

3. Prof. Dr. MÁRCIO ZAFALLON CASATI

Dedico este trabalho

A Deus, por ser presente em minha vida.

Aos meus pais, Arlene e Wilson, pela convivência que se fez ensinamentos, nos quais me transmitiram as diretrizes de honestidade, segurança e ternura. A vocês devo a pessoa que sou e o profissional que estou me tornando.

Ao meu irmão Enílson, pelo companheirismo e exemplo de determinação e fé.

À minha companheira, Cristina pelo carinho, incentivo e a paciência em todos os momentos.

À minha cunhada Márcia, pela amizade e por ter me presenteado com meus sobrinhos Gabrielle e Lucas.

Agradecimento Especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. Darcy Flávio Nouer,

É bom dar quando solicitado, melhor porém, é dar sem ser solicitado por haver apenas compreendido. Há pessoas que quando deveriam ser apenas professores, foram mestres. Que deveriam ser mestres, foram amigos. Há pessoas que passam pela nossa vida e deixam um pouco de si. Há outras que passam, levam um pouco de nós e também há aquelas que não passam, simplesmente ficam. Saiba que o Senhor é uma delas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Enílson Antonio Sallum,

O seu exemplo mostrou ser possível exercer o amor em todos os nossos atos. Mais que ensinar, você soube cultivar uma amizade que o tempo amadureceu e me fez ver que as pessoas são mais iguais que diferentes umas das outras. Por tudo, com amor e carinho.

Ao meu Pai, Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba,

Um discípulo nunca consegue imitar perfeitamente os passos do seu mestre porque cada um tem uma maneira de ver a vida, de conviver com as dificuldades e com as conquistas. Ensinar é mostrar que é possível aprender e tornar possível a si mesmo. Agora que parto em busca de outros caminhos gostaria que soubesse meu pai e mestre:

Você fez, faz e fará sempre parte da minha história.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Pela sua ajuda indispensável na realização desse trabalho, meu muito obrigado.

A Marlise I. Aklein , mestrande do Departamento de Microbiologia, Obrigado por ter-me feito parte do seu tempo e mesmo atarefada, tornou meu trabalho possível. Muito obrigado por tudo.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, na presença do Magnífico Reitor Prof. Dr. Carlos Brito.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas do Diretor, Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas do Diretor Associado Prof.Dr. Frab Norberto Bóscolo.

À Prof^a. Altair Antoninha Del Cury, coordenadora dos Cursos de Pós Graduação da FOP/ UNICAMP.

Às docentes do curso de Pós Graduação em Ortodontia da FOP/ UNICAMP, Prof^{as}. Dra. Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani , Dra. Maria Helena Castro de Almeida , Dra. Vânia Célia Vieira de Siqueira e o Prof. Dr. João Sarmento.

À Prof^a. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pelo importante auxílio dado na obtenção dos nossos resultados estatísticos.

Aos meus colegas de mestrado, Adriana, Estênyo, Fernando, Glauce, Mayuri e Silvia.

Aos meus colegas de doutorado, Heloísa, Tubel, Haroldo e Paulo.

Aos meus colegas do curso de especialização de Ortodontia da FOP UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Getúlio Nogueira Filho pelo estímulo.

Ao Prof. Dr. Marcio Z. Casati pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Mário Vedovello pelo exemplo de solidariedade.

Ao Prof. Dr. Mário Terra pelo exemplo de amizade.

Aos meus amigos, Alexander Lopes, Marcelo Gatto , Sérgio Médice Jr e Renato Nardin

Ao prefeito e vice da FOP, amigos Danelon e Pedro.

Aos funcionários do Departamento de Ortodontia da FOP, Roberto, Lígia e Maria de Lurdes (Tuca).

Às secretárias da Diretoria da FOP, Cida, Patrícia e Regina.

Ao motorista da Diretoria da FOP, Isaías (Chocolate).

Aos funcionários Ivanete e João Batista (Joãozinho).

Aos pacientes que gentilmente se submeteram a esta pesquisa.

À Comissão de Ética da FOP, pelo valioso auxílio.

Aos membros da minha família, aos meus avós, tios e primos.

E a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho se realizasse.

CAMINHAR

Às vezes o caminhar é lento, mas o importante é não parar.
Mesmo um pequeno progresso é um avanço na direção certa.

E qualquer um é capaz de fazer um pequeno progresso.

Se você não pode conquistar algo importante hoje,

Conquiste algo menor.

Pequenos riachos se transformaram em rios poderosos.

Continue em frente.

O que de manhã parecia fora do alcance, pode ficar mais
próximo à tarde se você continuar em frente.

O tempo que usar trabalhando com paixão e intensidade
aproximará você do seu objetivo.

É bem mais difícil começar de novo se você pára
completamente.

Então, continue em frente. Não desperdice a chance que
você mesmo criou.

Existe algo que pode ser feito agora mesmo, ainda hoje.

Pode não ser muito, mas fará com que você continue no jogo.

Caminhe rápido enquanto puder.

Caminhe lento quando for preciso.

Mas, seja o que for continue andando.

E você conseguirá alcançar suas metas...

SUMÁRIO

I. Listas.....	1
II. Resumo.....	4
III. Abstract.....	6
VI. Introdução.....	8
V. Revista da Literatura.....	13
VI. Proposição.....	28
VII. Material e Métodos.....	29
VIII. Resultados.....	37
XI. Discussão.....	47
X. Conclusões.....	55
XI. Referências Bibliográficas.....	56
XII. Anexos.....	70
XIII. Apêndice.....	81

I - LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

PCR- Reação de Polimerase em Cadeia

Pg- Porphyromonas gingivalis

Bf- Bacteroides forsythus

Aa- Actinobacillus actinomycetemcomitans

Pi- Prevotella intermedia

Pn- Prevotella nigrescens

PS- Profundidade de Sondagem

IP- Índice de Placa

ISS- Índice de Sangramento à Sondagem

Lista de Tabelas

Tabela 1.Freqüências e % de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais.....38

Tabela 2. Freqüências e % de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais.....39

Tabela 3. Freqüências e % de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais.....41

Tabela 4.Índice de sangramento nas avaliações inicial e final.....43

Tabela 5. Índice de placa (%) nas avaliações inicial e final44

Tabela 6. Profundidade de Sondagem nas avaliações inicial e final.....45

Lista de Figuras

Figura 1. Porcentagem de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais (supra e sub gengival).....	39
Figura 2. Porcentagem de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais (supra gengival).....	40
Figura 3. Porcentagem de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais (sub gengival).....	42
Figura 4. Índice de sangramento (%) nas avaliações inicial e final.....	43
Figura 5. Índice de placa (%) nas avaliações inicial e final.....	44
Figura 6. Profundidade de sondagem nas avaliações inicial e final.....	45
Figura 7. Aspectos clínicos iniciais.....	46
Figura 8. Aspectos clínicos finais.....	46

II- RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros clínicos e microbiológicos associados à presença de anéis e braquetes ortodônticos em pacientes submetidos a tratamento na clínica de Ortodontia da FOP/UNICAMP. Foram selecionados 10 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão: presença de sinais clínicos de inflamação gengival, idade entre 12 e 20 anos e em fase final de remoção do aparelho ortodôntico. Os dentes selecionados para a pesquisa foram 16-11-26. Foram avaliados em dois períodos, constituindo os grupos: *teste*: durante a vigência da inflamação gengival; *controle*: os mesmos dentes receberam profilaxia profissional após a retirada do aparelho ortodôntico e foram reavaliados trinta dias após. Os parâmetros clínicos utilizados foram o índice de placa, índice de sangramento gengival e profundidade de sondagem. O exame microbiológico incluiu a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As bactérias pesquisadas foram: *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Bacteroides forsythus* (Bf), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella nigrescens* (Pn). Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste McNemar. Observou-se redução significativa na profundidade de sondagem, no índice de placa e sangramento à sondagem. A

inflamação gengival estava associada à presença de periodontopatógenos demonstrada pelo PCR. A remoção do aparelho ortodôntico fixo associada à profilaxia resultou em significativa diminuição na frequência de detecção do *Aa* e *Bf*. Dentro dos limites deste estudo, conclui-se que as bactérias associadas à inflamação gengival durante o tratamento ortodôntico podem ser reduzidas após a remoção do aparelho e profilaxia profissional. Estes achados reforçam a importância do controle de placa em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos para diminuir o risco de doença periodontal.

Palavras-chave: periodontopatógenos, gengivite, ortodontia, PCR

III- ABSTRACT

The goal of the present study was to evaluate the clinical and microbiological aspects associated with orthodontic appliances in patients of the Orthodontic Graduate Clinic of the School of Dentistry at Piracicaba. The 10 patients included in the study were at the end of the orthodontic treatment (phase of removal of the appliance) and were selected according to the inclusion criteria: clinical signs of gingival inflammation and age between 12 and 20 years. The evaluation was performed in the teeth 16-11-26 in two periods: test: during the course of gingival inflammation, control: the same teeth submitted to a professional prophylaxis and 30 days after the removal of the appliance. The clinical parameters evaluated were plaque index, gingival bleeding index, probing depth and the microbiological evaluation with the polymerase chain reaction technique (PCR) to detect the presence of the following bacteria: *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Bacteroides forsythus* (Bf), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella nigrescens* (Pn). The data were analyzed by the McNemar test. A statistically significant reduction in probing depth, plaque and gingival bleeding index was observed. It has been shown the presence of putative periodontal pathogens associated with the gingival inflammation during the orthodontic treatment. The return to the periodontal health achieved by a professional prophylaxis and the removal of the

appliance resulted in a statistically significant reduction in the detection of *Aa* and *Bf*. It can be concluded that the periodontopathic bacteria associated with gingival inflammation during orthodontic treatment can be significantly reduced by the removal of the appliance associated to a professional prophylaxis. The importance of a plaque control regimen during orthodontic treatment is reinforced by the findings of the present study.

Key words: periopathogens, gingivitis, orthodontics, PCR

IV- INTRODUÇÃO

A correção do posicionamento dental e maloclusões pelo tratamento ortodôntico pode permitir uma higiene oral melhor, apesar da pesquisa nesta área apresentar resultados conflitantes. Considera-se que dentes mal posicionados promovem um acúmulo maior de placa bacteriana quando comparados a dentes bem alinhados (GRIFFITHIS & ADDY, 1981). Entretanto, este fato parece ser clinicamente relevante apenas para pacientes que não controlam bem a placa (ALEXANDER, 1970).

Nos pacientes que possuem um bom nível de higiene oral não foi observada relação entre irregularidades de posição em dentes posteriores e a doença periodontal (BEAGRIE & JAMES, 1962). Estudos retrospectivos de longa duração mostraram que danos significativos não poderiam ser atribuídos ao tratamento ortodôntico bem como a falta de tratamento ortodôntico teria pouca influência na doença periodontal em fases tardias da vida (SADOWSKY & BEGOLE, 1981; POLSON et al, 1988). BAER & COCCARO (1964) notaram a ocorrência de aumento gengival logo após a colocação de aparelhos ortodônticos fixos que geralmente desaparecia após a remoção do aparelho. Outros autores (KLOEHN & PFEIFER, 1974; ZACHARISSON & ZACHARISSON, 1972; ALEXANDER, 1991) observaram este aumento e

sugeriram que o fenômeno explicaria o aumento na profundidade de sondagem encontrado durante o tratamento, não sendo, entretanto associado a perdas de inserção.

A colocação das bandas numa posição supra gengival permite uma limpeza mais fácil e reduz o risco de possíveis danos à saúde gengival, mas infelizmente, a maioria das margens de bandas supragengivais logo se tornam subgengivais devido ao aumento de volume do tecido gengival. De um modo geral, considera-se que a saúde gengival é comprometida quando bandas ortodônticas são colocadas (ALEXANDER, 1991; ZACHRISSON, 1976; BOYD & BAUMRIND, 1992).

Muitos estudos se concentraram na descrição dos parâmetros clínicos como o índice de placa de SILNESS & LÖE (1964), índice gengival de LÖE & SILNESS (1963) e profundidades de sondagem. Poucas investigações foram feitas para rever a placa associada com as mudanças clínicas observadas após a colocação de aparelhos ortodônticos, talvez pelas dificuldades envolvidas na identificação das bactérias que predominam nas culturas (RUSSELL, 1992).

Considerando que existem evidências que suportam a idéia de que bactérias específicas podem ser responsáveis pela produção da doença (SLOTS, 1979; LISTGARTEN & HELLDÉN, 1978; SLOTS & LISTGARTEN, 1988), parece razoável a hipótese de que se as bandas ortodônticas provocam uma

reação gengival elas poderiam também influenciar a microbiota subgengival, tornando-a mais agressiva. Esta pode ser uma das explicações para a inflamação observada ao redor dos dentes com bandas e bom controle de placa supra gengival (ZACHRISSON & ZACHRISSON, 1972).

