

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

Natália Morsch Beier
Thais Scussel Guarda

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DOIS TIPOS DE AMARRILHOS ELÁSTICOS
NO ACÚMULO DE BIOFILME BACTERIANO EM PACIENTES ORTODÔNTICOS**

**Porto Alegre
2010**

Natália Morsch Beier
Thais Scussel Guarda

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DOIS TIPOS DE AMARRILHOS ELÁSTICOS
NO ACÚMULO DE BIOFILME BACTERIANO EM PACIENTES ORTODÔNTICOS**

Trabalho de Conclusão da
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
requisito final para a obtenção do
grau de Cirurgião Dentista.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Karina Santos Mundstock

Porto Alegre

2010

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DOIS TIPOS DE AMARRILHOS ELÁSTICOS NO ACÚMULO DE BIOFILME BACTERIANO EM PACIENTES ORTODÔNTICOS

RESUMO

Este estudo preliminar tem o objetivo de determinar a influência do tipo de amarrilho elástico utilizado em pacientes sob tratamento ortodôntico no acúmulo de biofilme. A amostra foi constituída por 8 pacientes em tratamento com aparelho ortodôntico fixo no curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Os amarrilhos elásticos foram colocados nos incisivos laterais superiores, dispostos de forma contralateral, e a posição do amarrilho no arco foi definida através de sorteio. A primeira coleta foi realizada três semanas após a instalação do aparelho ortodôntico e dos amarrilhos elásticos. Nessa consulta, os amarrilhos elásticos foram removidos e novos amarrilhos foram instalados, sendo que a posição deles no arco foi inversa àquela da primeira coleta. A segunda coleta foi feita três semanas após a coleta inicial, respeitando o intervalo entre as consultas do paciente na clínica de ortodontia. A avaliação clínica foi realizada por um pesquisador calibrado após a remoção do amarrilho, sob secagem e boa iluminação através do índice de placa por bráquetes colados (*Bonded Bracket Index* – BBI). As amostras foram analisadas pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, verificando a composição e a contagem total de microrganismos no biofilme acumulado em torno de dois diferentes tipos de amarrilhos. Através da análise estatística verificou-se que existe diferença significativa para os escores quando comparados entre os tipos de amarrilhos. O amarrilho Convencional apresentou maiores quantidades de microrganismos quando comparado ao Não Convencional ($p=0,006$), porém não foram observadas diferenças significativas para os escores quando comparados entre os complexos bacterianos. Para os escores de BBI analisados, verificou-se que não existe diferença significativa quando comparados os dois tipos de amarrilhos. Concluiu-se que apesar do amarrilho Não Convencional ter apresentado menor crescimento microbiano para as espécies analisadas, é necessário um maior número amostral para obter resultados mais confiáveis.

Palavras-chave: Ortodontia. Biofilme. Amarrilhos elásticos.

SUMÁRIO

RESUMO	02
INTRODUÇÃO	04
MATERIAIS E MÉTODOS	07
RESULTADOS	11
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	20
ABSTRACT	21
REFERÊNCIAS	22
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	27
APÊNDICE B – Ficha Clínica	29
ANEXOS	31

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o tratamento ortodôntico tem se tornado cada vez mais popular. Esse fato pode ser observado através do grande aumento no número de pacientes tratados ortodonticamente (GASTEL et al, 2009; MEI et al, 2009; SHAW et al, 1991).

O ambiente oral gera condições próprias para a colonização de uma microbiota complexa. Em uma cavidade bucal saudável, esses microrganismos coexistem em um estado de equilíbrio com o seu hospedeiro, mas quando ocorrem mudanças no ambiente oral normal, a flora sofre um desequilíbrio que pode resultar em doença. Algumas mudanças podem ser causadas pela introdução de aparelhos ortodônticos. (ANHOURY et al, 2002)

Tem sido demonstrado que a colocação de dispositivos ortodônticos fixos leva ao acúmulo contínuo e à retenção do biofilme bacteriano, podendo aumentar a incidência da desmineralização da superfície de esmalte e da inflamação gengival (HUSER, M.C., BAEHNI, P.C., LANG R., 1990; MAGNO et al, 2008).

A etiologia da doença cárie e das várias formas de doença periodontal tem sido relacionada com o acúmulo bacteriano e com a composição do biofilme bacteriano. Evidências mais recentes sugerem que ambas as doenças tem uma etiologia multibacteriana, sendo importante a identificação de todas as bactérias presentes no biofilme dental (SOCRANSKY et al, 2004).

Patógenos periodontais, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* tem sido significativamente associados à inflamação gengival durante a terapia ortodôntica (Anhoury et al, 2002; Magno et al, 2008; Sallum et al, 2004; Souza et al, 2008), evidenciando que a combinação do tratamento ortodôntico e pobre higiene oral pode causar sérios danos aos tecidos dentais e ao periodonto (HUSER, M.C., BAEHNI, P.C., LANG, R., 1990; SOUZA et al, 2008).

Estudos microbiológicos baseados em cultura e métodos moleculares tem identificado mais de 700 espécies bacterianas na cavidade oral humana. Destas, mais de 400 espécies tem sido detectadas em bolsas periodontais. Além disso, uma grande diversidade na microbiota tem sido observada em diferentes sítios e/ou indivíduos. Apesar de muitos desses organismos serem comensais, muitas espécies bacterianas tem sido associadas a doenças periodontais (SOCRANSKY et al, 2009).

O aumento no acúmulo de biofilme indica um risco aumentado de efeitos adversos no periodonto (SOUZA et al, 2008). Muitos pesquisadores tem reportado que o fator etiológico mais importante na doença periodontal é a presença de biofilme na gengiva marginal (PENDER N, 1986; BOYD, R.L., BAUMRIND, S., 1992)

Entre as diversas espécies que tem sido preferencialmente encontradas em indivíduos com doença periodontal estão *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides forsythus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, e *Treponema denticola* (SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., 1992).

Os materiais ortodônticos com propriedades modificadas que prometem ser eficazes no controle do desenvolvimento bacteriano em suas superfícies tem sido amplamente introduzidos no mercado (FORSBERG ET AL, 1991; MAGNO et al, 2008; MCNEILL et al, 2001; SUKONTAPATIPARK et al, 2001; TURKKAHRAMAN et al, 2005).

Muitos estudos tem investigado o desempenho dos elastômeros que liberam flúor na diminuição da formação das colônias bacterianas e do biofilme. Em geral, os achados desses estudos mostram que esses novos elastômeros não são efetivos no seu propósito (BANKS et al, 2000; BENSON, P.E., IAN DOUGLAS, C.W., MARTIN, M.V., 2004; DOHERTY, U.B., BENSON, P.E., HIGHAM, S.M., 2002; MATTICK et al, 2001).

Os amarrilhos elásticos *Super Slick™* com a tecnologia *Metafasix* foram lançados no mercado odontológico com o propósito de reduzir o atrito com o arco, tornando-se extremamente deslizantes quando umedecidos, e diminuir a aderência bacteriana. Esse novo amarrilho é produzido pela TP Orthodontics que criou uma superfície altamente lubrificada, uma camada de polímero avançado, *Metafasix*, utilizado na indústria médica no mundo inteiro. (TP ORTHODONTICS, 2009)

Magno et al (2008) avaliaram a contaminação por *Streptococcus mutans* do amarrilho elástico *Super Slick™* em 20 pacientes ortodônticos. Foi realizada análise através de cultura microbiana e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados sugeriram uma contaminação significativamente maior do amarrilho *Super Slick™* em relação ao amarrilho convencional.

Diversos autores tem se preocupado em avaliar a contaminação microbiana da superfície de componentes específicos de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis. No entanto, na maioria das vezes são avaliados microrganismos

cariogênicos (FALTERMEIER, A., BURGERS, R., ROSENTRITT, M., 2008; AHN, S.J., LIM, B.S., LEE, S.J., 2007; LIM, B.S. et al, 2008), empregando-se particularmente técnicas de cultura microbiana (BRUSCA, M.I. et al, 2007; LESSA, F.C. et al, 2007; MAGNO, A.F. et al, 2008).

Com o avanço nas técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a identificação de múltiplas espécies bacterianas de maneira mais rápida e eficaz, por meio de sondas de DNA. Dentre essas técnicas destaca-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* (SOCRANSKY et al, 2004).

A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* tem sido amplamente utilizada nas áreas de Periodontia, Endodontia, Implantodontia, Cariologia, entre outras, no entanto, no que diz respeito à Ortodontia, foi empregada em apenas um estudo piloto realizado em 2002 para avaliar a contaminação em bráquetes metálicos e cerâmicos (ANHOURY et al, 2002).

Esse método se baseia na utilização de dois dispositivos: o *MiniSlot*TM e o *Miniblotter*[®], no formato *checkerboard*, previamente desenvolvido para detectar diversas reações antígeno-anticorpo em uma única membrana.

A análise bacteriana através desse método não requer viabilidade bacteriana e oferece rapidez e acurácia, além de ter vantagens sobre as técnicas de cultura microbiana por consumir menos tempo, ter menos etapas laboratoriais e ter o custo mais acessível. Além disso, nos dá não apenas informações sobre as espécies, mas também permite a identificação de microrganismos incomuns que estão presentes em pequenas quantidades ou que são extremamente difíceis de ser identificados pelos métodos de cultura (ANHOURY et al, 2002; SOCRANSKY et al, 2004).

Outra vantagem da técnica é que toda a amostra pode ser analisada sem necessidade de diluição ou amplificação, superando problemas de diluição em série e amplificação como na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SOCRANSKY et al, 2004).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) indica a presença ou ausência dos microrganismos, enquanto técnicas como o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* nos confere dados quantitativos e qualitativos (SOCRANSKY et al, 2004).

À luz das informações acima, nenhuma conclusão definitiva pode ser tirada sobre qual material apresenta a menor capacidade de retenção de placa bacteriana. É necessário mais informações para oferecer aos pacientes tratamento ortodôntico

sem aumentar significativamente seu risco de desenvolver manchas brancas, cárie ou inflamação gengival.

Dessa forma, este estudo preliminar visa avaliar a composição do biofilme bacteriano acumulado em dois tipos diferentes de amarrilhos elásticos ortodônticos, utilizando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, bem como a quantidade de biofilme dentário acumulado sob esses amarrilhos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa é caracterizada como um ensaio clínico randomizado, prospectivo, controlado, utilizando o método *split mouth design*.

Inicialmente foi realizado um estudo piloto com 02 pacientes para testar a metodologia utilizada neste estudo e verificar a calibragem do examinador. A amostra total deste estudo constitui-se de um total de 15 pacientes. O presente estudo preliminar analisou 08 destes pacientes em tratamento ortodôntico fixo no curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que foram selecionados para participar desse estudo. Todos os pacientes se encontravam em fase final de dentição mista (somente segundos molares decíduos presentes) ou com dentição permanente completa. Os pacientes foram instruídos previamente ao início das coletas em relação à higiene oral, que foi feita com o uso de um kit de higiene bucal padronizado, contendo dentífrico fluoretado, passa-fio e escova dental macia. A técnica preconizada de higiene bucal foi a descrita por Puppin et al. em 2002. Foi recomendado aos pacientes que não imprimissem muita força no ato de escovação, de maneira que o tecido gengival não fosse traumatizado. O paciente foi orientado a iniciar a escovação pela arcada superior e repetir os mesmos movimentos na arcada inferior.

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram doenças sistêmicas e que fizeram uso de antibióticos e/ou bochechos contendo soluções antimicrobianas por um período mínimo de 3 meses previamente ao início da pesquisa.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – projeto número 32/7.

Os amarrilhos foram colocados com pinça mathieu nos incisivos laterais superiores, visto que são os dentes em que se encontra o maior acúmulo de biofilme bacteriano (GORELICK, L., GEIGER, A. M., GWINNETT, J., 1982; PASCHOS et al, 2009; BANKS et al, 2000; PELLEGRINI et al, 2009). Eles foram dispostos de forma contralateral, sendo que a posição do amarrilho no arco foi definida através de sorteio. A primeira coleta de placa foi feita três semanas após a instalação dos amarrilhos elásticos. Nesse momento, os amarrilhos elásticos foram removidos e novos amarrilhos foram instalados, em posição inversa àquela da primeira coleta. A segunda coleta foi feita três semanas após a coleta inicial, respeitando o intervalo entre as consultas dos pacientes na clínica de Ortodontia do Curso de Especialização em Ortodontia da UFRGS.

A avaliação da quantidade de placa dentária foi feita através do índice proposto por Ciancio et al (1985) (*Bonded Bracket Index – BBI*) modificado. Essa avaliação foi feita por um pesquisador calibrado após a remoção do amarrilho, sob secagem e iluminação. O índice modificado, em que não é feita a evidenciação da placa dentária com fucsina, se mostrou tão efetivo quanto o índice original em um estudo feito por Elias et al (2006), por esse motivo foi utilizado neste estudo.

O índice de Ciancio et al (1985) é um índice próprio para ortodontia e avalia apenas a face vestibular dos dentes, por esta ser a face de maior acúmulo de biofilme dentário após a instalação do aparelho ortodôntico fixo corretivo, seguindo os critérios abaixo:

0 – ausência de placa;

1 – presença de placa somente no bráquete;

2 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, sem extensão gengival;

3 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, com extensão para a papila;

4 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, cobrindo parcialmente a gengiva;

5 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, cobrindo totalmente a gengiva;

A remoção dos amarrilhos foi feita de forma cuidadosa sempre pelo mesmo pesquisador calibrado, através do uso de uma sonda exploradora esterilizada. Os

amarelos foram imediatamente transferidos para tubos plásticos estéreis do tipo Eppendorf contendo 150 µl de solução de TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6) nos quais posteriormente foram adicionados 100µl de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5M e congelados a -20°C até o processamento, permitindo que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. As amostras foram então encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Oral da Universidade de Guarulhos - São Paulo - Brasil, onde foram analisadas pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* descrito por Socransky et al (1994).