Os métodos de pesquisa se desenvolveram nesta área desde o trabalho pioneiro de BLOOM & BROWN (1964) que relatou um aumento generalizado em todas as contagens bacterianas após a colocação de bandas. O único aumento significativo foi nas contagens de *lactobacillus*. Pacientes com o maior número de bandas tiveram o maior aumento nas contagens bacterianas. Entretanto, todas as medidas foram obtidas de amostras de saliva e não de áreas específicas ao redor das bandas. Depois da descoberta de que os aparelhos alteram a microbiota bucal, esforços foram concentrados em se obter amostras de áreas específicas da boca. A preocupação inicial foi com a placa cariogênica mais do que com a saúde gengival já que a descalcificação ao redor e sob as bandas se constituía em um problema sério (CORBETT et al, 1981; MIZRAHI, 1982; MIZRAHI, 1983).

Vários estudos examinaram a placa supragengival (CORBETT et al, 1981; BALENSEINFEN & MADONIA, 1970; YORK & DURKIN, 1967). Os trabalhos progrediram então para a avaliação da placa subgengival ao redor das bandas ortodônticas, e mais especificamente, nos tipos de bactérias presentes

com o uso de microscopia de campo escuro, que possibilita uma identificação rápida de organismos móveis (LISTGARTEN, 1982).

As primeiras investigações observaram a influência de aparelhos removíveis seguidos pelos fixos na placa subgengival (MÜLLER & FLORES, 1982; FLORES & MÜLLER, 1982). Com os aparelhos removíveis, não foram encontradas diferenças significativas nas proporções das diversas bactérias em pacientes com ou sem aparelhos. Concluiu-se que aparelhos removíveis não contribuem para mudanças desfavoráveis na composição bacteriana da placa subgengival. Aparelhos fixos, entretanto, causaram uma elevação significativa de espiroquetas e fusiformes em um estudo transversal (MÜLLER & FLORES, 1982).

Em um estudo longitudinal, LEGGOTT et al (1984) seguiram dois grupos de pacientes sendo um grupo com idade inferior a 18 anos e o outro com mais de 18 anos, durante um período de 2 anos após a colocação dos aparelhos ortodônticos fixos. Os autores encontraram um aumento de 2 a 3 vezes, tanto nos índices clínicos como no número de organismos móveis, após 6 meses da colocação do aparelho. O grupo de adolescentes manteve estes níveis elevados durante o tratamento enquanto os pacientes adultos melhoraram em 50% dos valores máximos observados, ao final do tratamento. Outros estudos longitudinais mostraram efeitos adversos na microbiota ocorrendo logo após a

colocação de aparelhos ortodônticos que são seguidos por alterações na quantidade de placa supragengival, sangramento e profundidade de sondagem. A colocação de bandas ortodônticas parece resultar no estabelecimento de uma microbiota subgengival mais patogênica semelhante à observada na doença periodontal.

Considerando os fatos expostos acima, principalmente o pequeno número de investigações caracterizando a placa subgengival após a colocação das bandas ortodônticas, o objetivo do presente trabalho será avaliar, através de parâmetros clínicos e microbiológicos (PCR), pacientes submetidos a tratamento ortodôntico na clínica de Ortodontia da FOP/UNICAMP.

V- REVISTA DA LITERATURA

Nenhum profissional deveria iniciar um tratamento ortodôntico com áreas ativas de destruição periodontal. Pacientes acometidos de doença periodontal devem ser mais cuidadosamente acompanhados para prevenir novos episódios de destruição que podem resultar em rápida perda óssea. (GRABER & VANARSDALL, 1994)

Placa Dental Bacteriana

As bactérias que habitam a cavidade bucal desde o nascimento até a morte, colonizam os tecidos moles incluindo a gengiva, a bochecha e a língua. Quando os dentes estão presentes, as bactérias os colonizam tanto supra quanto subgengivalmente. Estima-se que mais de 400 espécies diferentes são capazes de colonizar a boca. A quantidade de bactérias que colonizam a placa supra gengival pode exceder 10^9 em uma única superfície dental, assim como, a contagem em placa subgengival pode variar de 10^3 em um sulco raso até 10^8 em bolsas periodontais.

Existe uma correlação positiva entre quantidade de placa bacteriana e gravidade da gengivite (ASH et al, 1994) e quantidade de perda óssea (SCHEI et al, 1959). No entanto, estudos longitudinais (LÖE et al, 1965) demonstraram

que procedimento intensivo de controle de placa é essencial para erradicação da gengivite clínica.

A transição de gengivite para doença periodontal destrutiva não foi demonstrada experimentalmente em humanos. No entanto, em cães a gengivite desenvolve-se como resultado do acúmulo de placa bacteriana (EGELBERG, 1965) e se permitida a sua evolução por um período suficientemente longo, ocorre destruição permanente dos tecidos de suporte dos dentes, que é característica da doença periodontal humana (SAXE et al, 1967; LINDHE et al, 1973). Estes resultados indicam que a doença periodontal destrutiva pode originar-se de uma gengivite de longa duração, confirmando assim as conclusões tiradas dos estudos epidemiológicos.

Paciente Ortôdontico / Placa Dental Bacteriana

Em 1972, ZACHIRISSON & ZACHRISSON apresentaram um estudo com um grupo de 49 adolescentes em tratamento ortodôntico fixo. Os pacientes receberam instrução de higiene oral e bochechos com soluções fluoretadas semanalmente. Foram analisados índices de placa, índice gengival, presença ou não de bolsa periodontal e grau de hiperplasia gengival. Observou-se que nesse estudo a maioria das crianças apresentou gengivite moderada generalizada durante a terapia ortodôntica apesar da repetida motivação e instrução de

escovação dental. As condições gengivais melhoraram rapidamente após a remoção das bandas ortodônticas.

Em 1976, ZACHRISSON focalizou seu estudo em injúrias ao tecido mole e duro durante e após a terapia ortodôntica. Métodos padronizados foram usados para avaliar cárie dentais e condições gengivais, perda de inserção e perda óssea alveolar. Os achados indicaram que a carie é um problema de menor importância em pacientes colaboradores, com higiene oral adequada e uso regular de fluoretos. Referente aos danos periodontais, o autor relatou vários aspectos:

- 1) condição gengival: observou que apesar da motivação para a higiene oral, alguns pacientes bandados desenvolveram hiperplasia gengival, principalmente nas áreas interproximais, após 1 a 2 meses da colocação do aparelho fixo e que após a remoção dos mesmos a hiperplasia diminuiu.
- 2) perda de inserção: constatou que a variação individual foi importante. A maioria das pessoas não tratadas teve pouca ou nenhuma perda de inserção, enquanto aproximadamente 50% das tratadas tiveram algum grau de perda de inserção periodontal .
- 3) perda óssea alveolar: os achados indicaram que os pacientes ortodônticos apresentaram perda óssea significativamente maior que as pessoas não tratadas,

em todas as superfícies interproximais, principalmente naquelas próximas a áreas de extração.

4) reabsorção radicular apical: os achados indicaram que as forças ortodônticas, embora importantes quanto a magnitude, tipo, direção e duração, não são os únicos fatores envolvidos na ocorrência de reabsorção excessiva. Outros fatores como predisposição individual e trauma prévio têm também grande participação.

O autor enfatiza que se a higiene oral é boa durante o tratamento, pouco ou nenhum dano é causado durante o mesmo. Considera que a longo prazo o tratamento ortodôntico é benéfico aos tecidos periodontais pela melhora da higiene e da função. No entanto se a higiene for deficiente durante o tratamento ortodôntico, pode haver o início de doença periodontal. Portanto os resultados mostraram que com técnicas adequadas e métodos de controle de placa por parte do paciente os danos são reversíveis e os benefícios do tratamento ortodôntico são válidos.

FOLIO et al (1985) analisaram a correção de maloclusão em pacientes portadores de periodontite juvenil após o término do tratamento periodontal. Análises microscópicas da placa subgengival dos dentes tratados ortodonticamente foram usadas para monitorar longitudinalmente os efeitos das bandas na microbiota subgengival e também para monitorar a eficácia de terapia

tópica e sistêmica dirigida a eliminar as bactérias periodontopatogênicas. A movimentação ortodôntica foi completada na maioria dos dentes periodontalmente comprometidos sem evidente deterioração do estado periodontal. Entretanto nos primeiros seis meses da colocação da banda ortodôntica, todos os pacientes tiveram um aumento significativo no número de espiroquetas e bastonetes na microbiota subgingival. Os resultados demonstraram que o reposicionamento ortodôntico pode ser executado com sucesso em pacientes portadores de periodontite juvenil, desde que seja executada monitoração bacteriológica e supressão quimioterápica dos periodontopatógenos. Os autores ressaltam que a maior dificuldade em se tratar esses pacientes estaria no fato de se atingir um índice aceitável de controle de placa mesmo após o término da terapia periodontal.

Patógenos na Doença Periodontal

A indução e progressão da destruição do tecido periodontal é um processo complexo envolvendo acúmulo de placa, liberação de substâncias bacterianas e resposta inflamatória do hospedeiro (MARSH & MARTIN, 1992). Embora as bactérias raramente invadam os tecidos, elas têm a capacidade de liberar substâncias que penetram na gengiva podendo causar destruição direta do tecido

pela ação de enzimas e endotoxinas, ou agir indiretamente, pela indução da inflamação (MARSH & MARTIN, 1992; MARCOTE & LAVOIE, 1998).

Há estimativas de que entre 300 a 400 espécies bacterianas diferentes são capazes de colonizar a cavidade oral humana sendo que contagens de microrganismos em sítios subgengivais variam entre 10^3 , em sulcos saudáveis, a mais de 10^8 , em bolsas periodontais profundas (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994). O número de espécies que têm potencial para iniciar a doença periodontal é limitado a 20 a 30 espécies. O sucesso na pesquisa tem sido limitado devido a dificuldades técnicas e flutuações na atitude do profissional frente ao papel das bactérias no desenvolvimento da doença (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994).

Na periodontite crônica do adulto, os microrganismos que são cultivados com maior frequência e encontrados em maior número, são geralmente os bacilos Gram-negativos anaeróbios: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* (SLOTS & LISTGARTEN, 1988; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa)

Uma das mais fortes associações entre um patógeno suspeito e doença periodontal destrutiva está relacionada ao *Aa*. O *A. actinomycetemcomitans* é

um bastonete arredondado, capnofílico, sacarolítico, Gram-negativo, não-móvel e forma pequenas colônias convexas com um centro “estrelado” quando cultivado em agar-sangue. Esta espécie foi primeiramente reconhecida como um possível patógeno periodontal por sua elevada frequência de detecção e números elevados em lesões de periodontite juvenil localizada (CHUNG et al, 1989; NEWMAN & SOCRANSKY, 1977; SLOTS, 1976) quando comparada com outras nas amostras de placa em condições clínicas como periodontite, gengivite e periodonto sadio.

Logo após, foi demonstrado que a maioria dos pacientes com Periodontite Juvenil Localizada (PJL) apresentava uma quantidade bastante elevada de anticorpos séricos em resposta a esta espécie (ALTMAN et al, 1982; GENCO et al, 1980) e que existia uma síntese local de anticorpos para esta espécie (EBERSOLE et al, 1985; SCHONFELD & KAGAN 1982).

Quando os indivíduos com esta forma de doença foram tratados com sucesso, o *Aa* foi eliminado ou reduzido; ao passo que o tratamento insuficiente estava associado a uma deficiência na redução da quantidade da espécie nos sítios tratados (CHRISTERSSON et al, 1985; KORNMAN & ROBERTSON, 1985; HAFFAJEE et al, 1984; SLOTS & ROSLING, 1983).

Recentemente, o *A.actinomycescomitans* tem demonstrado apresentar capacidade de invadir as células epiteliais gengivais humanas cultivadas *in vitro* (BLIX et al, 1992; SREENIVASAN et al, 1993).

Coletivamente, os dados sugerem que o *A.actinomycescomitans* é um provável patógeno da Periodontite Juvenil Localizada (PJL). No entanto, isto não deve ser interpretado como se este patógeno fosse a causa única desta condição clínica já que alguns indivíduos com PJL não exibem estas espécies nas amostras de placa subgengival e não apresentam anticorpos em resposta à espécie (LOESCHE et al, 1985; MOORE, 1987).

O *A.actinomycescomitans* também tem sido implicado nas formas adultas de doenças periodontais destrutivas, mas o seu papel não está claro. A espécie foi isolada de periodontite do adulto com menos frequência e em menor número do que nas lesões de PJL (RODENBURG et al, 1990; SLOTS et al, 1990a). Além disso, frequentemente, a sua quantidade em amostras de placa em lesões de adultos não foi tão elevada quanto a dos outros patógenos suspeitos na mesma amostra de placa (ZAMBON et al, 1983b).

Dados relacionados aos anticorpos e ao tratamento dos pacientes infectados pelo *A.actinomycescomitans* com periodontite do adulto ou refratária forneceram a evidência mais convincente de um possível papel

etiológico do *A.actinomycetemcomitans* nas formas de doença periodontal em adultos (VAN WINKELHOFF et al, 1992).