O processamento para identificação dos microrganismos supragengivais foi realizado através da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para 40 espécies bacterianas (SOCRANSKY et al,1998). (Tabela 1)

As amostras contidas nos tubos plásticos foram fervidas por 10 minutos e neutralizadas usando-se 0,8ml de acetato de amônia a 5M para que ocorresse a desnaturação das fitas de DNA. O DNA livre foi depositado nas canaletas do *Minislot* 30 (IMMUNETICS, Cambridge, MA, EUA), concentrado na membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (BOEHRINGER MANNHEIM, Indianápolis, IN, USA) e fixado por meio de aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos. Cada membrana foi colocada em um *Miniblotter* 45 (IMMUNETICS, Cambridge, MA, USA), com as linhas contendo o DNA perpendiculares às canaletas do aparato. As sondas de DNA para 40 espécies bacterianas foram marcadas com digoxigenina, adicionadas às canaletas do *Miniblotter* 45 e hibridizadas a 42°C durante 20 horas. Após a hibridização, as membranas foram abundantemente lavadas e as sondas de DNA detectadas usando-se o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (BOEHRINGER MANNHEIM, Indianápolis, IN, USA). A detecção foi feita por quimioluminescência e as imagens foram capturadas em filme. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30 foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas. Os sinais foram convertidos para contagens absolutas pela comparação com as canaletas padrões nas membranas.

Os níveis das diferentes espécies foram determinados através da frequência média dos registros 0-5 em cada sítio e em cada paciente no grupo. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e

10⁶ bactérias. Assim sendo, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; o número 1 é equivalente a um sinal menos intenso que o controle de 10⁵ células; o número 2 a aproximadamente 10⁵ células; o número 3 entre 10⁵ e 10⁶ células; o número 4 a aproximadamente 10⁶ células; e o número 5 a >10⁶ células.

Tabela 1. Cepas bacterianas utilizadas para obtenção das sondas de DNA

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
Complexo Azul		Complexo Laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>vincentii</i>	49256 ^a
<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146 ^a	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
Complexo Roxo		<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
Complexo Amarelo		<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	Complexo Vermelho	
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	Outras Espécies	
Complexo Verde		<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>Aggregatibacter</i>	43718 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>actinomycetemcomitans</i>	29523 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
a + b			
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11827 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a		11828 ^a
Complexo Laranja		<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a		
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a		

^a ATCC (American Type Culture Collection)

^b Forsyth Institute

Os resultados obtidos com a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e os escores do índice de placa visível (BBI) foram analisados através de tabelas estatísticas descritivas e dos testes estatísticos não paramétricos Wilcoxon e Kruskal-Wallis. O nível de significância máximo assumido foi de 5% ($p \leq 0,05$) e o software utilizado para a análise estatística foi o SPSS versão 10.0.

RESULTADOS

A análise descritiva dos resultados mostrou que a maioria das sondas utilizadas estava presente em 100% dos pacientes, exceto as espécies bacterianas *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus gordonii* e *Tannerella forsythia*, que estavam presentes em 87,5% dos indivíduos.

Através dos resultados do teste não paramétrico de Wilcoxon verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa para os escores quando comparados entre os tipos de amarrilhos. Observa-se que o amarrilho Convencional possui escores significativamente superiores ao amarrilho Não Convencional (*Super Slick™*), ou seja, a quantidade de microrganismos detectada é superior para o amarrilho Convencional ($p=0,006$). (Tabela 2)

Tabela 2. Comparação dos escores obtidos para as espécies entre os amarrilhos: Convencional e Não Convencional (*Super Slick™*)

Método	Escore (0 - 5)		p
	Médio	Desvio-padrão	
Não Convencional	3,06	0,67	0,006
Convencional	3,26	0,68	

Para o amarrilho *Super Slick™*, as espécies bacterianas que apresentaram maiores escores médios foram *Veillonella parvula* (escore 4,8) e *Actinomyces naeslundii II* (escore 4,4). (Gráfico 1)

Para o amarrilho Convencional os maiores escores médios foram encontrados nas seguintes espécies: *Campylobacter showae* (escore 4,9), *Actinomyces naeslundii I* (escore 4,9), *Propionibacterium acnes I + II* (escore 4,4), *Streptococcus*

intermedius (escore 4,3), *Neisseria mucosa* (escore 4,1) e *Actinomyces gereseiae* (escore 4,1). (Gráfico 2)

Gráfico 1. Escores médios das espécies bacterianas encontradas no amarelo Não Convencional (*Super Slick™*)