Resposta elevada a outros patógenos periodontais suspeitos foi muito menos comum. VAN WINKELHOFF et al (1992) trataram 50 indivíduos adultos com “periodontite generalizada severa” e 40 indivíduos com periodontite refratária os quais foram positivos na cultura para o *A.actinomycetemcomitans*. O tratamento incluiu o debridamento mecânico e a administração de amoxilina e metronidazol por sete dias. Somente 1 dos 90 sítios foi positivo para a cultura do *A.actinomycetemcomitans*, 3-9 meses após o tratamento e 1 dos 48 indivíduos foi positivo à cultura dois anos após a terapia. Houve um ganho significativo no nível de inserção e uma diminuição na profundidade da bolsa em todos os pacientes após a terapia. Dados como estes sugerem que o *A.actinomycetemcomitans* provavelmente participa da doença periodontal em alguns, mas certamente não em todos os indivíduos adultos.

Porphyromonas gingivalis (Pg)

O *P. gingivalis* é o segundo mais intensivamente estudado “provável” patógeno periodontal. Isolados destas espécies são bastonetes Gram-negativos anaeróbios, não-móveis, assacarolíticos que usualmente exibem morfologias de cocos a bastonetes. O *P. gingivalis* é um membro do grupo muito investigado de “Bacteróides pigmentados de preto”. Os microrganismos deste grupo formam

colônias de cor marrom a preta (OLIVER & WHERRY, 1921) em ágar-sangue e foram inicialmente agrupados em uma espécie única, *Bacteróides melaninogenicus* (*Bacterium melaninogenicum* – BURDON, 1928)

O interesse inicial no *P. gingivalis* e em outros *Bacteroides* que se pigmentam de preto ocorreu inicialmente devido ao seu papel essencial em certas infecções mistas experimentais (SOCRANSKY & GIBBONS, 1965).

Os membros destas espécies produzem colagenase, uma série de proteases (incluindo aquelas capazes de destruir imunoglobulinas), endotoxina, ácidos adiposos, NH₃, H₂S, indol etc. Estudos iniciados no final da década de 70 e que se estendem até os dias de hoje fortaleceram a associação de *P. gingivalis* com doença e demonstraram que a espécie era incomum e em baixo número em gengivite ou gengiva saudável, mas detectada mais freqüentemente nas formas destrutivas da doença periodontal. A espécie tem demonstrado ser reduzida em sítios tratados com sucesso, mas é comumente encontrada em sítios que exibem recorrência da doença após a terapia (HAFFAJEE et al, 1988^a; VAN WINKELHOFF et al, 1988).

O *P. gingivalis* tem demonstrado induzir respostas imunológicas locais e sistêmicas elevadas em indivíduos com várias formas de periodontites (MAHANONDA et al, 1991).

Microrganismos semelhantes a *P. gingivalis* são também fortemente relacionados com a doença periodontal destrutiva. Assim como o *A. actinomycetemcomitans*, o *P. gingivalis* tem demonstrado ser capaz de invadir as células epiteliais da gengiva em humanos *in vitro* (DUNCAN et al, 1993; LAMOSNT et al, 1992; SANDROS et al, 1993) e foi observado em maior número sobre ou no interior das células epiteliais da bolsa periodontal ou na placa associada (DZINK et al, 1989).

Bacteroides forsythus

O *B.forsythus* foi primeiramente descrito em 1979 (TANNER et al, 1979) como um Bacteróides “fusiforme”. Esta espécie era difícil de crescer, muitas vezes necessitando de 7-14 dias para desenvolver pequenas colônias. O microrganismo é um bastonete altamente pleomórfico, fusiforme, anaeróbico, Gram-negativo. O crescimento do microrganismo demonstrou ser intensificado pela co-cultivação com o *F.nucleatum* e certamente associa-se comumente com esta espécie nos sítios subgengivais (SOCRANSKY et al, 1988). Observou-se que a espécie possui uma necessidade incomum de ácido N-acetilmurâmico (WYSS, 1989). A inclusão deste fator no meio de cultura intensifica amplamente o seu crescimento. O microrganismo foi observado em maior número nos sítios de doença periodontal destrutiva do que em sítios saudáveis, ou com gengivite (LAI et al, 1987). Além disso, o *B.forsythus* foi detectado mais

freqüentemente e em maior número em lesões periodontais ativas do que em lesões inativas (DZINK et al, 1988).

Inicialmente, pensava-se que o *B.forsythus* era uma espécie subgingival relativamente incomum. Entretanto, os estudos de GMUR et al (1989), utilizando anticorpos monoclonais para relacionar a espécie diretamente em amostras de placa, sugeriram que a espécie era mais comum do que observado previamente nos estudos de cultura e seus níveis eram fortemente relacionados ao aumento da profundidade da bolsa. O mesmo não era freqüentemente observado nas amostras de células epiteliais em indivíduos sadios. Em experimentos duplamente-marcados foi demonstrado que o *B.forsythus* estava tanto sobre, quanto no interior das células epiteliais da bolsa periodontal indicando a habilidade de invasão da espécie. LISTGARTEN et al (1993) observaram que a espécie mais freqüentemente detectada em quadros “refratários” era o *B.forsythus* . Anticorpos séricos elevados contra *B.forsythus* têm sido observados em pacientes com periodontite (TAUBMAN et al, 1992) e muitas vezes extremamente elevados em indivíduos com doença periodontal refratária.

O papel desta espécie nas doenças periodontais está sendo esclarecido através de estudos em desenvolvimento por diversos laboratórios envolvendo métodos não-culturais de enumeração, tais como sondas de DNA ou métodos

imunológicos. Por exemplo, GROSSI et al (1994, 1995) consideraram o *B.forsythus* como sendo o **fator de risco microbiano mais significativo** que distingue indivíduos com periodontite daqueles que se apresentam periodontalmente saudáveis.

Estudos em desenvolvimento na “State University of New York” em Buffalo indicam que o *B.forsythus* é o principal fator de risco microbiano para a progressão da doença periodontal em adultos. Assim, existe uma evidência crescente de que o *B.forsythus* é um importante patógeno periodontal.

Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens

O *P.intermedia* é o segundo *Bacteroides* que se pigmenta de preto a atrair considerável interesse na patogênese das doenças periodontais destrutivas. Os níveis desse bastonete arredondado anaeróbico Gram-negativo têm demonstrado ser particularmente elevados na gengivite ulcerativa necrosante aguda (LOESCHE et al, 1982) e em certas formas de periodontite (DZINK et al, 1983; MOORE et al, 1985).

Anticorpos séricos elevados desta espécie têm sido observados em alguns, mas não em todos os indivíduos com periodontite refratária (HAFFAJEE et al, 1988b). Esta distinção torna os estudos iniciais desta “espécie” de difícil interpretação já que os dados das duas diferentes espécies podem ter sido agrupados inadvertidamente. No entanto, novos estudos discriminando as

espécies em amostras de placa subgengival podem fortalecer a relação de uma ou ambas as espécies na patogênese das doenças periodontais.

Fator de Risco para Doença Periodontal-

GROSSI et al, (1994,1995) observaram que *B. forsythus* e *P. gingivalis* estavam positivamente associados com a perda óssea em 1.426 indivíduos com mais de 24 anos de idade.

HAFFAJEE et al, (1983), demonstraram um risco elevado de progressão de doença periodontal com perda de inserção em sítios que apresentaram presença de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*.

Um dos fatores do hospedeiro que influenciam o meio subgengival é a profundidade da bolsa periodontal. O *B. forsythus* e o *P. gingivalis* aumentam notavelmente em prevalência e quantidade com o aumento da profundidade da bolsa (SOCRANSKY & HAFFJEE, 1991)

Doenças sistêmicas debilitantes podem alterar a habilidade do hospedeiro em lidar com infecções e podem exacerbar infecções existentes. (GREENSPAN & GREENSPAN, 1993).

Principais Testes Utilizados no Diagnóstico Microbiológico

Existem atualmente inúmeras metodologias para a detecção de microrganismos periodontopatogênicos. Podemos citar como principais: 1) avaliação microscópica da microbiota; 2) cultura microbiana; 3) testes

enzimáticos (BANA=N-Benzoyl-DL-Arginine-2-Naphthylamide); 4) métodos imunológicos; 5) detecção molecular (sonda de DNA e Reação de Polimerase em cadeia =**PCR**).

A reação de polimerase em cadeia (**PCR**), desenvolvido por MULLIS & FALOONA em 1987 , consiste na ampliação *in vitro* de seqüências conhecidas de nucleotídeos (“primer”) de DNA ou RNA através de repetidos ciclos de denaturação, anelamento e extensão dos mesmos por meio da polimerase do DNA.

O PCR tem se apresentado como um valioso instrumento na detecção e identificação de bactérias e vírus associados às doenças periodontais (ASHIMOTO et al, 1996; LOTUFO et al, 1994). A extrema sensibilidade e especificidade desta técnica permitem a detecção de 10 patógenos entre 10^6 de outros microrganismos (GUMERLOCK et al, 1991).

VI- PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar através de parâmetros clínicos e microbiológicos (**PCR**) as condições periodontais associadas a pacientes submetidos a tratamento com anéis e braquetes ortodônticos na clínica de Ortodontia da FOP/UNICAMP.



VII- MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas dez pacientes da clínica de Pós Graduação e Especialização de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, durante o ano de 2001.

1-Seleção da amostra:

Os pacientes foram selecionados segundo os seguintes critérios de inclusão:

-) idade: entre 12 e 20 anos
-) pacientes em tratamento ortodôntico, na fase final de remoção do aparelho
-) não receberam antibiótico nos 3 meses anteriores ao início do estudo
-) não receberam nenhuma medicação sistêmica
-) não receberam tratamento periodontal nos 3 meses anteriores ao início do estudo.
-) não possuíam o hábito de fumar
-) **apresentavam sinais clínicos de inflamação gengival**
-) forneceram consentimento formal para a participação no estudo

Aspectos Éticos

O estudo foi iniciado após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP - UNICAMP, sendo que todos os participantes foram informados da natureza da pesquisa e sobre seus benefícios e possíveis riscos.

2-Coleta de dados:

Todos os indivíduos foram atendidos na Clínica de Ortodontia da FOP/UNICAMP. No exame clínico foi feito o levantamento dos seguintes parâmetros clínicos: índice de placa dental - (IP); índice sangramento sondagem – (ISS) e profundidade de sondagem –(PS).

Índice de placa (IP) SILNESS & LÖE,1964

0 - nenhuma placa na área gengival

1 - uma película de placa aderida à margem gengival livre e à área adjacente do dente. A placa pode ser reconhecida apenas correndo-se uma sonda pela superfície do dente.

2 - Acúmulo moderado de placa na margem gengival livre e à área adjacente do dente. A placa pode ser vista a olho nu.

3 - abundância de placa na margem gengival livre e à área adjacente do dente.

Índice de sangramento à sondagem (ISS) AINAMO&BAY,1975

Determina a presença ou ausência de sangramento gengival, utilizando uma sonda periodontal passando horizontalmente na face vestibular.

Profundidade de Sondagem (PS)

As áreas avaliadas foram lavadas com um leve jato de água, para remover os depósitos livres. Logo após foi feita a coleta para os testes microbiológicos. Na seqüência foram avaliados os parâmetros clínicos. Para avaliar a profundidade

de sondagem foi utilizada sonda periodontal de Williams, medindo-se três pontos na vestibular, ficando o ponto mais profundo como representante da área.

3- Grupos de Estudo

Grupo Teste: avaliação clínica e microbiológica nos dentes 16-11-26 com aparelho ortodôntico (16 e 26 com bandas e 11 com braquetes) e **com inflamação gengival**.

Grupo Controle: Os mesmos dentes receberam profilaxia profissional no momento da retirada do aparelho e os pacientes receberam instruções sobre a técnica de escovação sulcular (Técnica de Bass), para devolver **saúde gengival**.

Após **30 dias**, a avaliação clínica e microbiológica foi novamente realizada.

4- Amostragem microbiológica

Foi utilizado para o presente estudo a face vestibular dos dentes 16 -11 - 26, como amostragem dos fenômenos inflamatórios e microbiológicos. Neste trabalho foi pesquisada a presença nas áreas experimentais das seguintes bactérias (patógenos periodontais):

Porphyromonas gingivalis (Pg)

Bacteroides forsythus(Bf)

Actinobacillus actinomycetemcomitans(Aa)

Prevotella intermedia(Pi)

Prevotella nigrescens(Pi)

5-Teste Microbiológico - PCR (reação de polimerase em cadeia)

Coleta das amostras

As coletas foram realizadas nas faces vestibulares dos dentes –16-11-26, sendo que na região supragengival foi utilizado um cotonete (SWABS) e na região subgengival uma foice reta (ponta Morse 0/00) .