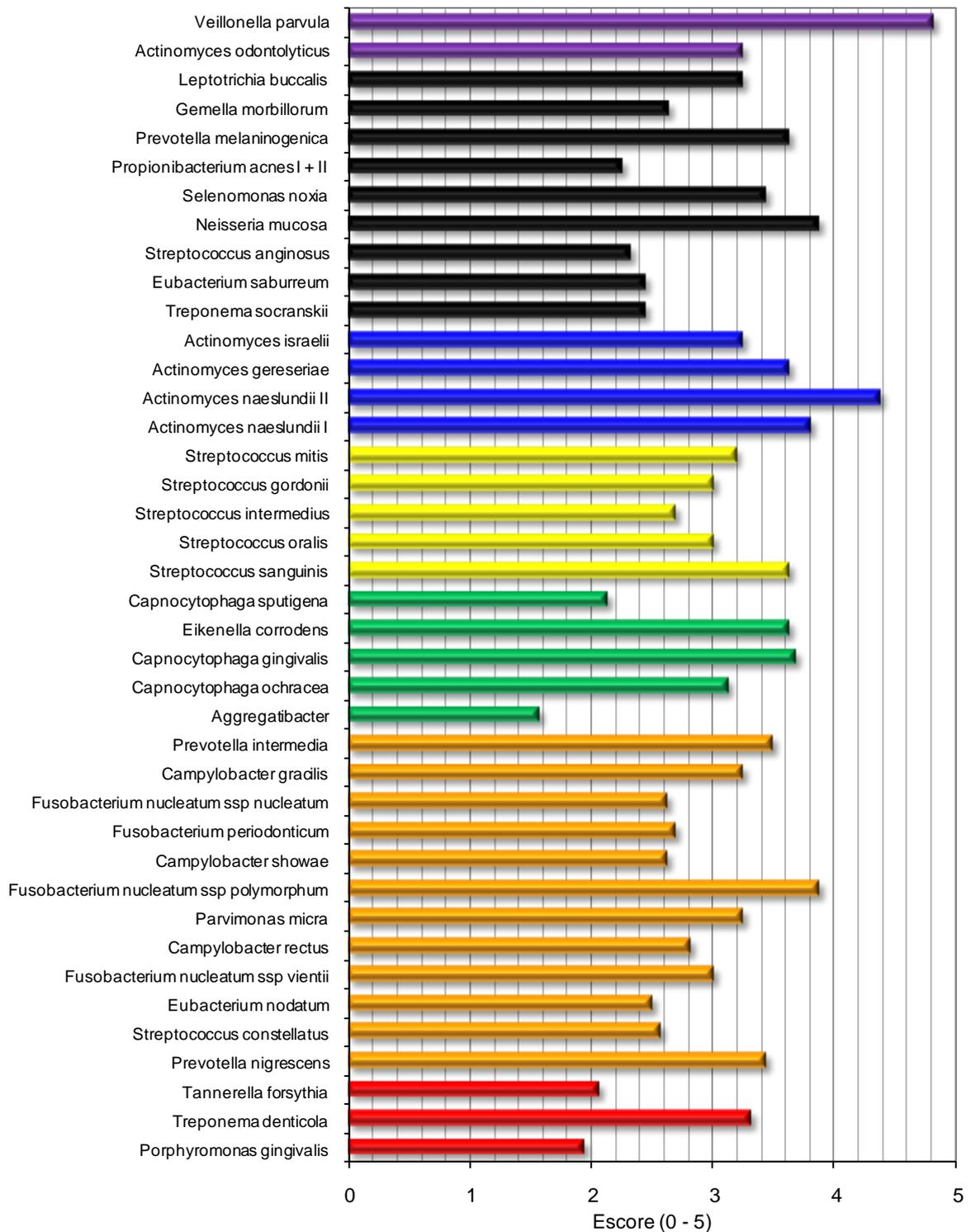
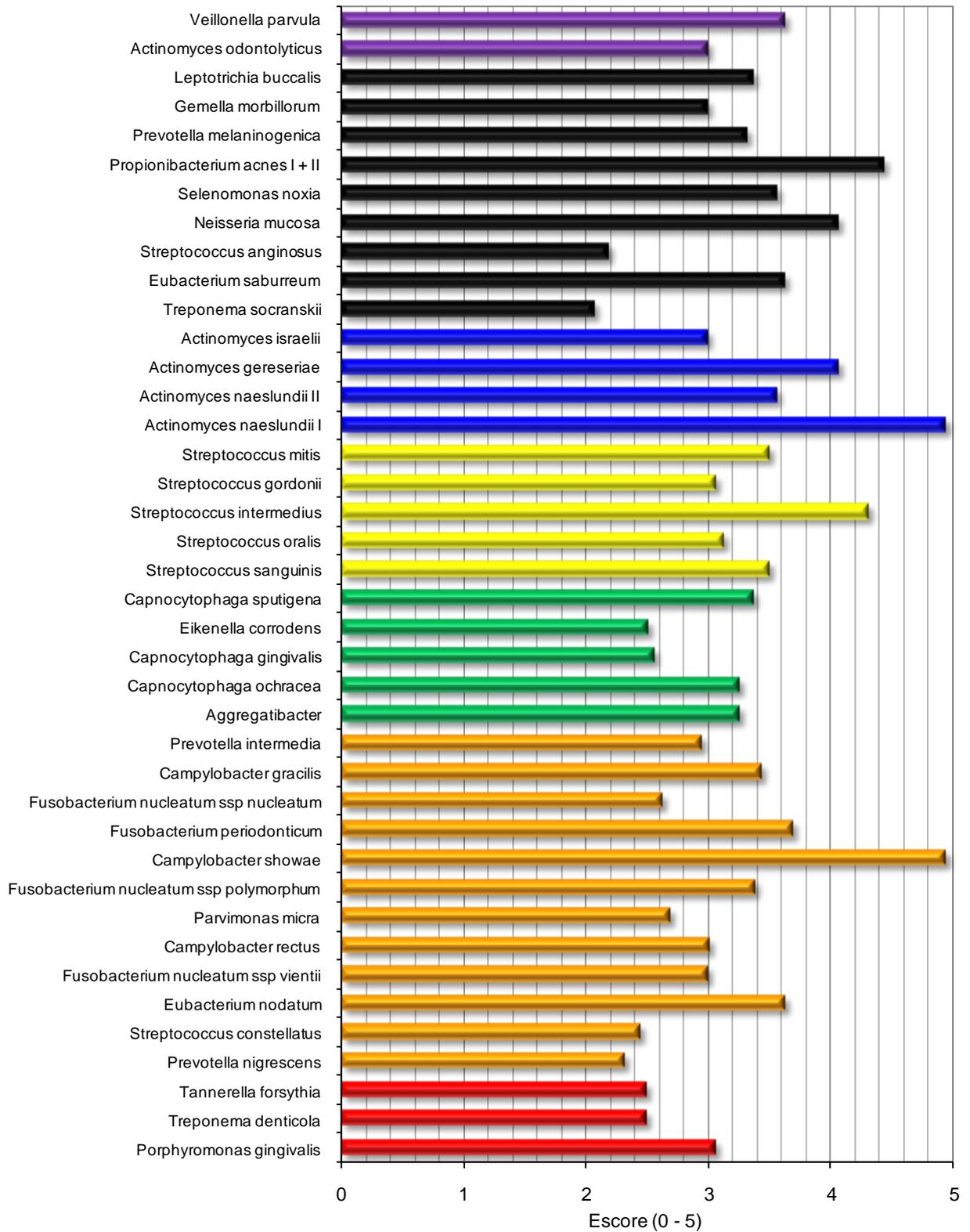


Gráfico 2. Escores médios das espécies bacterianas encontradas no amarelo convencional



Através dos resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis as espécies bacterianas que apresentaram maiores escores médios tanto no amarrilho Convencional quanto no *Super Slick™* foram as do complexo roxo - escores 4 e 4,1, respectivamente (Gráficos 3 e 4).

Gráfico 3. Comparação dos escores entre os complexos bacterianos do Amarrilho Não Convencional (*Super Slick™*)

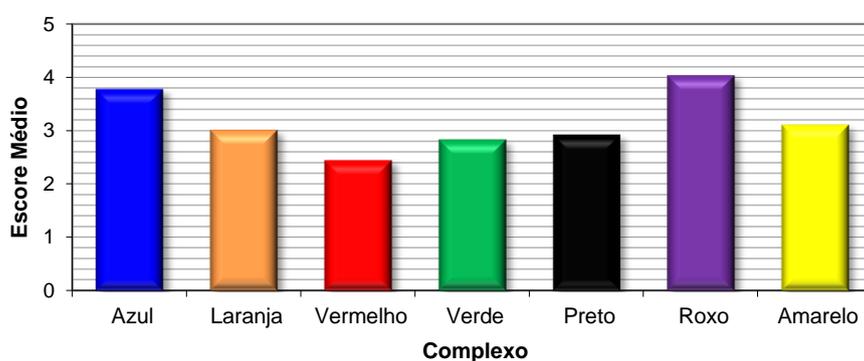
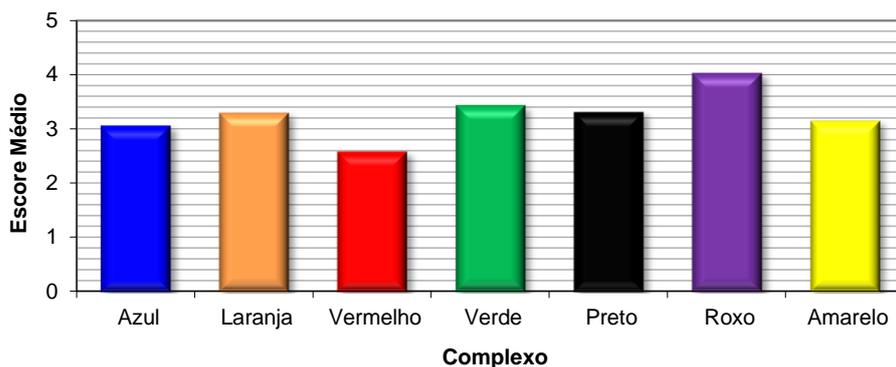