Amostras da placa supra/subgengival foram coletadas e imediatamente colocadas em um tubo tipo Eppendorf codificados, com capacidade de 1,5 ml contendo 300 μ l de uma solução tampão (PBS) esterilizada. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da FOP- UNICAMP, onde foram congeladas a – 20°C. A avaliação microbiológica utilizou a reação de polimerase em cadeia – PCR. Esta técnica baseia-se em reações enzimáticas cíclicas de desnaturação pelo calor, hibridização dos oligonucleotídeos e síntese enzimática de DNA, resultando na amplificação exponencial da sequência de DNA desejado, permitindo a identificação de seqüências de genes específicos, tais como genes de espécies bacterianas.

Análise microbiológica

A análise microbiológica foi realizada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o objetivo de detectar *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*. Os “primers” (Life Technologies

do Brasil Ltda.) foram sintetizados segundo as seqüências descritas na tabela 1. Reações de PCR com “primers” específicos para cada uma das cinco bactérias foram processadas utilizando-se amostras do DNA genômico purificado de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC29522), *B. forsythus* (ATCC 43037), *P. gingivalis* (ATCC 33277), *P. intermedia*(ATCC), *P. nigrescens* (NCTC 9336) como controle positivo, e água bi-destilada como controle negativo.

Actinobacillus actinomycetemcomitans	5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'
Bacteroides forsythus	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'
Porphyromonas gingivalis	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'
Prevotella intermedia	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TAC ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'
Prevotella nigrescens	5' TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3' 5' ATG GCG AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3'

Extração de DNA das amostras

Todas as amostras foram homogeneizadas ao vórtex por 1 minuto. As amostras de placa supragengival tiveram os *swabs* retirados com auxílio de pinça clínica esterilizada. Em seguida, todas as amostras foram centrifugadas (10.000 r.p.m. / 5 min/ 4 °C) e o sobrenadante retirado. Aos tubos de

“eppendorf”, com as T.E., e as mesmas foram homogeneizadas ao vórtex por 30 segundos. Em amostras clínicas, foram adicionados 100 µL de tampão. Os tubos com as amostras foram submetidos a um banho de fervura por 10 minutos.

A PCR foi processada usando-se 5 µL das amostras adicionados à 45µL de uma mistura de reagentes contendo água deionizada bi-destilada, 5,0µL de solução tampão (10X Reaction Buffer, Taq DNA Polymerase – Gibco BRL, Life Technologies), 1,5 mM MgCl₂ (Taq DNA Polymerase – Gibco BRL, Life Technologies), 0.2 mM de cada dNTP (Gibco BRL, Life Technologies), 2 µM de cada "primer" e 2U Taq DNA Polymerase (Gibco BRL, Life Technologies).

Em seguida, esta mistura reagente foi submetida a um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer) de acordo com a seguinte programação:

- *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia* (ASHIMOTO *et al.*, 1996): A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 95°C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos – fase de desnaturação a 94°C por 30 segundos, fase de hibridização dos “primers” a 55°C por 1 minuto, e fase de extensão a 72°C por dois minutos – finalizando a reação a 72°C por 10 minutos.

- *B. forsythus* (ASHIMOTO *et al.*, 1996): A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 95°C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos – fase de desnaturação a 95°C por 30 segundos, fase de hibridização dos “primers” a 60°C

por 1 minuto, e fase de extensão a 72°C por 1 minuto – finalizando a reação a 72°C por 2 minutos.

-*P.gingivalis* (BENKIRANE *et al.*, 1996): A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos – fase de desnaturação a 94°C por 30 segundos, fase de hibridização dos “primers” a 70°C por 1 minuto, e fase de extensão a 72°C por 30 segundos, finalizando a reação a 72°C por 2 minutos.

- *P. nigrescens* (GUILLOT & MOUTON, 1997): A reação inicia-se com a desnaturação do DNA a 95°C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos – fase de desnaturação a 95°C por 30 segundos, fase de hibridização dos “primers” a 65°C por 1 minuto, e fase de extensão a 72°C por 1 min, finalizando a reação a 72°C por 2 minutos.

Eletroforese

As amostras, após a reação de PCR, foram conservadas a 4°C ou analisadas imediatamente por eletroforese em gel de agarose 1% (Gibco BRL - Life Technology) em tampão tris-borato-EDTA. Foi incluído, em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 pb ou 1 Kb (DNA ladder, Gibco BRL - Life Technology). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta.

6-Análise Estatística

Comparações foram realizadas entre os dados obtidos no exame inicial (teste) e final (controle), 30 dias após a remoção do aparelho para determinar as possíveis diferenças nos parâmetros avaliados. Os dados foram submetidos ao Teste de McNemar ($\alpha=0,05$)

VIII- RESULTADOS

Os resultados foram expressos em forma percentual dos exames do PCR quanto aos testes com marcação positiva e negativa.

Resultados iniciais e finais (PCR) dos dez pacientes, sendo três dentes examinados em cada um (11-16-26) nos quais foram realizados seis testes por paciente (três supragengival e três subgengival) perfazendo sessenta testes. Em cada teste foram utilizados cinco microrganismos perfazendo um total de trezentos testes, em cada tempo de pesquisa.

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

TESTES (PCR) - SUPRA e SUBGENGIVAL (positivos)

Tabela 1. Frequências e % de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais das amostras de placa supra e subgengival.

Microrganismo	Inicial (n=60)		Final (n=60)		p (McNemar)
	Frequência	%	Frequência	%	
Aa	36	60,00	4	6,66	0,0000**
Bf	43	71,66	20	33,33	0,0056**
Pg	09	15,00	6	10,00	0,6056
Pi	04	6,66	4	6,66	0,9247
Pn	8	13,33	12	20,00	0,5023

** Diferença estatisticamente significativa entre o inicial e final ($p < 0,01$ teste de McNemar)

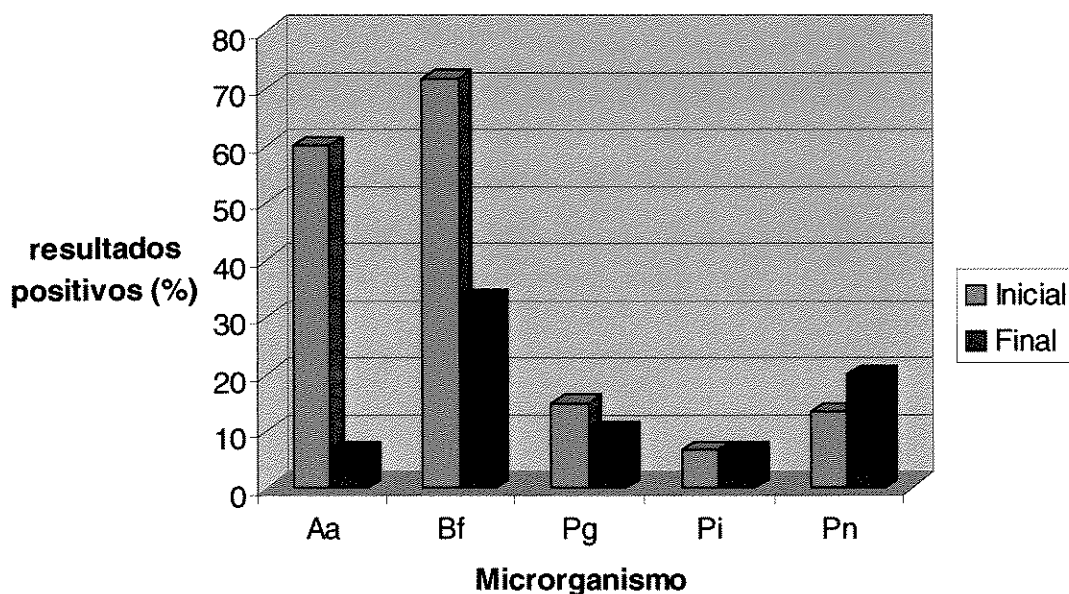


Figura 1. Porcentagem de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais (supra e subgingival)-PCR.

TESTES (PCR) – SUPRAGENGIVAL (positivos)

Tabela 2. Frequências e % de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais das amostras de placa supragengival.

Microrganismo	Inicial (n=60)		Final (n=60)		p (McNemar)
	frequência	%	frequência	%	
Aa	16	53,33	01	3,33	0,0007**
Bf	18	60,00	05	16,66	0,0123*
Pg	04	13,33	00	0,00	0,1336
Pi	02	6,66	01	3,33	1,000
Pn	03	10,00	02	6,66	1,000

* Diferença estatisticamente significativa entre o inicial e final ($p < 0,05$ teste de McNemar)

**** Diferença estatisticamente significativa entre o inicial e final ($p < 0,01$ teste de McNemar)**

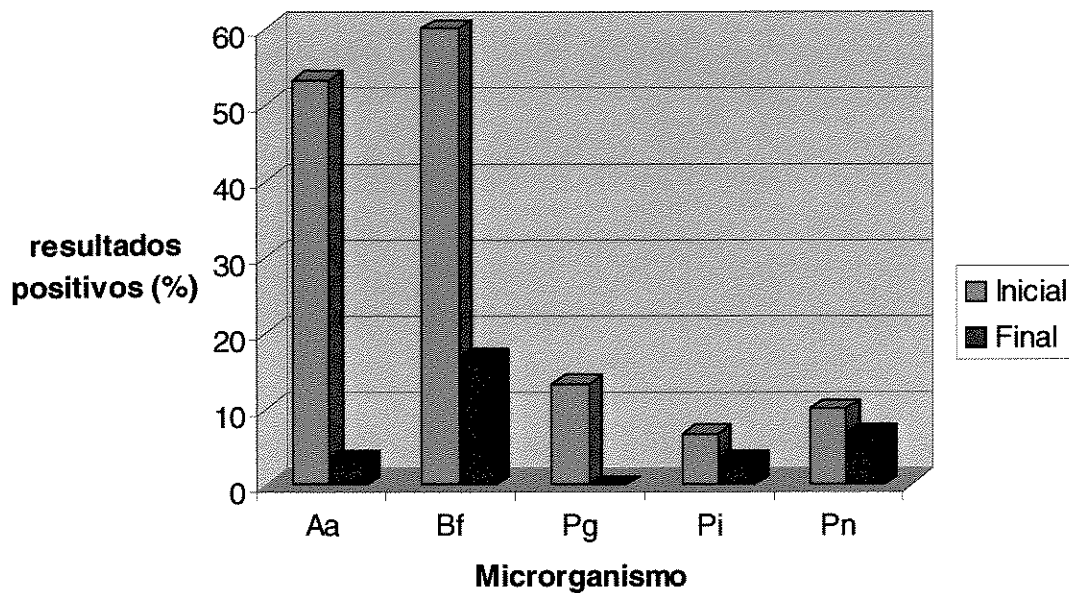


Figura 2. Porcentagem de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais (supra gengival)-PCR.

TESTES (PCR)– SUBGENGIVAL (positivos)

Tabela 3. Frequências e % de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais nas amostras de placa subgengival.

Microrganismo	Inicial (n=60)		Final (n=60)		p (McNemar)
	frequência	%	frequência	%	
Aa	20	66,66	03	10,00	0,0009**
Bf	25	83,33	15	50,00	0,1547
Pg	05	16,66	06	20,00	1,000
Pi	02	6,66	03	10,00	1,000
Pn	05	16,66	10	33,33	0,3017

* Diferença estatisticamente significativa entre o inicial e final ($p < 0,05$ teste de McNemar)

** Diferença estatisticamente significativa entre o inicial e final ($p < 0,01$ teste de McNemar)

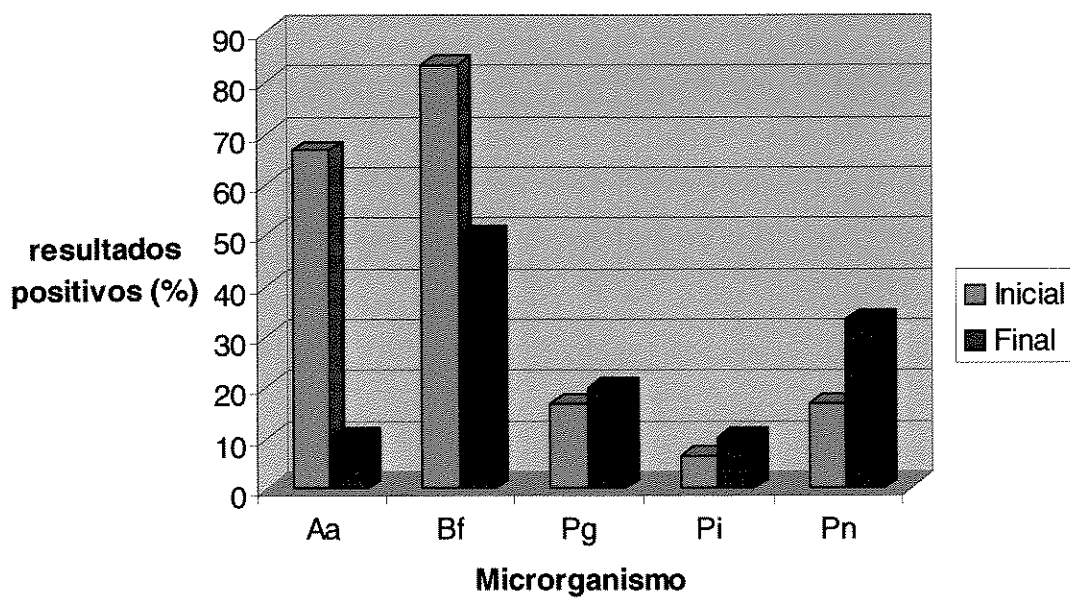


Figura 3. Porcentagem de resultados positivos nas avaliações iniciais e finais (sub gengival)-PCR.