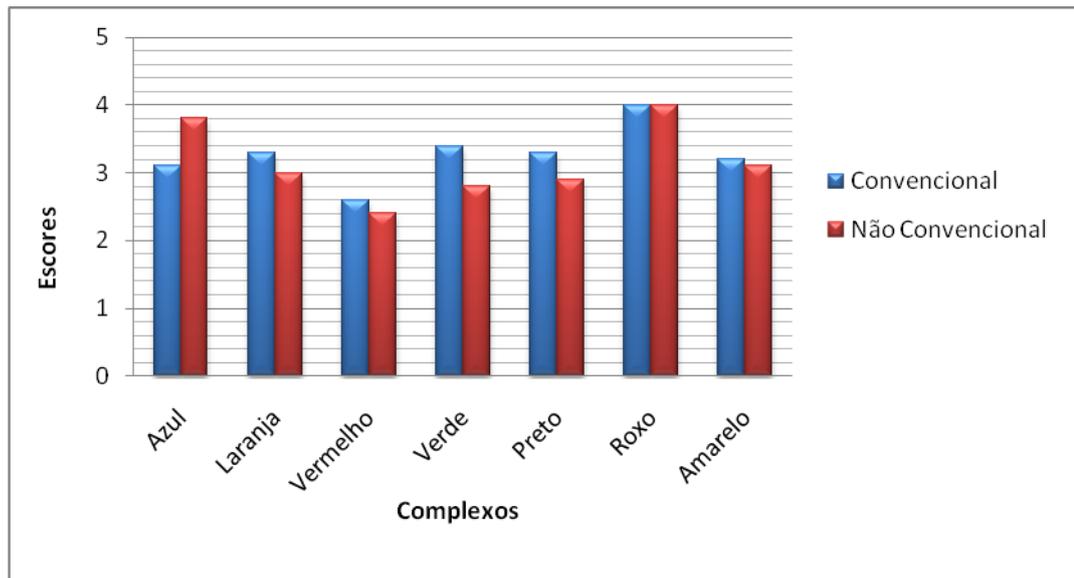
Gráfico 4. Comparação dos escores entre os complexos bacterianos do Amarrilho Convencional



Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os escores quando comparados entre os complexos. Nesta comparação foram desconsiderados os complexos: Roxo e Vermelho. (Tabela 3 e Gráfico 5)

Tabela 3. Comparação dos escores entre os complexos para cada tipo de amarrilho

Complexo	n	Escore (0 - 5)			
		Não Convencional (p=0,209)		Convencional (p=0,955)	
		Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
Complexo Azul	4	3,8	0,5	3,1	0,5
Complexo Laranja	12	3,0	0,4	3,3	0,5
Complexo Vermelho	3	2,4	0,8	2,6	0,7
Complexo Verde	5	2,8	0,9	3,4	0,8
Complexo Preto	9	2,9	0,6	3,3	0,8
Complexo Roxo	2	4,0	1,1	4,0	1,3
Complexo Amarelo	5	3,1	0,3	3,2	0,4

Gráfico 5. Comparação dos escores dos complexos para cada tipo de amarrilho

Na avaliação da quantidade de placa dentária através do índice de placa visível BBI, foi observado que nenhuma das amostras apresentou escore 0, evidenciando que em 100% dos casos houve acúmulo bacteriano.

Para o dente 12, tanto para o amarrilho Convencional quanto para o *Super Slick™*, foi encontrada maior prevalência para o escore 3 (62,5% e 50%, respectivamente). Para o dente 22, nos dois tipos de amarrilho foi encontrada maior

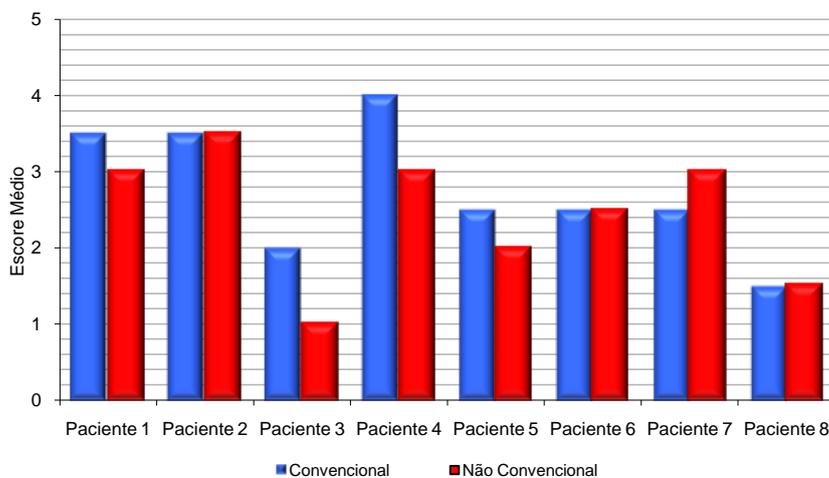
prevalência para o escore 2 (62,5% no amarelo Convencional e 50% no Não Convencional), conforme tabela 4.

Tabela 4. Distribuição dos escores para cada dente

Escore BBI	Dente 12				Dente 22			
	Convencional		Não Convencional		Convencional		Não Convencional	
	n	%	N	%	N	%	N	%
	0	-	-	-	-	-	-	-
1	1	12,5	2	25	-	-	1	12,5
2	1	12,5	1	12,5	5	62,5	4	50
3	5	62,5	4	50	1	12,5	2	25
4	1	12,5	1	12,5	1	12,5	1	12,5
5	-	-	-	-	1	12,5	-	-

Verificando-se a média dos escores entre os dentes 12 e 22, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,129$) para o índice BBI quando comparados os dois tipos de amarelos. (Gráfico 6)

Gráfico 6. Comparação dos escores BBI para cada tipo de amarelo.



DISCUSSÃO

Um grande número de estudos tem investigado a influência da terapia ortodôntica e seus dispositivos na microbiota oral. As mudanças decorrentes da colocação de aparelhos ortodônticos podem ter um impacto significativo na saúde bucal do paciente, incluindo inflamação gengival (ANHOURY et al, 2002).

Novas técnicas de biologia molecular para identificar e enumerar a composição do biofilme bacteriano tem sido utilizadas em estudos de diferentes patologias, como doença periodontal e lesões endodônticas. Estudos dessa natureza tem sido mais facilmente realizados com o advento de métodos rápidos para enumeração de espécies utilizando sondas de DNA (ANHOURY et al, 2002).

O método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* utilizado neste estudo foi desenvolvido por Socransky et al (1994) com o objetivo de processar de forma rápida um grande número de amostras de placa bacteriana para detectar múltiplas espécies. A técnica possui vantagens sobre a cultura microbiana, pois não requer bactérias viáveis, apresenta rapidez e acurácia, menor etapa laboratorial, além de ser mais econômica (HAFFAJEE et al, 1992).

Comparando os achados obtidos pela técnica *Checkerboard* e o método tradicional de cultura microbiana não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas espécies encontradas, apesar das sondas de DNA serem superiores à cultura com relação à detecção de periodontopatógenos (ANHOURY et al, 2002).

As espécies bacterianas selecionadas para este estudo são espécies encontradas com frequência na cavidade bucal, associadas ou não com patologias específicas, as quais podem ocorrer durante o tratamento ortodôntico.

Dentre os resultados obtidos, foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando comparados os escores das espécies bacterianas presentes nos dois diferentes tipos de amarrilhos. Observou-se que o amarrilho Convencional apresentou escores significativamente superiores ao amarrilho *Super Slick™*, ou seja, a quantidade de microrganismos detectada foi superior para o amarrilho Convencional ($p=0,006$).