RESULTADOS CLÍNICOS

ÍNDICE DE SANGRAMENTO À SONDAGEM

Tabela 4. Índice de sangramento a sondagem nas avaliações inicial e final

	Frequência	%
Inicial	30	100,00
Final	07	23,33

$p=0,0003^*$

*significativa a diferença entre inicial e final pelo teste de McNemar ($p<0,01$)

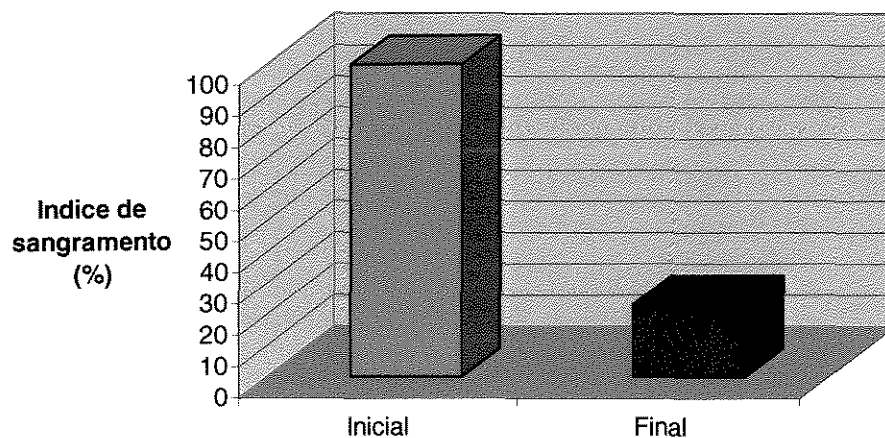


Figura 4. Índice de sangramento a sondagem (%) nas avaliações inicial e final

ÍNDICE DE PLACA

Tabela 5. Índice de placa (frequências) entre avaliações inicial e final.

	Índice de placa			
	0	1	2	3
Inicial	0 (0,0%)	05 (16,67%)	09 (30,0%)	16 (53,33%)
Final	24 (80,0%)	06 (20,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

P= 0,0000*

*significativa a diferença entre inicial e final pelo teste do sinal ($p < 0,01$)

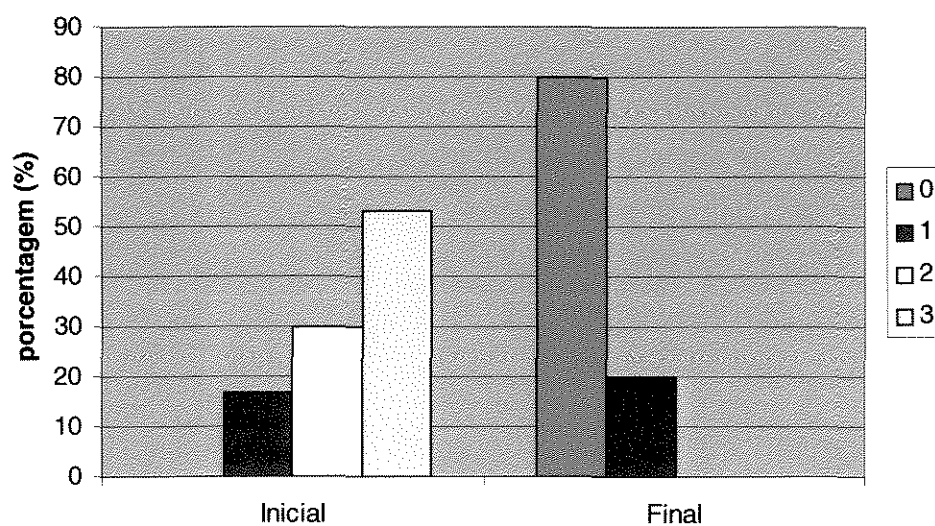


Figura 5. Índice de placa (%) nas avaliações inicial e final

PROFUNDIDADE DE SONDAGEM

Tabela 6. Profundidade de sondagem (mm) nas avaliações inicial e final.

	Média	Desvio padrão
Inicial	2,50	0,508
Final	1,92	0,417

P= 0,0000*

*significativa a diferença entre inicial e final pelo teste t pareado ($p < 0,01$)

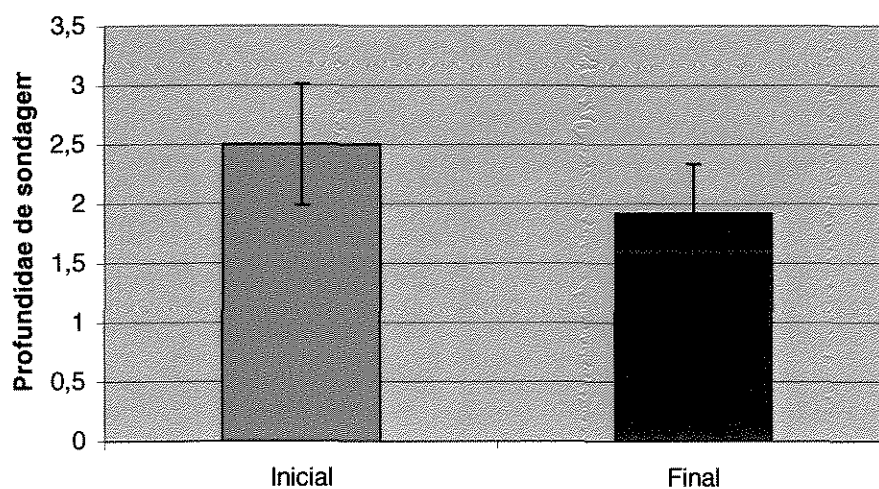


Figura 6. Profundidade de sondagem nas avaliações inicial e final

Ilustrações Clínicas

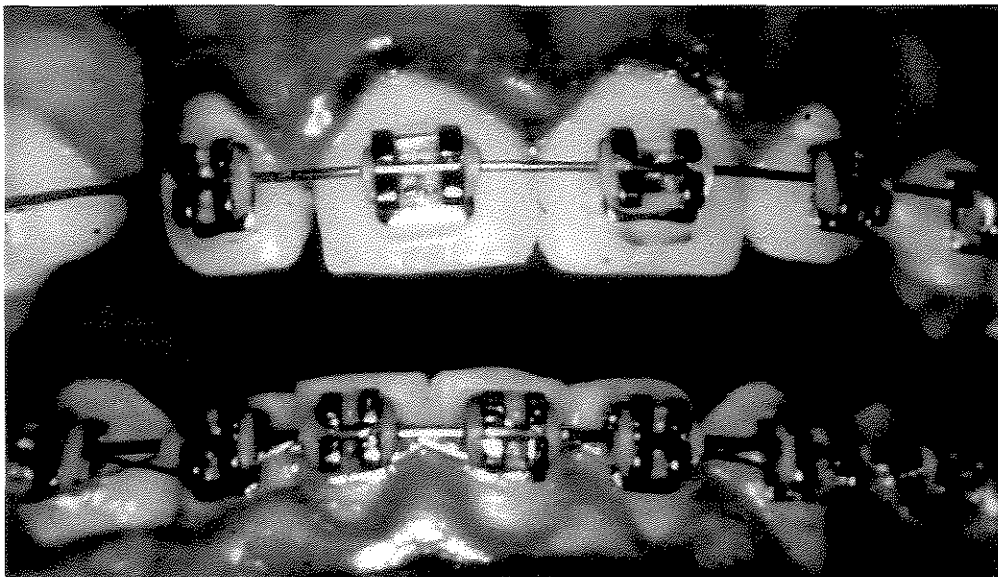


Figura 7- Aspecto clínico inicial de um paciente selecionado.



Figura 8- Aspecto clínico final do mesmo paciente já tratado.

IX- DISCUSSÃO

Na inter-relação da ortodontia com a Periodontia, um aspecto importante é a constatação de que a saúde gengival pode ser comprometida quando bandas ortodônticas são colocadas (ALEXANDER, 1991; ZACHRISSON, 1976; BOYD & BAUMRIND, 1992). A maioria dos estudos nesta área se concentra na descrição dos parâmetros clínicos e índices como o índice de placa (SILNESS & LÖE, 1964), índice gengival (LÖE & SILNESS, 1963) e profundidades de sondagem. Considerando que existem evidências que suportam a idéia de que bactérias específicas podem ser responsáveis pela produção da doença periodontal (SLOTS, 1979; LISTGARTEN & HELLDÉN, 1978; SLOTS & LISTGARTEN, 1988), parece importante a investigação das alterações na microbiota associadas ao uso de bandas ortodônticas. Entretanto, poucas investigações foram feitas para rever a placa associada com as mudanças clínicas observadas após a colocação de aparelhos ortodônticos, talvez pelas dificuldades envolvidas na identificação das bactérias que predominam nas culturas (RUSSELL, 1992).

Estudos retrospectivos de longa duração mostraram que danos significativos não poderiam ser atribuídos ao tratamento ortodôntico bem como a falta de tratamento ortodôntico teria pouca influência na doença periodontal

em fases tardias da vida (SADOWSKY & BEGOLE, 1981; POLSON et al, 1988). Entretanto, ALSTAD E ZACHRISSON (1979) relataram que até 10% dos indivíduos tratados ortodonticamente mostraram destruição periodontal. Assim, se o tratamento pode causar deterioração significativa da saúde periodontal em uma parte dos pacientes, parece ser importante identificar os fatores associados a esta situação para que se possa preveni-la.

A transição de gengivite para doença periodontal destrutiva ainda não foi demonstrada experimentalmente em humanos. Através de modelos animais, sabe-se que a gengivite desenvolve-se como resultado do acúmulo de placa bacteriana (EGELBERG, 1965) e, se for permitida a sua evolução por um período suficientemente longo, pode ocorrer destruição permanente dos tecidos de suporte dos dentes (SAXE et al, 1967; LINDHE et al, 1973). Estes resultados indicam que a doença periodontal destrutiva pode originar-se de uma gengivite de longa duração, confirmando assim a importância do controle da inflamação.

Com o surgimento de novos agentes de união direta, os aparelhos fixos poderiam influenciar menos a saúde gengival. Entretanto, o uso de bandas ainda é comum em molares, com suas margens geralmente posicionadas sub gengivalmente. Independente do nível de higiene oral, quando um aparelho fixo é colocado, a maioria dos pacientes desenvolve gengivite generalizada dentro de

um curto período de tempo após a colocação (POLSON et al, 1988; BAER & COCCARO, 1964; BOYD & BAUMRIND, 1992; MIZRAHI, 1982).

A mudança qualitativa na microbiota, com o surgimento de bactérias associadas à doença justificaria a inflamação observada ao redor de bandas mesmo em pacientes com excelente controle da placa supragengival (BAER & COCCARO, 1964). Estas observações justificam a necessidade de se examinar populações bacterianas específicas na placa subgengival associadas com as bandas ortodônticas.

Portanto, o presente estudo examinou os aspectos clínicos e microbiológicos durante e após a remoção de aparelhos ortodônticos em pacientes que apresentavam inflamação gengival. As comparações foram realizadas entre dois momentos: durante o uso do aparelho ortodôntico e na presença de inflamação gengival (inicial/teste) e 30 dias após a remoção do mesmo, após restabelecimento da saúde gengival (final/controle). Os mesmos sítios foram avaliados nos dois momentos, nos mesmos pacientes, o que evita a variabilidade entre os pacientes.

Quando as amostras de placa supra e subgengival foram consideradas de forma conjunta, os resultados revelaram uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de áreas positivas para o *Aa* e *Bf*.

No período inicial, o *Aa* estava presente em 60% das áreas examinadas, sendo que no período final apenas 6,6% das áreas apresentavam este patógeno ($P<0.05$). As áreas que apresentavam o *Bf* foram reduzidas de 71,6% para 33,3% ($P<0.05$). Os demais patógenos avaliados não apresentaram mudanças significativas. A avaliação realizada somente com a placa supragengival revelou redução significativa na porcentagem de áreas positivas para o *Aa* (53,3% para 3,3%) e *Bf* (60,0% para 16,6%). Os demais patógenos avaliados na placa supra gengival não apresentaram diferenças significativas entre os períodos iniciais e finais. A avaliação da placa subgengival revelou uma redução significativa nas áreas positivas para o *Aa* (66,6% para 10%) após a remoção do aparelho e restabelecimento da saúde gengival. As diferenças entre os períodos não foram significativas para *Bf*, *Pg*, *Pi* e *Pn* para a placa subgengival.

A presença do *Aa* em mais da metade das áreas avaliadas no presente estudo suporta a idéia de que as bandas ortodônticas poderiam influenciar a microbiota subgengival, tornando-a mais agressiva. A maior probabilidade de detecção deste patógeno na presença de sinais clínicos de inflamação foi previamente relatada (MONBELLI et al, 1995) e esta de acordo com as observações deste estudo onde se utilizou pacientes que apresentavam inflamação gengival no período inicial. Entretanto, existem outros autores que

relataram que o *Aa* esteve fracamente associado com placa bacteriana e sangramento a sondagem (BONTA et al, 1985; SHILOAH & PATTERS, 1997).

Importante também é ressaltar que o *Aa* é reconhecido como um possível patógeno periodontal por sua elevada frequência de detecção e números elevados em lesões de periodontite juvenil localizada (CHUNG et al, 1989; NEWMAN & SOCRANSKY 1977; SLOTS, 1976). A associação destes patógenos com formas agressivas de doença periodontal poderia ser justificada em parte pela capacidade de invadir as células epiteliais gengivais humanas cultivadas *in vitro* (BLIX et al, 1992; SREENIVASAN et al, 1993). Entretanto, existem evidências de que mediadores da resposta imune são também participantes nos resultados destrutivos associados a este patógeno, demonstrando a dependência da participação do hospedeiro (ZADEH et al, 1999). Ou seja, é possível que o *Aa* esteja presente até mesmo em indivíduos clinicamente normais sendo que sua interação com o sistema imune parece ser fundamental para o entendimento da patogênese da doença periodontal. A sua presença pode ser considerada como um *fator de risco* a saúde periodontal que deve ser observado pelo profissional dedicado a ortodontia. A demonstração da sua redução após a remoção do aparelho e restituição da saúde periodontal enfatiza a importância de medidas eficientes de controle da inflamação durante o tratamento ortodôntico.

A importância do *Bf* no desenvolvimento da doença periodontal também não pode ser subestimada. Sabe-se que este microrganismo foi observado em maior número nos sítios de doença periodontal destrutiva do que em sítios saudáveis, ou com gengivite (LAI et al, 1987). Além disso, o *B.forsythus* foi detectado mais frequentemente e em maior número em lesões periodontais ativas do que em lesões inativas (DZINK et al, 1988). LISTGARTEN et al, (1993) observaram que a espécie mais frequentemente detectada em quadros “refratários” era o *B.forsythus*. GROSSI et al (1994, 1995) consideraram o *B.forsythus* como sendo o *fator de risco microbiano mais significativo* que distingue indivíduos com periodontite daqueles que se apresentam periodontalmente saudáveis. Por todas estas razões, a redução da presença deste microorganismo como a observada no presente estudo parece ser importante para diminuir o risco a futuras perdas de inserção periodontal.

Uma redução estatisticamente significativa nas áreas que apresentavam sangramento gengival foi observada entre os períodos iniciais e finais (100% para 23,3%, respectivamente). No período inicial, as áreas que apresentavam escores 2 e 3 para o índice de placa constituíam 80,3% das áreas avaliadas enquanto que no período final, o escore 1 foi observado em 80% das áreas, mostrando redução significativa na presença da placa supragengival. A redução nos índices de placa e sangramento, demonstra a correlação positiva entre

quantidade de placa bacteriana e gravidade da gengivite (ASH et al, 1994) bem como reforçam os achados de estudos que demonstraram que procedimentos intensivos de controle de placa são essenciais para erradicação da gengivite clínica (LÖE et al, 1965).

Diferença estatisticamente significativa foi observada entre a profundidade de sondagem média inicial (2,5mm) e final (1,9mm), demonstrando uma redução média de 0,6 mm, obtida após restituição da saúde gengival. Este dado corrobora as observações de BAER & COCCARO (1964) que notaram a ocorrência de aumento gengival logo após a colocação de aparelhos ortodônticos fixos que geralmente desaparecia após a remoção do aparelho. Outros autores (KLOEHN & PFEIFER, 1974; ZACHRISSON & ZACHRISSON, 1972; ALEXANDER, 1991) também observaram este aumento e sugeriram que o fenômeno explicaria o aumento na profundidade de sondagem encontrado durante o tratamento, não sendo entretanto associado a perdas de inserção. Portanto, as mudanças na profundidade de sondagem poderiam ser justificadas pela resolução da inflamação e edema. A diminuição da profundidade de sondagem também poderia contribuir para mudanças qualitativas observadas na placa subgengival.

Apesar de que apenas a cultura poderia determinar os números relativos e absolutos de microorganismos, possibilitando a obtenção de cepas padrão e a

realização de antibiogramas, o PCR tem se apresentado como um valioso instrumento na detecção e identificação de bactérias e vírus associados às doenças periodontais (ASHIMOTO et al, 1996; LOTUFO et al, 1994). A extrema sensibilidade e especificidade desta técnica permitem a detecção de 10 patógenos entre 10^6 de outros microrganismos (GUMERLOCK et al, 1991).

Este estudo demonstrou a efetividade da aplicação desta técnica para a identificação da presença de patógenos periodontais em pacientes em tratamento ortodôntico e inflamação gengival. A observação da presença de patógenos periodontais como o *Aa* e o *Bf* nestes pacientes chama a atenção para a importância do conhecimento do *perfil microbiológico* dos mesmos, com vistas ao monitoramento individualizado durante o tratamento ortodôntico bem como o desenvolvimento de métodos de manutenção mais eficientes e específicos.

O conhecimento dos fatores de risco a destruição periodontal parece ser o caminho para a prevenção de problemas periodontais que poderiam comprometer o sucesso do tratamento ortodôntico. A observação feita no presente estudo de que estes patógenos periodontais podem ser significativamente reduzidos pela eliminação de fatores de retenção de placa e medidas eficientes de higienização indicam que os esforços para o desenvolvimento de novas formas de fixação e regimes de manutenção durante o tratamento ortodôntico são essenciais.

X- CONCLUSÕES

- 1- O teste molecular através do PCR demonstrou ser útil como um auxiliar no diagnóstico microbiológico na prática clínica.
- 2- A presença do aparelho fixo é fator de retenção de placa levando ao aparecimento de inflamação gengival.
- 3- A presença de inflamação gengival pode estar associada a presença de periodontopatógenos, demonstrada pelo PCR.
- 4- A remoção do aparelho fixo ortodôntico, realização de profilaxia profissional e a motivação para higiene bucal proporcionam uma diminuição estatisticamente significativa do *Aa* e *Bf*.
- 5- A remoção dos aparelhos fixos, a profilaxia profissional e a motivação para higiene bucal levam a saúde periodontal na maioria dos pacientes, caracterizada pela diminuição significativa nos índices de placa e de sangramento gengival, bem como nas profundidades de sondagem.
- 6- O controle de placa em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos é de extrema importância para diminuir o risco de doença periodontal.

XI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY M, GRIFFITHS GS, DUMMER PMH, et al.. The association between tooth irregularity and plaque accumulation, gingivitis, and caries in 11-12-year-old children. **Eur J Orthod** ;10:76-83.1988.

ALEXANDER AG, TIPNIS AK. The effect of irregularity of teeth and the degree of overbite and overjet on gingival health. **Br Dent J** ;128:539-547,1970.

ALEXANDER SA. Effects of orthodontic attachments on the gingival health of permanent second molars. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**;100:337-340, 1991.

ALSTAD S, ZACHRISSON BU. Longitudinal study of periodontal conditions associated with orthodontic treatment in adolescents. **Am J Orthod** ;76:277-286,1979.

ALTMAN, L.C., PAGE, R.C., EBERSOLE, J.L. & VANDESTEEN, E.G.. Assessment of host defenses and serum antibodies to suspected periodontal pathogens in patients with various types of periodontitis. **Journal of Periodontal Research** 17, 495-497, 1982.

ASH, M. M. JR., GITLIN, B.N. & SMITH. W. A.. Correlation between plaque and gingivitis. **Journal of Periodontology**, 35,424-429, 1964.

ASHIMOTO,A.,et al. Polymerase Chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis . **Oral Microbiol. Immunol.**, 11: 266-386, 1996.

BAER PN, COCCARO J. Gingival enlargement coincident with orthodontic therapy. **J. Clinical of Periodontol**; 35:436-439, 1964.

BALENSEIFEN JW, MADONIA JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. **J Dent Res**; 49:320-324, 1970.

BEAGRIE GS, JAMES GA. The association of posterior tooth irregularity and periodontal disease. **Br Dent J**;113:239-243, 1962.

BLIX, I.J., HARS, R., PREUS, H.R. & HELGELAND, K.. Entrance of Actinobacillus actinomycetemcomitans into HEP-2 cells in vitro. **Journal of Periodontology** 63, 723-728, 1992.

BLOOM RH, BROWN LR. A study of the effects of orthodontic appliances on oral microbial flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** ;17:658-667, 1964.

BONTA Y. et al. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans. **J Dent Res** 64(5): 793-8, 1985.

BOYD RL, BAUMRIND S. Periodontal considerations in the use of bands or bonds on molars in adolescents and adults. **Angle Orthod**;62:117-126, 1992.

BOYD RL. Longitudinal evaluation of a system for self-monitoring plaque control effectiveness in orthodontic patients. **J Clin Periodontol**;10:380-388, 1983.

BURDON K.L.. Bacterium melaninogenicum from normal and pathologic tissues. **Journal of Infections Diseases** 42, 161-171, 1928.

CHRISTERSSON, L.A., SLOTS, J. ROSLING, B.G. & GENCO, R.J.. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology** 12, 465-476, 1985.

CHUNG, H.J., CHUNG, C-P., SON, S-H. & NISENGARD, R.J.. Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. **Journal of Periodontology** 60, 506-511, 1989.

CORBETT JA, BROWN LR, KEENE HJ, HORTON IM. Comparison of Streptococcus mutans concentrations in non-banded and banded orthodontic patients. **J Dent Res** 1981;60:1936-1942.

DIAMANTI-KIPIOTI A, GUSBERTI FA, LANG NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. **J Clin Periodontol**;14:326-333, 1987.

DUNCAN, M.J., NAKAO, S., SKOBE, Z. & XIE, H.. Interactions of Porphyromonas gingivalis with epithelial cells. **Infection and Immunity** 61, 2260-2265, 1993.

DZINK, J.L., GIBBONS, R.J., CHILDS, III W.C. & SOCRANSKY, S.S.. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. **Oral Microbiology and Immunology** 4, 1-5, 1989.

DZINK, J.L., SOCRANSKY, S.S. & HAFFAJEE, A.D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology** 15, 316-323, 1988.

DZINK, J.L., SOCRANSKY, S.S., EBERSOLE, J.L. & FREY, D.E.. ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented *Bacteroides* isolated from periodontal pockets. **Journal of Periodontal Research** 18, 369-374, 1983.

EBERSOLE, J.L., TAUBMAN, M.A. & SMITH, D.J.. Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms. II. **Distribution and specificity of local antibody responses.** **Journal of Periodontal Research** 20, 349-356, 1985.

FLORES DE JACOBY L, MÜLLER HP Zusammensetzung der subgingivalen mundflora bei Trägern abnehmbarer kieferorthopädischer Geräte. **Deutsche Zahnärztl. Zeitschrift** ;37:925-928, 1982.

EGELBERG, J. Local effect of diet on plaque formation and development of gingivitis in dogs. Part I Effect of hard and soft diets. **Odont. Revy**, 16: 31-41, 1965.

FOLIO J., RAMS, T.E., KEYES, P.H. Orthodontics Therapy in patients with juvenile periodontitis: clinical and microbiologic effects. **AM. J. Orthod**, Saint Louis, V. 87, N.5, p. 421 – 431, 1985.

GENCO, R.J., SLOTS, J. & MOUTON, C. **Systemic immune responses to oral anaerobic organisms**. In: LAMBE, D.W., JR, GENCO, R.J. & MAYBERRY-CARSON, K.J. ed. **Anaerobic bacteria: selected topics**. New York: Plenum Press, pp. 277-293, 1980.

GMUR, R., STRUB, J.R. & GUGGENHEIM, B.. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. **Journal of Periodontal Research** 24, 113-120, 1989.

GRABER., T. M., & VANARSDALL., R.L.. *Ortodontia Princípios e Técnicas Atuais. Inter-relacionamento Ortodontia e Periodontia*, p661. Universidade da Pensilvânia – Philadelphia, 1981.

GREENSPAN, D., & GREENSPAN, J.S.. Oral manifestation of human immunodeficiency virus infection. **Dental Clinics of North America** 37, 21-32, 1993.

GRIFFITHS GS, ADDY M. Effects of malalignment of teeth in the anterior segment on plaque accumulation. **J Clin Periodontol**;8:81-90, 1981.