Magno et al (2008) compararam o número de colônias de *Streptococcus mutans* formadas nas superfícies dos amarrilhos convencionais e *Super Slick™*. Os amarrilhos foram colocados nos dentes pré molares ou molares da maxila e da

mandíbula de forma contralateral, sendo analisados por método de cultura bacteriana após um período de 15 dias intraoral. De acordo com os resultados obtidos, a contaminação do amarrilho *Super Slick*TM foi significativamente maior do que o amarrilho convencional. Esses achados contrapõem os resultados obtidos no presente estudo, que encontrou um número maior de microrganismos acumulados no amarrilho Convencional quando comparado ao *Super Slick*TM. No estudo realizado por Magno et al, o amarrilho *Super Slick*TM teve um pior desempenho, pois apresentou fissuras em sua superfície e, conseqüentemente, maior contaminação bacteriana. Entretanto, devemos considerar que a análise bacteriana de ambos os trabalhos é diferente, pois este artigo utilizou o método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para a análise de periodontopatógenos, enquanto Magno et al utilizaram o método de cultura bacteriana para verificar a presença de *Streptococcus mutans*.

Uma possível explicação para a diferença entre os dois tipos de amarrilhos pesquisados pode ser a própria característica descrita pelo fabricante. A tecnologia *Metafasix*, utilizada nos amarrilhos *Super Slick*TM, foi desenvolvida para melhorar as características dos amarrilhos elásticos através da utilização de um revestimento de polímero hidrogel que transforma a superfície elastomérica em uma superfície lisa e deslizante (TP ORTHODONTICS, 2009). Como consequência, espera-se menor acúmulo de biofilme bacteriano. Provavelmente, esta cobertura de polímero hidrogel torna a superfície do amarrilho *Super Slick*TM menos suscetível ao acúmulo de microrganismos periodontopatógenos.

A análise do índice de placa visível (BBI) realizada nesta pesquisa mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois diferentes tipos de amarrilhos. Nenhuma das amostras apresentou escore 0, evidenciando que em 100% dos casos houve acúmulo bacteriano após a colocação dos aparelhos ortodônticos. Os resultados deste índice clínico demonstram que o reportado pelos autores Huser, M.C., Baehni, P.C., Lang R. (1990) e Magno et al (2008) está de acordo com os achados do presente trabalho, pois a colocação de dispositivos ortodônticos fixos leva ao acúmulo contínuo e à retenção do biofilme bacteriano, podendo aumentar a incidência da desmineralização da superfície de esmalte e da inflamação gengival.

Forsberg et al (1991) avaliaram a colonização microbiana em 12 pacientes tratados com aparelhos ortodônticos fixos e concluíram que houve maior número de

microrganismos na placa dos dentes que estavam amarrados com amarrilho elástico. Os autores recomendaram evitar o uso de amarrilhos elastoméricos em pacientes com higiene oral deficiente, evitando a predisposição ao desenvolvimento de cáries e gengivite, pelo fato de aumentarem de forma significativa o acúmulo de microrganismos na placa dentária adjacente aos bráquetes. Esses achados comprovam os resultados do presente estudo para o índice BBI, pois tanto a análise bacteriana como a inspeção clínica detectaram a presença de biofilme nos pacientes ortodônticos pesquisados.

Poucos foram os estudos em Ortodontia que verificaram a contaminação bacteriana em partes específicas de aparelhos ortodônticos por meio de técnicas de biologia molecular como o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, o que limita a possibilidade de comparação dos resultados obtidos no presente estudo com a literatura específica.

Anhoury et al (2002) compararam a contagem de microrganismos através do método *Checkerboard* em bráquetes metálicos e cerâmicos, da região de incisivos e pré molares superiores, obtidos no momento da remoção do aparelho, ao final do tratamento, após períodos não relatados de permanência na cavidade bucal. De acordo com os resultados obtidos, o tipo de bráquete não influenciou na contagem de microrganismos. A maioria das sondas bacterianas empregadas por esses autores foi também avaliada no presente estudo.

No estudo realizado por Anhoury et al (2002), os dados obtidos sugeriram a existência de diferenças na composição bacteriana do biofilme formado em cada bráquete analisado. No presente estudo, dados semelhantes foram encontrados, tendo em vista que o amarrilho Convencional apresentou maiores escores médios para as espécies *Campylobacter showae* e *Actinomyces naeslundii I*, pertencentes aos complexos laranja e azul, respectivamente, enquanto O amarrilho *Super Slick™* apresentou maiores escores médios para as espécies *Veillonella parvula* e *Actinomyces naeslundii II* pertencentes aos complexos roxo e azul, respectivamente.

As espécies bacterianas dos complexos amarelo, verde, roxo e azul são microrganismos que não estão relacionados com doenças específicas e geralmente colonizam o biofilme dental previamente às espécies dos complexos laranja e vermelho. As espécies bacterianas dos complexos vermelho e laranja são espécies associadas com a doença periodontal (SOCRANSKY et al, 1998) e estão

relacionadas com a inflamação gengival comumente observada durante o tratamento ortodôntico (SALLUM et al, 2004).

Com isso, pode-se sugerir que a placa bacteriana formada sobre o amarrilho Convencional apresenta maior quantidade de periodontopatógenos. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes complexos quando comparados os dois tipos de amarrilhos. Ainda assim, por este estudo se tratar de uma análise preliminar, com um pequeno número amostral, não podemos chegar a conclusões definitivas.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que tanto o amarrilho Convencional quanto o *Super Slick*TM apresentaram crescimento microbiano de todas as espécies analisadas, entretanto, esse crescimento foi significativamente maior no amarrilho Convencional. Clinicamente, o desempenho dos dois amarrilhos foi similar, apresentando acúmulo bacteriano. É necessário um maior número amostral para chegarmos a resultados definitivos.

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF TWO TYPES OF ELASTOMERS IN THE ACCUMULATION OF BACTERIAL BIOFILMS IN ORTHODONTIC PATIENTS

ABSTRACT

This preliminary study has the objective to determine the influence of elastomeric rings in biofilm accumulation that are used in patients undergoing orthodontic treatment. The sample consisted of eight patients with fixed orthodontic appliances enrolled in the Certificate Course of Orthodontics, at the School of Dentistry -UFRGS. The elastomeric rings were placed in the upper lateral incisors, arranged in a contralateral form, and the position of the ligatures in the arch was randomly defined. The first data collection was held three weeks after the placement of the orthodontic appliance and the elastomeric rings. At this time they were removed and new ones were placed in inverse position of first collect. The second collection was made three weeks after the initial, respecting the interval between visits of the patient to the orthodontic clinic. Clinical evaluation was performed by a calibrated researcher after the removal of each ligature, under drying and good lighting through the use of the Bonded Bracket Index (BBI). The samples were analyzed by *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, verifying the composition and the total count of microorganisms in the biofilm accumulated around two different types of elastomeric rings. Through statistical analysis it was found that there is significant difference when compared the scores between the two types of elastomeric rings. The Conventional elastomeric rings presented higher quantities of microorganisms when compared with *Super Slick™* elastomeric rings ($p=0.006$). However, no significant differences were found for the scores when comparing among the bacterial complexes. For BBI scores analyzed it was found that there is no significant difference when comparing the two types of elastomeric rings. It was concluded that although *Super Slick™* elastomeric rings had less microbial growth for the species analyzed, a larger sample size is needed to obtain more reliable results.

Key Words: Orthodontics. Biofilm. Elastomeric rings.

REFERÊNCIAS

AHN, S.J.; LIM, B.S.; LEE, S.J. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.131, p.736-41, 2007.

ANHOURY, P; NATHANSON, D; HUGHES, C.V; SOCRANSKY, S; FERES, M; CHOU, L.L.T Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. **Angle Orthod**, v.72, n.4, p.338-43, Aug, 2002.