GROSSI, S.G., GENCO, R.J., MACHTEI, E.E., HO, A.W., KOCH, G., DUNFORD, R.G., ZAMBON J.J. & HUSMANN, E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for bone loss. **Journal of Periodontology** 66, 23-29, 1995.

GROSSI, S.G., ZAMBON, J.J., HO, A.W., KOCH, G., DUNFORD, R.G., MACHTEI, E.E., NORDERYD, O.M & GENCO, R.J.. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **Journal of Periodontology** 65, 260-267, 1994.

GUMERLOCK ,P.H. **et al** . Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces .**Rev.Infect.Dis.**, 16: 1053-1060, 1991.

GUMERLOCK ,P.H. **et al** . Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces .**Rev.Infect.Dis.**, 16: 1053-1060, 1991.

HAFFAJEE, A. D. SOCRANKY, S.S., & GOODSON, S.M. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal diseases activity. **Journal of Clinical Periodontology** 10, 257-265, 1983.

HAFFAJEE, A.D., DZINK, J.L. & SOCRANSKY, S.S.. Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. **Journal of Clinical Periodontology** 15, 255-262, 1988a.

HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S., DZINK, J.L., TAUBMAN, M.A. & EBERSOLE, J.L.. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology** 15, 390-398, 1988b.

HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S., EBERSOLE, J.L. & SMITH, D.J.. Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. **Journal of Clinical Periodontology** 11, 600-618, 1984.

HUSER MC, BAEHNI PC, LANG R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**;97:213-218, 1990.

KLOEHN JS, PFEIFER JS. The effect of orthodontic treatment on the periodontium. **Angle Orthod**;44:127-134, 1974.

KLOEHN JS, PFEIFER JS. The effect of orthodontic treatment on the periodontium. **Angle Orthod**;44:127-134, 1974.

LAI, C-H., LISTGARTEN, M.A., SHIRAKAWA, M. & SLOTS, J.. *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology** 2, 152-157, 1987.

LAMONT, R.J., ODA, D. PERSSON, R.E. & PERSSON, G.R.. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. **Oral Microbiology and Immunology** 7, 364-367, 1992.

LEGGOTT PJ, BOYD RL, QUINN RS, EAKLE WS, CHAMBERS DW. Gingival disease patterns during fixed orthodontic therapy: Adolescents vs. adults. **J Dent Res**;63(Spec. Issue):309(Abstr. 1245), 1984.

LINDHE. J., HAFFAJEE, A. D., & SOCRANSKY S.S.. Progression of Periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. **Journal of Clinical periodontology**, 10, 433-442, 1983.

LISTGARTEN MA, HELLDÉN L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. **J Clin Periodontol**;5:115-132, 1978.

LISTGARTEN, M.A., LAI, C-H. & YOUNG, V.. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. **Journal of Periodontology** 64, 155-161, 1993.

LÖE H, SILNESS J. Periodontal disease in pregnancy I: Prevalence and severity. **Acta Odontol Scand** 1963;21:533-551.

LISTGARTEN MA, SCHIFTER C. Differential dark-field microscopy of subgingival bacteria as an aid in selecting recall intervals: Results after 18 months. **J Clin Periodontol**; 9:305-316, 1982.

LOE, H., THEILADE, E. & JENSEN, S.B.. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, 36, 177-187, 1965.

LOESCHE, W.J., SYED, S.A., LAUGHON, B.E. & STOLL, J.. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. **Journal of Periodontology** 53, 223-230, 1982.

LOESCHE, W.J., SYED, S.A., SCHMIDT, E. & MORRISON, E.C.. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. **Journal of Periodontology** 56, 447-456, 1985.

LOTUFO, R.E.M. et al. Prevalence of subgingival periodontopathic bacteria and herpesviruses in remote native Brazilian population. **J.Dent. Res.**, 77:abs.833, 1988.

MAHAMONDA, R., SEYMOUR, G.J., POWELL, L.W., GOOD, M.F. & HALLIDAY, J.W.. Effect of initial treatment of chronic inflammatory periodontal disease on the frequency of peripheral blood T-lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. **Oral Microbiology and Immunology** 6, 221-227, 1991.

MIZRAHI E. Enamel demineralisation following orthodontic treatment. **Am J Orthod**;82:62-67, 1983.

MIZRAHI E. Surface distribution of enamel opacities following orthodontic treatment. **Am J Orthod**;84:323-331, 1982.

MONBELLI A, RUTAR A, LANG NP. Correlation of the periodontal status 6 years after puberty with clinical and microbiological conditions during puberty. **J Clin Periodontol** 22(5): 300-305, 1995.

MOORE, W.E.C.. Microbiology of periodontal disease. **Journal of Periodontal Research** 22, 335-341, 1987.

MOORE, W.E.C., HOLDEMAN, L.V., CATO, E.P., SMIBERT, R.M., BURMEISTER, J.A., PALCANIS, K.G. & RANNEY, R.R.. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. **Infection and Immunity** 48, 507-519, 1985.

MÜLLER HP, FLORES DE JACOBY L. Zusammensetzung der subgingivalen mundflora bei Trägern festsitzender kieferorthopädischer Geräte. **Deutsche Zahnärztl. Zeitschrift**;37:855-860, 1982.

MULLIS,K,B & FALAOONA,F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction .**Methods Enzymol.**, 155; 335:350,1987.

NEWMAN, M.G., SOCRANSKY, S.S. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. **Journal of Periodontal Research** 12, 120-128, 1977.

OLIVER, W.W. & WHERRY, W.B.. Notes on some bacterial parasites of the human mucous membranes. **Journal of Infectious Diseases** 28, 341-345, 1921.

RODENBURG, J.P., VAN WINKELHOFF, A.J., WINKEL E.G., GOENE, R.J., ABBAS, F. & DE GRAFF, J.. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. **Journal of Clinical Periodontology** 17, 392-299, 1990.

SAXE, S.R., GREENE, J.C., BOHANNAN, H. M., & VERMILLION, J. R.. Oral debris calculus and periodontal disease in the beagle dog. **Periodontics** 51, 217-224, 1967.

SCHEI, O., WAERHAUG, J., LOVDAL, A., & ARNO A.. Alveolar bone loss as relate to oral hygiene and age. **Journal of Periodontology**, 30,7-16, 1959.

SCHONFELD, S.E. & KAGAN, J.M.. Specificity of gingival plasma cells for bacterial somatic antigens. **Journal of Periodontal Research** 17, 60-69, 1982.

SHILOAH **et al.** The survival rate of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* following 4 randomized treatment modalities. **J Periodontol** 68(8): 720-28, 1997.

SLOTS, J. & LISTGASTEN, M.A.. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. **J. Clin Periodontal** 15:85-89, 1988.

SLOTS, J. & ROSLING, B.G.. Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. **Journal of Clinical Periodontology** 10, 465-486, 1983.

SLOTS, J., FEIK, D. & RAMS, T.E.. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. **Journal of Clinical Periodontology** 17, 659-662, 1990a.

SOCRANSKY, S.S. & GIBBONS, R.J.. Required role of *Bacteroides melaninogenicus* mixed anaerobic infections. **Journal of Infections Diseases** 115, 247-253, 1965.

SOCRANSKY, S.S. & HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal Disease: Current Concepts. **Journal of Periodontology**, 63. 322-331, 1992.

SOCRANSKY, S.S. & HAFFAJEE, A. D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. In **Socransky, S.S. & Hafajee, A. D.** eds. Microbiology and immunology of Periodontal disease. **Periodontology 2000-5**, 7-25, 1994.

SOCRANSKY, S.S. & HAFFAJEE. A. D.. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. **Journal of Periodontal Research**, 26, 195-212, 1991.

SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D. & DZINK, J.L.. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. **Journal of Clinical Periodontology** 15, 440-444, 1988.

SREENIVASAN, P.K., MEYER, D.H. & FIVES-TAYLOR, P.M.. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and Immunity** 61, 1239-1245, 1993.

TANNER, A.C.R., HAFFER, C., BRATTHALL, G.T., VISCONTI, R.A. & SOCRANSKY, S.S.. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. **Journal of Clinical Periodontology** 6, 278-307, 1979.

TAUBMAN, M.A., HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S., SMITH, D.J. & EBERSOLE, J.L.. Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. **Journal of Periodontal Research**, 27, 511-521, 1992.

VAN WINKELHOFF, A.J., TIJHOF, C.J. & DE GRAAFF, J.. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. **Journal of Periodontology** 63, 52-57, 1992.

VAN WINKELHOFF, A.J., VAN DER VELDEN, U. & DE GRAAFF, J.. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra-and subgingival debridement. **Journal of Clinical Periodontology** 15, 116-122, 1988.

WYSS, C.. Dependence of proliferation of Bacteroides forsythus on exogenous N-acetylmuramic acid. **Infection and Immunity** 57, 1757-1759, 1989.

ZACHRISSON BU.. Cause and prevention of injuries to teeth and supporting structures during orthodontic treatment. **Am J Orthod**; 69:285-300,1976.

ZACHRISSON S, ZACHRISSON BU.. Gingival condition associated with orthodontic treatment. **Angle Orthod** ;42:26-34, 1972.

ZADEH HH, NICHOLS FC, MIYASAKI KT.. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. **Periodontology** 2000, 20:239-88, 1999.

ZAMBON, J.J., SLOTS, J. & GENCO, R.J.. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. **Infection and Immunity** 41, 19-27, 1983

XII- ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE (TCL)

Consentimento Formal Para Participar Em Pesquisa Clínica

Por este instrumento particular declaro, para efeitos éticos e legais , que eu

Nome: _____

(nacionalidade) , _____ **profissão** _____

Portador do Rg: _____ **Cic** _____

Residente _____

Cidade _____ **Estado** _____

Concordo com absoluta consciência dos procedimentos a que vou me submeter para a realização deste trabalho (remoção do aparelho ortodôntico) , exame clínico e microbiológico , (assim como profilaxia dental) , nos termos relacionados nas disposições anteriores. Esclareço ainda que este consentimento não exime a responsabilidade profissional que executará os procedimentos clínicos.

Piracicaba, _____ de _____ de 2001-08-14

Assinatura do paciente ou responsável

Atenção : em caso de duvida escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNiCAMP .Av. Limeira 901 –Cep 13414-900 Piracicaba.SP

\

ANEXO 2

Resultados obtidos pela análise por PCR: amostras iniciais

Amostra				Bactérias				
Nº	Paciente	Placa	Dente	A.a.	B.f.	P.g.	P.i.	P.n.
1	PACIENTE -1	supra	11	-	-	-	-	-
2			16	+	+	-	-	+
3			26	-	+	-	-	-
4		sub	11	-	-	-	-	-
5			16	+	+	-	-	-
6			26	-	+	-	-	-
7	PACIENTE -2	supra	11	+	-	-	-	-
8			16	+	-	+	-	-
9			26	+	-	-	-	-
10		sub	11	+	+	+	-	-
11			16	+	+	-	-	-
12			26	+	-	-	-	-
13	PACIENTE-3	supra	11	+	-	-	-	-
14			16	+	-	-	-	-
15			26	+	+	-	-	-
16		sub	11	+	+	+	-	-
17			16	+	+	+	-	-
18			26	+	+	+	-	-
19	PACIENTE-4	supra	11	-	-	-	-	-
20			16	+	+	-	-	-
21			26	+	+	+	-	-
22		sub	11	-	-	-	-	-
23			16	+	+	-	-	-
24			26	+	+	-	-	-
25	PACIENTE-5	supra	11	-	-	-	-	-
26			16	+	+	+	-	-
27			26	+	+	-	-	-
28		sub	11	+	-	-	+	-
29			16	+	+	-	-	-
30			26	+	+	-	-	-
31	PACIENTE-6	supra	11	-	-	-	-	-
32			16	+	+	-	-	-
33			26	+	+	-	-	+
34		sub	11	+	+	+	-	+
35			16	+	+	-	-	-
36			26	+	+	-	-	+

Nº	Paciente	Placa	Dente	<i>A.a.</i>	<i>B.f.</i>	<i>P.g.</i>	<i>P.i.</i>	<i>P.n.</i>
37	PACIENTE-7	supra	11	+	+	-	-	-
38			16	+	+	+	+	-
39			26	+	+	-	+	-
40		sub	11	+	+	-	+	-
41			16	+	+	-	-	-
42			26	+	+	-	-	-
43	PACIENTE-8	supra	11	-	-	-	-	-
44			16	-	+	-	-	-
45			26	-	-	-	-	-
46		sub	11	-	+	-	-	-
47			16	-	+	-	-	-
48			26	-	+	-	-	-
49	PACIENTE-9	supra	11	-	-	-	-	-
50			16	-	+	-	-	-
51			26	-	+	-	-	+
52		sub	11	-	-	-	-	-
53			16	+	+	-	-	-
54			26	+	+	-	-	-
55	PACIENTE-10	supra	11	-	+	-	-	-
56			16	-	+	-	-	-
57			26	-	+	-	-	-
58		sub	11	-	+	-	-	+
59			16	-	+	-	-	+
60			26	-	+	-	-	+