BANKS, P.A.; CHADWICK, S.M.; ASHER-MCDADE, C.; WRIGHT, J.L. Fluoride-releasing elastomerics - a prospective controlled clinical trial. **Eur J Orthod**, v.22, p.401-7, 2000.

BENSON, P.E.; IAN DOUGLAS, C.W.; MARTIN, M.V. Fluoridated elastomers: effect on the microbiology of plaque. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.126, p.325-30, 2004.

BOYD, R.L.; BAUMRIND, S. Periodontal considerations in the use of bands or bonds on molars in adolescents and adults. **Angle Orthod**, v.62, p.117-26, 1992.

BRUSCA, M.I.; CHARA, O.; STERIN-BORDA, L.; ROSA, A.C. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. **Angle Orthod**, v.77, p.331-6, 2007.

CIANCIO, S. G.; CUNAT, J.J.; MATHER, M.L.; HARVEY, D.H. A comparison of plaque accumulation in bonded vs banded teeth. **J Dent Res**, v.64, special issue, p.359, 1985.

DOHERTY, U.B.; BENSON, P.E.; HIGHAM, S.M. Fluoride-releasing elastomeric ligatures assessed with the in situ caries model. **Eur J Orthod**, v.24, p.371-8, 2002.

ELIAS, F.; PÌNZAN, A.; BASTOS, J.R.M. Influência do complexo flúor-xilitol no controle da placa dentária e do sangramento gengival em pacientes herbiátricos com aparelho ortodôntico fixo. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, v.11, n.5, Sept/Oct, 2006.

FALTERMEIER, A.; BÜRGERS, R.; ROSENTRITTC, M. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.133, p.S99-103, 2008.

FORSBERG, C.M.; BRATTSTRÖM, V.; MALMERG, E.; NORD, C.E. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. **Europ J Orthod**, v.13, n.5, p.416-420, 1991.

GASTEL, J.V.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W.; PAUWELS, M.; COUCKE, W.; CARELS, C. Microbial adhesion on different bracket types in vitro. **Angle Orthod**, v.79, p.915-921, 2009.

GORELICK, L.; GEIGER, A.M.; GWINNETT, J. Incidence of white spot formation after bonding and banding. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.81, n.2, p.93-98, Feb, 1982.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; DIBART, S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. **J Clin Periodontol**, v.19, p.84-91, 1992.

HUSER, M.C.; BAHENI, P.C.; LANG, R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.97, n.3 p.213-218, Mar, 1990.

LESSA, F.C.; ENOKI, C.; ITO, I.Y.; FARIA, G.; MATSUMOTO, M.A.; NELSON-FILHO, P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.131, p.705, 2007.

LIM, B.S.; LEE, S.J.; LEE, J.W.; AHN, S.J. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.133, p.882-8, 2008.

MAGNO, A.F.F.; ENOKI, C.; YOKO ITO, I.; MATSUMOTO, M.A.N.; FARIA, G.; NELSON-FILHO, P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.133, p.S104-9, 2008.

MATTICK, C.R.; MITCHELL, L.; CHADWICK, S.M.; WRIGHT, J. Fluoride-releasing elastomeric modules reduce decalcification: a randomized controlled trial. **J Orthod**, v.28, p.217-9, 2001.

MCNEILL, C.J.; WILTSHIRE, W.A.; DAWES, C.; LAVELLE, C.L.B. Fluoride release from new light-cured orthodontic bonding agents. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.120, p.392-7, 2001.

MEI, L., BUSSCHER, H.J., VAN DER MEI, H.C., CHEN, Y., DE VRIES, J., REN, Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket–adhesive–enamel junction in orthodontic treatment. **Eur J Oral Sci**, v.117, p.419-426, 2009.

Metafasix technology™. Assorted low friction products: products transformed by technology. Produzido por TP Orthodontics, Inc. [folder]. Disponível em: <http://www.tportho.com/products/metafasix.html> Acessado em 05 de Novembro de 2009.

PASCHOS, E.; KUROCHKINA, N.; HUTCH, K.C.; HANSSON, C.S.; RUDZKI-JANSON, I. Failure rate of brackets bonded with antimicrobial and fluoride-releasing, self-etching primer and the effect on prevention of enamel demineralization. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.135, p.613-20, 2009.

PELLEGRINI, P.; SAUERWEIN, R.; FINLAYSON, T.; MCLEOD, J.; COVELL JR, D.A.; MAIER, T.; MACHIDA, C.A. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: Quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.135, p.426.e1-426.e9, 2009.

PENDER, N. Aspects of oral health in orthodontic patients. **Br J Orthod**, v.13, p.95-103, 1986.

PUPPIN FILHO, A.; BRUNHARO, I.H.V.P.; COSTA, T.D.; MEDEIROS, U.V. Controle da doença cárie em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. **Rev Brasil Odont**, v.59, n.4, Jul/Ago, 2002.

SALLUM, E.J.; NOUER, D.F.; KLEIN, M.I.; GONÇALVES, R.B.; MACHION, L.; SALLUM, A.W. ET AL. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.126, p.363-6, 2004.

SHAW, W.C.; RICHMOND, S.; O'BRIEN, K.D.; BROOK, P.; STEPHENS, C.D. Quality control in orthodontics: indices of treatment need and treatment standards. **Br Dent J**, v.170, p.107-112, 1991.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 322-327, 1992.

SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. "Checkerboard" DNA-DNA Hybridization. **Biotechniques**, v.17, n.4, p.788-792, 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol**,v.25, p.134-44, 1998.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; MARTIN, L.; HAFFAJEE, J.A.; UZEL, N.G. ET AL. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol Immunol**, v.19, p.352-362, 2004.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; YASKELL, T.; TORRESYAP, G.; TELES, R. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. **J Clin Periodontol**, v.36, p. 642-649, 2009.

SOUZA, R.A.; MAGNANI, M.B.B.A.; NOUER, D.F.; SILVA, C.O.; KLEIN, M.I.; SALLUM, E.A., GONÇALVES, R.B. Periodontal and microbiologic evaluation of 2 methods of archwire ligation: Ligature wires and elastomeric rings. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.134, p.506-12, 2008.

SUKONTAPATIPARK, W.; EL-AGROUDI, M.A.; SELLISETH, N.J.; THUNOLD, K.; SELVIG, K.A. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. **Eur J of Orthod**, v.23, n.5, p.475-484, Oct, 2001.

TÜRKKAHRAMAN, H.; SAYIN, Ö.; BOZKURT, F.Y.; YETKIN, Z.; KAYA, S.; ÖNAL, S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. **Angle Orthod**, v.75, p.227-32, 2005.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I. Este estudo tem por finalidade determinar a influência do tipo de amarrilho elástico utilizado no acúmulo de biofilme em pacientes que estejam em tratamento ortodôntico fixo.

Serão analisadas:

- Composição e contagem total de microorganismos na placa acumulada em torno de dois diferentes tipos de amarrilhos elásticos
- Avaliação clínica do acúmulo de placa através do índice de placa por bráquetes colados (bonded bracket index – BBI)

II. O paciente que concordar em participar desse estudo será examinado pelo cirurgião-dentista responsável e instruído quanto à higiene bucal. Após isso, o próprio paciente passará a realizar a limpeza dos seus dentes conforme lhe foi ensinado no início da pesquisa. O teste será feito no arco superior, onde um dos tipos de elástico será colocado no lado direito do aparelho, enquanto o outro tipo será colocado do lado esquerdo. A cada semana que o paciente vier à consulta, esses elásticos serão coletados e examinados. Ao final do estudo o paciente receberá o resultado do trabalho.

Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que serei submetido pelo presente Projeto de Pesquisa.

Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- Da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- Do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo;
- Da disponibilidade de tratamento médico e a indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos à minha saúde, diretamente causados por esta pesquisa.

O Pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa é a Dra. Karina Santos Mundstock (Fone: 3308.5201)

Nome do Voluntário _____ Data _____/_____/_____

Assinatura do Responsável _____

RG do Responsável _____

Telefone do Responsável _____

APÊNDICE B - Ficha Clínica Adaptada

FICHA CLÍNICA

1 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____ Data de nascimento: ___ / ___ / _____
 Idade: _____ anos _____ meses Sexo: ()F ()M
 Pai: _____
 Mãe: _____
 Endereço: _____
 Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____
 Telefone para Contato: _____

História Médica Atual

Estado geral de saúde: _____
 Toma ou tomou algum medicamento nos últimos 03 (três) meses? _____
 Tem alergia a algum medicamento? _____

2 – EXAME CLÍNICO

	DENTES	TIPO DE AMARRILHO INSERIDO	BBI
1ª SEMANA	12	()C ()NC	/
	22	()C ()NC	
4ª SEMANA	12	()C ()NC	
	22	()C ()NC	
7ª SEMANA	12	()C ()NC	
	22	()C ()NC	

LEGENDAS:

BBI (Bonded Bracket Index):
0 – ausência de placa;
1 – presença de placa somente no bráquete;
2 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, sem extensão gengival;
3 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, com extensão para a papila;
4 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, cobrindo parcialmente a gengiva;
5 – presença de placa no bráquete e na superfície dentária, cobrindo totalmente a gengiva;

C = Convencional NC = Não-Convencional
--

ANEXOS

FIGURA A1- Resumo das etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

A - Fervura das amostras em banho-maria por 10 minutos.

B - Neutralização das suspensões das amostras pela adição de 800 µL de acetato de amônia a 5 M.

C - *Minislot-30*.

D - Introdução da membrana de nylon (15 x 15 cm) e papéis de filtro no interior do *Minislot-30*.

E - Deposição das amostras oriundas dos bráquetes nas canaletas do *Minislot-30*.

F - Exposição da membrana à 120°C por 20 minutos, para fixação do DNA.

G - Pré-Hibridização da membrana a 42°C por 1 hora.

H - Introdução da membrana no *Miniblotter-45* evidenciando as canaletas perpendiculares às linhas com o DNA das amostras.

I - Preenchimento das canaletas do *Miniblotter-45* com as sondas de DNA marcadas com digoxigenina.

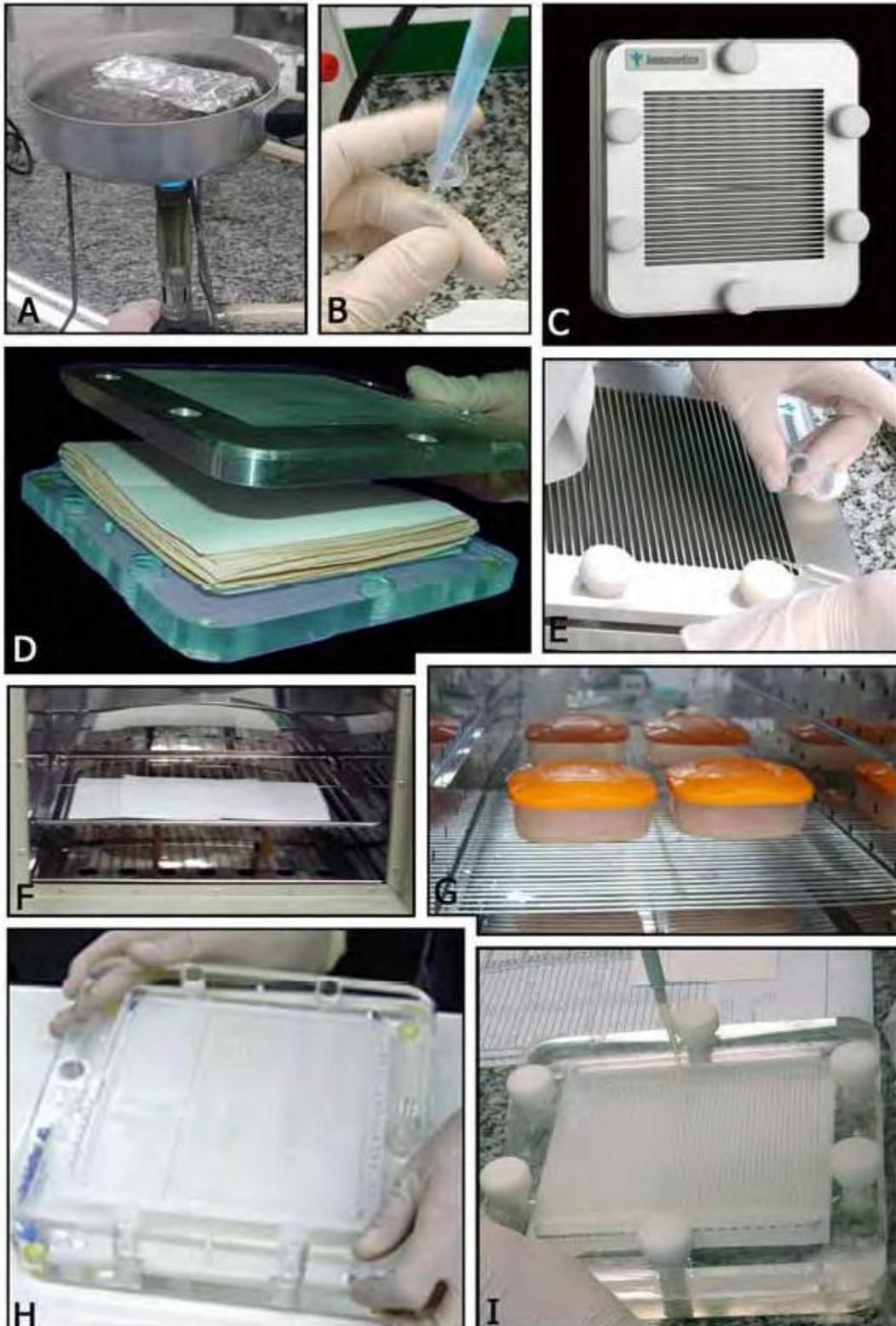


FIGURA A2- Resumo das etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* (continuação).

A - Hibridização em *buffer* de Formamida a 42°C por 20 horas.

B- Lavagem de alta adstringência em solução tampão SSC 0,4 M a 65°C por 40 minutos para a remoção das sondas que não hibridizaram completamente.

C - Imersão por 1 hora em solução de bloqueio.

D - Acréscimo do anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina.

E - Lavagem da membrana em solução específica para remoção de excessos do anticorpo.

F - Incubação da membrana a 37°C, por 45 minutos, em solução *CDP-Star™ Detection Reagent*, contendo substrato para fosfatase alcalina.

G - Cassete de autoradiografia contendo o filme radiográfico.

H - Filme radiográfico com os sinais de quimioluminescência.