+ : presença de bactéria

- : ausência de bactéria

Resultados obtidos pela análise por PCR: amostras finais

Amostra				Bactérias				
Nº	Paciente	Placa	Dente	A.a.	B.f.	P.g.	P.i.	P.n.
61	PACIENTE-1	Supra	11	-	-	-	-	-
62			16	-	-	-	-	-
63			26	-	-	-	-	-
64		sub	11	-	+	+	-	-
65			16	-	-	+	-	-
66			26	-	+	-	-	-
67	PACIENTE-2	supra	11	-	-	-	-	-
68			16	-	-	-	-	-
69			26	+	-	-	-	-
70		sub	11	+	-	-	-	-
71			16	-	+	-	-	+
72			26	+	+	-	-	+
73	PACIENTE-3	supra	11	-	+	-	-	-
74			16	-	-	-	-	-
75			26	-	-	-	-	-
76		sub	11	-	-	-	-	-
77			16	-	+	-	-	+
78			26	-	-	+	-	-
79	PACIENTE-4	supra	11	-	-	-	-	-
80			16	-	-	-	-	-
81			26	-	+	-	-	-
82		sub	11	-	-	+	+	-
83			16	-	-	+	-	-
84			26	-	-	-	-	-
85	PACIENTE-5	supra	11	-	-	-	-	-
86			16	-	-	-	-	-
87			26	-	-	-	-	-
88		sub	11	-	+	-	-	+
89			16	-	+	-	+	-
90			26	-	+	-	+	-
91	PACIENTE-6	supra	11	-	+	-	-	-
92			16	-	-	-	-	-
93			26	-	-	-	-	-
94		sub	11	-	-	-	-	-
95			16	-	+	+	-	-
96			26	-	-	-	-	-

Nº	Paciente	Placa	Dente	<i>A.a.</i>	<i>B.f.</i>	<i>P.g.</i>	<i>P.i.</i>	<i>P.n.</i>
97	PACIENTE-7	supra	11	-	-	-	-	-
98			16	-	-	-	-	-
99			26	-	+	-	-	-
100		sub	11	-	-	-	-	-
101			16	+	-	-	-	+
102			26	-	+	-	-	+
103	PACIENTE-8	supra	11	-	-	-	-	-
104			16	-	-	-	-	-
105			26	-	-	-	-	-
106b		sub	11	-	+	-	-	-
107			16	-	+	-	-	+
108			26	-	+	-	-	+
109	PACIENTE-9	supra	11	-	-	-	-	-
110			16	-	-	-	+	-
111			26	-	-	-	-	-
112		sub	11	-	+	-	-	-
113			16	-	-	-	-	-
114			26	-	-	-	-	-
115	PACIENTE-10	supra	11	-	-	-	-	-
116			16	-	-	-	-	+
117			26	-	+	-	-	+
118		sub	11	-	-	-	-	-
119			16	-	-	-	-	+
120			26	-	+	-	-	+

+ : presença de bactéria

- : ausência de bactéria

ANEXO 3

Tabela Inicial – Paciente Gengiva Inflamada

Paciente profun/sondag/	dente		índice de placa	índice sang/
1	11	3	X	2,0
	16	3	X	3,0
	26	3	X	2,5
2	11	3	X	2,5
	16	3	X	2,5
	26	3	X	2,0
3	11	1	X	1,5
	16	2	X	3,0
	26	2	X	3,0
4	11	3	X	2,0
	16	3	X	3,0
	26	3	X	3,0
5	11	3	X	2,0
	16	3	X	3,0
	26	3	X	3,0
6	11	1	X	2,0
	16	2	X	2,5
	26	2	X	3,0
7	11	1	X	2,0
	16	2	X	3,0
	26	2	X	2,5
8	11	1	X	1,5
	16	2	X	2,0
	26	2	X	2,5
9	11	2	X	2,0
	16	3	X	3,0
	26	3	X	3,0
10	11	1	X	2,0
	16	3	X	3,0
	26	3	X	3,0

TABELA FINAL –após 30 dias /remoção aparelho /profilaxia

Paciente	dente		índice de placa	índice sang/
profun/sondag/				
1	11	0	-	1,5
	16	0	-	2,0
	26	0	-	2,0
2	11	0	-	2,0
	16	0	-	2,0
	26	0	+	2,0
3	11	0	-	1,0
	16	0	-	2,5
	26	0	-	2,0
4	11	0	-	1,5
	16	1	+	2,0
	26	1	+	2,5
5	11	0	-	1,5
	16	1	+	2,5
	26	1	+	2,5
6	11	0	-	2,0
	16	0	-	2,0
	26	0	-	2,5
7	11	0	-	1,5
	16	0	-	2,0
	26	0	-	2,0
8	11	0	-	1,0
	16	0	-	1,5
	26	0	-	2,0
9	11	0	-	1,5
	16	0	-	2,0
	26	0	-	2,0
10	11	0	-	1,5
	16	1	+	2,0
	26	1	+	2,5

ANEXO 4

TESTE-PCR

Tabela 1 –mostrando o total % do resultado inicial do teste supra / sub gengival (total de trezentos testes)

teste +	teste -
Aa=36=60,00%	Aa=24=40,0%
Bf=43=71,66%	Bf=17=28,33%
Pg= 9=15,0%	Pg=51=85,0%
Pi= 4=6,66%	Pi= 56=93,33%
Pn= 8=13,33%	Pn=12=20,0%

Tabela 2 – mostrando o total % do resultado inicial do teste supragengival (total de cento e cinquenta testes)

teste +	teste -
Aa=16=53,33%	Aa=14=46,66%
Bf=18=60,0%	Bf=12=40,0%
Pg= 4=13,33%	Pg=26=86,66%
Pi= 2=6,66%	Pi=28=93,33%
Pn=3=10,0%	Pn=27=90,0%

Tabela 3- mostrando o total % do resultado inicial do teste sub gengival (total de cento e cinquenta testes)

teste +	teste -
Aa=20=66,66%	Aa=10=33,33%
Bf=25=83,33%	Bf=5=16,66%
Pg=5=16,66%	Pg=25=83,33%
Pi=2=6,66%	Pi=28=93,33%
Pn=5=16,66%	Pn=25=83,33%

Tabela 4 –mostrando o total % do resultado final do teste supra/ sub gengival (total de trezentos testes)

teste +	teste -
Aa=4=6,66%	Aa=56=93,33%
Bf=20=33,33%	Bf=40=66,66%
Pg=6=10%	Pg=54=90,0%
Pi=4=6,66%	Pi=56=93,33%
Pn=12=20%	Pn=48=80,0%

Tabela 5 –mostrando o total % do resultado final do teste supra gengival (total de cento e cinquenta testes)

teste +	teste -
Aa=1=3,33%	Aa=29=96,66%
Bf=5=16,66%	Bf=25=83,33%
Pg=0=0,0%	Pg=30=100,0%
Pi=1=3,33%	Pi=29=96,66%
Pn=2=6,66%	Pn=28=93,33%

Tabela 6 –mostrando o total % do resultado final dos testes sub gengival (total de cento e cinquenta testes)

teste +	teste -
Aa=3=10,0%	Aa=27=90,0%
Bf=15=50%	Bf=15=50,0%
Pg= 6=20,0%	Pg=24=80,0%
Pi=3=10,0%	Pi=27=90,0%
Pn=10=33,33%	Pn=20=66,66%

Tabela 7 –mostrando o total % comparativo do resultado inicial e final + do teste supra/ sub gengival

teste inicial +	teste final +
Aa=36=60,0%	Aa=4=6,66%
Bf=43=71,66%	Bf=20=33,33%
Pg=9=15,0%	Pg= 6=10,0%
Pi=4=6,66%	Pi= 4=6,66%
Pn=8=13,33%	Pn=12=20,0%

Tabela 8 – Mostrando o total % comparativo do resultado inicial e final - do teste supra/ sub gengival .

teste inicial -	teste final -
Aa=24=40,0%	Aa=56=93,33%
Bf=17=28,33%	Bf=40=66,66%
Pg=51=85,0%	Pg=54=90,0%
Pi=56=93,33%	Pi=56=93,33%
Pn=52=86,66%	Pn=48=80,0%

Tabela 9 –mostrando o total % comparativo do resultado inicial e final + do teste supra gengival .

teste inicial +	teste final +
Aa=16=53,33%	Aa= 1=3,33%
Bf=18=60,0%	Bf= 5=16,66%
Pg= 4=13,33%	Pg=0=0,0%
Pi= 2=6,66%	Pi= 1=3,33%
Pn=3=6,66%	Pn= 2=6,66%

Tabela 10 –mostrando o total % comparativo do resultado inicial e final - do teste supragengival.

teste inicial -	teste final -
Aa=14=46,66%	Aa=29=96,66%
Bf=12=40,0%	Bf=25=83,33%
Pg=26=86,66%	Pg=30=100,0%
Pi=28=93,33%	Pi=29=96,66%
Pn=27=90,0%	Pn=28=93,33%

Tabela 11 –mostrando o total % comparativo do resultado inicial e final + do teste sub gengival .

teste inicial +	teste final +
Aa=20=66,66%	Aa= 3=10,0%
Bf=25=83,33%	Bf=15=50,0%
Pg= 5=16,66%	Pg= 6=20,0%
Pi= 2=6,66%	Pi= 3=10,0%
Pn= 5=16,66%	Pn=10=33,33%

Tabela 12 –mostrando o total % comparativo do resultado inicial e final - do teste sub gengival .

teste inicial -	teste final -
Aa=10=33,33%	Aa=27=90,0%
Bf=5=16,66%	Bf=15=50,0%
Pg=25=83,33%	Pg=24=80,0%
Pi=28=93,33%	Pi=27=90,0%
Pn=25=83,33%	Pn=20=66,66%

XIII- APÊNDICES

I - Produtos para PCR e eletroforese

- N° de amostras: 10 pacientes x 6 amostras por paciente = 60
- N° de bactérias: 5 bactérias (A.a., B.f., P.g., P.i. e P.n.)

N° de amostras a serem analisadas = 60 x 5 = **300 amostras clínicas**

- 1 corrida de PCR pode ser realizada com 20 amostras clínicas + 2 controles (positivo e negativo) = 22 micro tubos de reação
- 300 amostras clínicas ÷ 20 = 15 corridas $\Rightarrow$ 15 x 2 controles = 30, $\therefore$, o total de amostras (300 amostras clínicas + 30 controles) para PCR = **330 amostras para PCR**

1. Taq DNA polimerase

1 amostra $\rightarrow$ 0,6 μ L

330 amostras $\rightarrow$ X

X = 198 μ L

1 frasco $\rightarrow$ 100 μ L

Y $\rightarrow$ 198 μ L

Y = 1,98 frascos = 2 frascos

2. dNTP

1 frasco contém 100 μ L a 10mM. Usamos 0,5 μ L a 2mM por amostra, portanto 1 frasco rende 500 μ L.

1 amostra $\rightarrow$ 0,5 μ L

330 amostras $\rightarrow$ X

X = 165 μ L

1 frasco $\rightarrow$ 500 μ L

Y $\rightarrow$ 165 μ L

Y = 0,33 frascos = 1 frasco

3. Primers

1 par de primers por bactéria, cada frasco rende aproximadamente 1000 μL

1 amostra $\rightarrow$ 1,0 μL

330 amostras $\rightarrow$ X

X = 330 μL

1 frasco $\rightarrow$ 1000 μL

Y $\rightarrow$ 330 μL

Y = 0,33 frascos = 1 frascos

Reagentes para eletroforese

1 frasco de agarose 1,5%, 100g

1 frasco de Padrão de peso molecular 100pb, 100 μL

Material descartável

ponteiras azuis (1000 μL) – 1 pacote com 500 unidades

ponteiras amarelas (200 μL) – 1 pacote com 1000 unidades

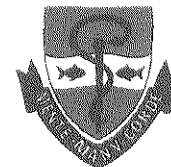
ponteiras incolores (10 μL) – 1 pacote com 1000 unidades

tubos eppendorf de 1,5 mL – 1 pacote com 1000 unidades

tubos eppendorf de 200 μL – 1 pacote com 1000 unidades



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação clínica e microbiológica das condições periodontais associadas ao uso de aparelhos ortodônticos fixos", sob o protocolo nº **016/2001**, do Pesquisador **Emerson José Sallum**, sob a responsabilidade dos Profs. Drs. **Darcy Flávio Nouer** e **Enilson Antonio Sallum**, 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 – FOP.

Piracicaba, 12 de setembro de 2001

We certify that the research project with title "Clinical evaluation and microbiológica of the conditions associated periodontais to the use of apparels fixed ortodônticos", protocol nº **077/2001**, by Researcher **Emerson José Sallum**, responsibility by Prof. Dr. **Darcy Flávio Nouer** and **Enilson Antonio Sallum**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Resarch at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, September 12 2001

Pedro Luiz Rosalen
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP

Antonio Bento Alves de Moraes
Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP