

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Lívia de Oliveira Pereira

**OCORRÊNCIA DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS NA SALIVA TOTAL EM PACIENTES
SOB TRATAMENTO ORTODÔNTICO**

Juiz de Fora
2015

LÍVIA DE OLIVEIRA PEREIRA

**OCORRÊNCIA DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS NA SALIVA TOTAL EM PACIENTES
SOB TRATAMENTO ORTODÔNTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, área de concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Marcio José da Silva Campos

Juiz de Fora
2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Oliveira Pereira, Livia .
Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva total em pacientes sob tratamento ortodôntico / Livia de Oliveira Pereira. -- 2015.
61 p. : il.

Orientador: Marcio José da Silva Campos
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, 2015.

1. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. 2. Saliva. 3. Tratamento Ortodôntico. I. José da Silva Campos, Marcio, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio José da Silva Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a Marta Fonseca Martins
Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora

Suplentes:

Prof. Dr. Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a Cristiane Corsini Medeiros Otenio
Universidade Estácio de Sá - Juiz de Fora

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação

A Deus por ser sempre fiel e aos meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e sempre ao meu querido Deus porque Ele tem sido fiel para comigo. Amo o Senhor em todo tempo e em qualquer circunstância! À Ti toda honra e toda glória!

Aos meus pais, Marcílio (*in memoriam*) e Vicentina, por me ensinarem o caminho certo e me amarem incondicionalmente! Pai, te amo para sempre! Mãe você é a melhor de todas! Obrigada por ser meu porto seguro sempre! Te amo para sempre!

À minha família “Oliveira”, em especial aos meus tios (as) que estiveram sempre me orientando, orando e torcendo pelo meu sucesso! Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Campos, por ter me ajudado desde o início e por ser meu exemplo na área acadêmica.

À Prof. Dra. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves por ter me iniciado e incentivado na pesquisa!

À EMBRAPA-Juiz de Fora, especialmente à Dra. Marta Martins e Dra. Isabela Fonseca por terem feito as análises da pesquisa e estarem sempre abertas para responder meus questionamentos. Muito obrigada!

Às amigas da especialização por terem me ajudado e estarem sempre me incentivando nos momentos difíceis que passei nesses dois anos.

Às amigas do mestrado, Jéssica Avelar, Lívia Salgado e Mariana Nadaes! Vocês foram um presente de Deus na minha vida! Agradeço em especial à Lívia Salgado por ter me ajudado com as coletas da pesquisa! Sem você não teria chegado até aqui! Obrigada!

Agradeço aos meus amigos da Congregação Metodista do bairro Borboleta, pelas orações e incentivo em todas as áreas da minha vida! Amo vocês!

*“Buscai em Primeiro Lugar o Reino de Deus e a Sua Justiça e todas as
coisas vos Serão Acrescentadas”*

Mateus 6.33

PEREIRA, L.O. Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva total em pacientes sob tratamento ortodôntico. Juiz de Fora (MG), 2015. 60f. Apresentação de Dissertação (Curso de Pós-Graduação stricto sensu – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).

RESUMO

O tratamento ortodôntico apresenta potencial para causar alterações no periodonto devido ao acúmulo de biofilme, em função da dificuldade de realização de uma adequada higiene bucal na presença de bandas e braquetes. OBJETIVOS: avaliar a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva total em indivíduos antes e depois da instalação do aparelho ortodôntico fixo metálico. METODOLOGIA: Foram avaliados 15 pacientes da Clínica de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia – UFJF e de consultórios particulares, do sexo feminino e masculino, com idade média de 18 anos e 3 meses (14-18 anos); 7 homens e 8 mulheres. Amostras de saliva total foram coletadas um mês antes (T1), imediatamente antes (T2), 15 dias antes (T3) e 1 mês após a instalação de aparelho fixo Edgewise Standard (Morelli 10.30.900) nos dentes superiores e inferiores, com exceção dos segundos e terceiros molares. A coleta de saliva foi realizada com o dispositivo Salivete Cortisol (*Sarstedt* ® Nümbrecht, Alemanha), com *swab* neutro de poliéster e microtubo. A partir das amostras coletadas, foi realizada a extração do DNA para identificação da bactéria (Aa) por meio do método Reação em Cadeia Polimerase em tempo real. RESULTADOS: Após as análises, não havia a presença da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em nenhum dos intervalos das amostras testadas. Não houve deterioração da condição periodontal (índice de placa visível, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem) após T4. CONCLUSÕES: a) não foi possível identificar a ocorrência da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva nem antes (um mês antes), nem no dia da colagem, nem 15 e um mês após a colagem do aparelho fixo; b) o

uso do aparelho fixo não contribuiu para o aumento dos índices de placa, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem.

PALAVRAS-CHAVE: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, aparelho ortodôntico, saliva

PEREIRA, L.O. ***Occurrence Aggregatibacter actinomycetemcomitans in whole saliva in patients undergoing orthodontic treatment.*** Juiz de Fora (MG), 2015. 60f. Apresentação de Dissertação (Curso de Pós-Graduação stricto sensu – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).

ABSTRACT

Orthodontic treatment has potential to cause changes in periodontal due to biofilm accumulation, due to the difficulty of conducting a proper oral hygiene in the presence of bands and brackets. **OBJECTIVES:** Evaluate the occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in whole saliva in individuals before and after the installation of metal orthodontic braces and assess whether there has been deterioration of periodontal status (visible plaque index, probing depth and bleeding on probing) after installing braces. **METHODS:** We evaluated 15 patients of Specialization in Clinical Orthodontics, School of Dentistry - UFJF and private practices, female and male, with an average age of 18 years and 3 months (14-18 years); 7 men and 8 women. Whole saliva samples were collected one month before (T1), immediately before (T2), 15 days before (T3) and one month after the installation of fixed Edgewise Standard unit (Morelli 10.30.900) on the upper and lower teeth, except the second and third molars. The saliva collection was done with the Salivete Cortisol device (Sarstedt ® Nümbrecht, Germany), with neutral swab polyester and micro tube. From samples collected, extraction of DNA for bacteria identification was carried out (Aa) by Polymerase Chain Reaction method in real time. **RESULTS:** After the analysis, there was no presence of bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in any of the intervals of the samples tested. There was no deterioration of the periodontal status (visible plaque index, probing depth and bleeding on probing) after T3. **CONCLUSIONS:** a) Unable to identify instances of Aa bacteria in saliva either before or after bonding of fixed appliances; b) the use of braces did not contribute to increase plaque index, probing depth and bleeding on probing.

KEYWORDS: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, orthodontic treatment, saliva*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAPN	anaeróbios pigmentados de negro
CEB	células epiteliais bucais
CPI	Índice de comunidade periodontal
Cr	<i>Campylobacter rectus</i>
CT	Cycle Threshold
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxinucleotídeos trifosfato
FRET	Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência
IL	Interleucina
IP	índice de placa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mm	milímetros
NiTi	Níquel Titânio
nM	Nanomolar
PA	periodontite do adulto
PBI	Índice de sangramento de papila
PCR	Reação em cadeia polimerase
pH	potencial de hidrogénio
PIP	perda da inserção periodontal
PJL	periodontite juvenil localizada
PPR	periodontite de progressão rápida
PS	profundidade de sondagem
RNA	ácido ribonucleico
s	segundos

SS sangramento à sondagem

Tn *Tannerella forsythensis*

TNF fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

+	Positivo
-	Negativo
μL	Microlitro
°C	grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 DOENÇA PERIODONTAL.....	17
2.1.1 Gengivite	19
2.1.2 Periodontite	20
2.1.3 Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa)	22
2.2 ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS BUCAIS EM PACIENTES EM TRATAMENTO ORTODÔNTICO.....	26
2.3 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE	30
2.4 PCR EM TEMPO REAL	31
2.4.1. Sistema SYBR® Green	33
3 PROPOSIÇÃO	35
4 METODOLOGIA	36
4.1 MATERIAL.....	36
4.2 MÉTODOS.....	36
4.2.1 Calibração	36
4.2.2 Exame clínico	37
4.2.3 Coleta das amostras de saliva	38
4.2.4 Análise das amostras de saliva – PCR	39
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	55

ANEXO 1	55
ANEXO 2	56
APÉNDICE.....	59

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é a maior responsável pela perda de dentes em seres humanos, devido à sua natureza crônica, indolor e desenvolvimento de forma gradativa e assintomática (MACHION *et al.*, 2000).

O tratamento ortodôntico apresenta potencial para causar alterações no periodonto devido ao acúmulo de biofilme, em função da dificuldade de realização de uma adequada higiene bucal na presença de bandas e braquetes. Conseqüentemente, o controle inadequado da placa bacteriana pode promover alterações periodontais, que podem ser agravadas pelo tratamento ortodôntico (MAIA, 2011).

Como o risco de dano periodontal existe, é necessário realizar controle contínuo dos pacientes ortodônticos, com instruções de higiene bucal e constante motivação durante todo o período da terapia (MAIA, 2011).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um cocobacilo anaeróbio capnofílico, Gram-negativo, imóvel, não formador de esporos e vem sendo foco de estudo para pesquisadores (WILSON *et al.*, 1995; SRIRAMAN, MOHANRAJ e NEELAKANTAN, 2014).

Seu principal papel se destaca na etiologia da doença periodontal em suas várias formas, incluindo a periodontite agressiva localizada, periodontite crônica e periodontite refratária (SLOTS *et al.*, 1986; ZAMBON *et al.*, 1996).

Naranjo *et al.* (2006) observaram que os braquetes influenciam a composição da microbiota subgingival indiretamente, ocorrendo um aumento significativo na contagem e frequência de *Porphyromonsa gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Fusobacterium nucleatum* em um curto período (3 meses) após a colagem de braquetes.

As condições supragengivais relacionadas ao tratamento ortodôntico são reversíveis em pacientes com bom padrão de higiene bucal (Naranjo *et al.*, 2006; Ristic *et al.*, 2007; Zachrisson e Zachrisson, 1972) após a remoção dos braquetes. Ristic *et al.* (2007) observaram um aumento nos parâmetros clínicos (índice de placa, índice gengival, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem) e microbianos (presença ou ausência de *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromas gingivalis* e *Fuso nucleatum*) em 3 meses após o início do tratamento ortodôntico. Porém, os resultados deste estudo

demonstraram claramente uma tendência de diminuição dos parâmetros clínicos e dos achados microbianos em 6 meses de avaliação.

Ristic et al. (2007) observaram uma mudança no perfil microbiológico após a instalação de aparelho ortodôntico, com o aumento na contagem de bactérias periodontopatogênicas (*P. intermédia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*). Essas bactérias são fatores etiológicos importantes que, quando presentes em um hospedeiro suscetível e ambiente favorável, poderão levar à progressão da doença.

A colocação de aparelhos ortodônticos em pacientes com periodonto saudável leva a um aumento no acúmulo de biofilme e inflamação gengival e influencia a composição da microbiota subgengival indiretamente em um curto período de tempo após o início do tratamento ortodôntico, porém, essas condições são reversíveis em pacientes com bom padrão de higiene bucal (MAIA, 2011).

As alterações subgengivais que o Aa provoca em pacientes em tratamento ortodôntico com aparelhos fixos tem sido bastante estudada na literatura (PAOLANTONIO *et al.* 1996, 1997, 1999; SALLUM *et al.*, 2004; SPEER *et al.*, 2004; NARANJO *et al.*, 2005; CHERNOCHOVÁ *et al.* (2008); CHOI *et al.* (2009); DEMLING *et al.* (2009); entretanto, não há estudos sobre a ocorrência de Aa na saliva desses pacientes.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva total em indivíduos antes e após da instalação do aparelho ortodôntico fixo metálico e verificar se houve deterioração da condição periodontal (índice de placa visível, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem) após a instalação do aparelho fixo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal acomete um grande número de indivíduos em todo o mundo. Seu principal fator etiológico é o biofilme dental, o qual promove uma reação inflamatória dos tecidos periodontais de proteção (gengiva livre e inserida) e de suporte (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal), devido a um processo infeccioso mediado por microrganismos (AAP, 1996).

De acordo com Kinane e Lindhe (1999) o fator etiológico primário da doença periodontal, o biofilme dental, pode ter seu acúmulo aumentado pela presença de fatores locais que facilitam sua retenção.

A exposição do tecido gengival ao biofilme dental resulta na inflamação do tecido, o qual responde manifestando sinais clínicos da gengivite, cujas características são alterações da cor e do contorno gengival, mudança da temperatura intra-sulcular, aumento do exudato gengival, sangramento espontâneo ou provocado (MARIOTTI, 1999).

Bascones e Caballeros (2000), citam que entre as bactérias associadas à doença periodontal, há duas espécies claramente associadas a esta doença: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. O termo doença periodontal refere-se à gengivite e à periodontite (KINANE, 2001).

De acordo com Lotufo, Pannuti e Saraiva (2001) apesar dos avanços relacionados à etiopatogenia das infecções periodontais, o diagnóstico e a classificação dessas doenças, ainda hoje, baseiam-se, quase inteiramente, na avaliação clínica e no exame radiográfico.

Existem vários fatores que favorecem o desenvolvimento da doença periodontal como idade avançada, tabagismo, alcoolismo, baixas condições socioeconômicas, poucos cuidados com a saúde bucal, dificuldade de acesso aos serviços de saúde, assim como a existência de predisposição genética. É classificada em gengivite, quando está limitada à superfície gengival e, periodontite, quando atinge os tecidos mais profundos. A expressão clínica dos diferentes quadros de periodontite dependerá da interação entre os fatores do hospedeiro,

ambientais e do agente microbiológico. A colonização por bactérias é necessária, porém não é suficiente para que exista a doença, sendo necessário um hospedeiro suscetível (MARTÍNEZ e RUIZ, 2004).

Os micro-organismos mais frequentemente associados à doença periodontal são *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola* (SPAHR *et al.*, 2006).

Clinicamente, a doença periodontal é caracterizada pela presença de edema, hemorragia e exsudado. Ao progredir, surge halitose e as bolsas periodontais, que são espaços entre os dentes e as gengivas, superiores a 3 mm. Essas bolsas são produzidas pela perda de tecido conjuntivo e pela reabsorção óssea induzida por infecção crônica ocorrendo a reabsorção do osso alveolar, um aumento na distância entre a linha amelocementária e a crista óssea alveolar (PÉREZ e PÉREZ, 2007).

De acordo com Késic *et al.* (2009) a doença periodontal é uma doença crônica e degenerativa do periodonto que é constituído da gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. O principal fator etiológico para o desenvolvimento da doença periodontal é a placa dental ou biofilme oral em associação com bactérias anaeróbicas. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um dos mais poderosos periodontopatógenos. A capacidade de lipopolissacarídeos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* para estimular macrófagos a liberar as interleucinas IL-1, IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF) é de grande importância porque essas citocinas são capazes de estimular a reabsorção óssea. Sua ocorrência deve ser evitada uma vez que é encontrado na placa dental e bolsas periodontais.

Bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus* e *Treponema denticola* desempenham um papel importante na iniciação e progressão da doença periodontal e têm sido freqüentemente detetadas nas bolsas subgengivais de pacientes com periodontite. Ito *et al* (2010) investigaram a relação entre a detecção de bactérias periodontopatogênicas e os parâmetros clínicos periodontais em vinte e seis pacientes. A detecção precoce de bactérias associadas com o desenvolvimento da periodontite através do método do PCR quantitativo pode fornecer informações importantes para o diagnóstico e tratamento subsequente e o monitoramento do

complexo vermelho e *C.rectus* pode ser particularmente importante para a terapia periodontal (ITO *et al.*, 2010).

A doença periodontal é a principal causa da perda dental na população adulta, representando um dos mais sérios problemas sócio-econômicos e de saúde pública (GASPARETTO, ARANA-CHAVEZ E AVILA-CAMPOS, 2000).

Para Machion *et al.* (2000) a doença periodontal é a maior responsável pela perda de dentes em seres humanos, devido à sua natureza crônica, indolor e desenvolvimento de forma gradativa e assintomática.

2.1.1 Gengivite

Gengivite é uma condição inflamatória dos tecidos moles que envolvem os dentes e representa uma resposta inflamatória em decorrência da presença de biofilme aderido às superfícies dentárias, podendo ser modificada por fatores como fumo, certas drogas e mudanças hormonais que ocorrem na puberdade e gravidez (KINANE, 2001).

A gengivite é uma inflamação superficial da gengiva, na qual, apesar das alterações patológicas, o epitélio de união mantém-se unido ao dente, não ocorrendo a perda de inserção. É uma situação reversível, caso sejam removidos os fatores etiológicos. Contudo, tem um papel precursor na perda de inserção dos dentes quando estes fatores não são eliminados (ALMEIDA *et al.*, 2006).

A localização da placa bacteriana associada à gengivite na porção gengival do dente desempenha um papel fundamental em sua formação. Contudo, fatores locais e outros fatores também podem influenciar a resposta do hospedeiro. Basicamente podem ser divididos em (LIÉBANA, CASTILLO e ÁLVARES, 2004):

a) Gengivite sem fatores que favorecem o seu aparecimento, etiologicamente relacionada com a placa e o cálculo resultante da ausência de adequada higiene bucal e geralmente afeta toda a população em algum momento durante a sua vida;

b) Gengivite com fatores locais que promovem seu aparecimento, na qual além de placa e cálculo, alterações anatômicas dentais estão presentes, como

apinhamento dentário ou iatrogenias, devido a obturação e restaurações defeituosas ou aparelhos ortodônticos, que favorecem o acúmulo de placa bacteriana e dificultam a sua eliminação;

c) Doenças gengivais associada à placa que modificam a resposta do hospedeiro. Nestes casos, outras diferentes fatores sistêmicos estão presentes, além do fator microbiano e geralmente são acompanhadas de alargamentos gengivais. Tal é o caso dos fenômenos endócrinos fisiológicos (puberdade, ciclo menstrual, gravidez), fatores endócrinos patológicos (diabetes *mellitus*), nutricionais (falta de vitamina C), discrasias sangüíneas (certos tipos de leucemias) e certos medicamentos (contracetivos orais, algumas drogas anti-epiléticas, imunossupressores e os certos antagonistas do cálcio) e doenças gengivais relacionadas com placas com fatores desconhecidos, sendo classificadas como idiopáticas.

De acordo com Touyz (2008) geralmente ocorrem gengivorragias e bolsas de até 3 mm na gengivite. Ela sempre precede a periodontite, na qual ocorrem bolsas periodontais superiores a 3 mm e perda da inserção gengival, mas apenas 30% dos casos de gengivite progridem para alguma forma de periodontite. A doença periodontal tem início insidioso e os indivíduos afetados raramente detetam quaisquer sintomas nas etapas iniciais do desenvolvimento da doença. Logo, as infecções crônicas provocadas pela periodontite progridem muitas vezes sem sintomas durante muitos anos, antes do diagnóstico inicial ou antes do aparecimento de manifestações clínicas.

A gengivite quando não tratada pode evoluir para periodontite crônica, cujas características clínicas são inflamação gengival, sangramento à sondagem, aumento na profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e consequente perda óssea alveolar (KINANE e LINDHE, 1999).

2.1.2 Periodontite

A periodontite é definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por microrganismos específicos, resultando em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar (NOVAK, 2004).

A periodontite corresponde a uma situação de inflamação com destruição do periodonto e ocorre quando as alterações patológicas verificadas na gengivite progridem até haver destruição do ligamento periodontal e migração apical do epitélio de união. Há acúmulo de placa bacteriana ao nível dos tecidos mais profundos, o que provoca uma perda de inserção por destruição do tecido conjuntivo e por reabsorção do osso alveolar (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Nagy e Novak (2004) afirmaram que a perda óssea vertical ocorre quando a perda de inserção e osso em superfície dental são maiores do que acontece na superfície adjacente. Já a horizontal, ocorre quando a perda de inserção e osso progridem a uma taxa uniforme na maioria das superfícies dentais. Normalmente, a perda óssea vertical está associada a defeitos ósseos angulares e formação de bolsas intraósseas. Ao passo que a horizontal está associada normalmente com bolsas supra-ósseas.

Dzink, Socransky e Haffajee (1988) afirmaram que a periodontite é precedida pela gengivite e isto implica que a prevenção desta é também uma medida de prevenção daquela. Devido a limitações do tratamento mecânico no sentido de diminuir ou suprimir microrganismos subgengivais, tem sido sugerido a utilização de antimicrobianos locais ou sistêmicos para a complementação do tratamento mecânico.

A patogenia da periodontite é mais complexa. Os micro-organismos que compõem a placa subgengival são capazes de agir diretamente sobre os tecidos periodontais ou modificar a resposta do hospedeiro, enquanto que a participação da placa em si (normal, reduzida ou aumentada) é tão decisiva como a ação das próprias bactérias no aparecimento da doença. A periodontite, em geral, representa a origem de complicações como a cárie de raiz, processos endoperiodontais e abscessos periodontais. As diversas modalidades de PCR são particularmente importantes no diagnóstico microbiológico da periodontite, embora deva ser salientado que estudos de sensibilidade *in vitro* não podem ser realizados utilizando esta técnica (MARTÍNEZ e RUIZ, 2004).

Silva (2006) avaliou a prevalência de diferentes bactérias da microbiota subgengival em três grupos de doenças através de cultivos anaeróbicos. Amostras de fluido subgengival foram coletadas das bolsas subgengivais com dois cones de papel estéreis foram inseridos até o fundo da bolsa periodontal e deixados no local

por 20s, sendo então transferidos para um pequeno frasco contendo fluido de transporte reduzido acrescido de 20% de glicose. As amostras foram cultivadas sob atmosfera anaeróbica e microaerófila usando meios de cultura seletivos e não seletivos. Os isolados foram caracterizados ao nível de espécie através de testes bioquímicos convencionais e também pelo uso de um sistema comercial rápido de identificação bacteriana.

Os resultados indicaram que os bacilos anaeróbios Gram negativos e microaerófilos foram as bactérias mais frequentemente detetadas nas amostras de todos os grupos.

A periodontite é a principal causa da perda dentária na população adulta e resulta da substituição de uma microbiota bacteriana normal (constituída por bactérias Gram positivas) por uma microbiota constituída por Gram negativos anaeróbios. Seu tratamento é realizado removendo, primeiramente, a fonte de infecção, a placa dental e o cálculo aderidos à coroa do dente e à superfície da raiz. Para isso é necessário fazer uma terapia mecânica com alisamento radicular fechado ou aberto (procedimento cirúrgico) ou cirurgia para a remoção da bolsa periodontal. Às vezes, a agressividade da doença pode exigir o uso de antibióticos locais ou sistêmicos (PÉREZ e PÉREZ, 2007).

2.1.3 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*/ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (antes de 2006, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) é um cocobacilo anaeróbio capnofílico, Gram-negativo, imóvel, não formador de esporos e vem sendo foco de estudo para pesquisadores (WILSON *et al.*, 1995; SRIRAMAN, MOHANRAJ e NEELAKANTAN, 2014).

Está associado à várias doenças infecciosas, tais como endocardite, meningite, abscessos, septicemia, e osteomielite (MUHLE *et al.*, 1979; PAGE; KING, 1966). No entanto, seu principal papel se destaca na etiologia da doença periodontal

em suas várias formas, incluindo a periodontite agressiva localizada, periodontite crônica e periodontite refratária (SLOTS *et al.*, 1986; ZAMBON *et al.*, 1996).

Entretanto, estudos também têm mostrado a presença desta bactéria como microbiota residente da cavidade bucal, em pacientes com saúde periodontal (TAN, SONG, ONG, 2002).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans possui inúmeros fatores de virulência que aumentam sua sobrevivência na cavidade oral e o tornam capaz de driblar as estratégias protetoras do hospedeiro (FIVES-TAYLOR, 1999).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans tem a habilidade de se aderir às células epiteliais da mucosa oral e às superfícies dentais, assim como realiza a coagregação com outras bactérias, sendo também capaz de invadir células orais, características consideradas essenciais para a patogênese das doenças periodontais. Estes mecanismos de adesão e invasão às células epiteliais, certamente envolvem interações específicas e não específicas, com a participação de outros reguladores deste processo (MEYER; FIVES-TAYLOR, 1994).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans tem a capacidade de colonizar superfícies dentais formando populações agrupadas em biofilme, característica de bactérias periodontopatogênicas. Sabe-se que colônias rugosas apresentam maior capacidade na formação de biofilme assim como maior resistência às mudanças de salinidade e pH. Tal capacidade é favorecida pela presença de fímbrias, que embora não sejam consideradas essenciais para o processo adesivo em algumas superfícies, aumentam as interações entre microrganismos e superfícies, colaborando desta maneira para a estabilização do biofilme (INOUE *et al.*, 2003).

A doença periodontal destrutiva é freqüentemente associada à este patógeno e é considerada a principal causa de periodontite de início precoce. Na periodontite pré-puberal, a prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é de 40-100%. A Periodontite juvenil localizada é a doença que está mais associada com a bactéria, sendo que é encontrada em 75-100% das lesões. Acredita-se que os principais patógenos periodontais de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tenham uma origem exógena porque eles raramente são encontrados em indivíduos periodontalmente saudáveis. No entanto, alguns autores argumentam que as infecções periodontais são causadas pela microbiota saprófita bucal e,

consequentemente, têm uma origem endógena (BASCONES e CABALLEROS, 2000).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um dos primeiros colonizadores da placa das superfícies dos dentes, o que sugere que ele possa colonizar a superfície limpa e saudável. Em relação à idade, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* geralmente ocorre em pacientes jovens e sua presença diminui com a idade. O habitat natural do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é a área subgingival, pois eles necessitam para o seu desenvolvimento um ambiente anaeróbico como os proporcionados pelas bolsas periodontais, mas também são encontrados na área subgingival numa proporção elevada (BASCONES e CABALLEROS, 2000).

Em um periodonto saudável, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pode estar presente em baixas proporções e com crescimento controlado, porém aumentando o número desses patógenos, a homeostase do ecossistema é alterada, levando ao aparecimento da doença periodontal. Uma vez que o nicho ecológico desta bactéria é a área subgingival, é provável que bactérias presentes na saliva venham da bolsa periodontal, de modo que quanto maior a quantidade de saliva, maior o risco de recolonização. Com o tratamento periodontal pode-se eliminar ou reduzir significativamente a presença dessas bactérias na saliva, por pelo menos seis meses. No entanto, não parece possível a remoção destas bactérias das membranas mucosas (BASCONES e CABALLEROS, 2000).

Quando *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está presente em um paciente periodontalmente não tratado, ele pode persistir por um longo tempo, indicando que os mecanismos de defesa do hospedeiro não conseguem removê-lo. O tratamento de raspagem e alisamento radicular parece ser insuficiente para erradicar o micro-organismo, pois ele tem a capacidade de invadir os tecidos gengivais, sendo necessária antibioticoterapia sistêmica (BASCONES e CABALLEROS, 2000).

Paolantonio *et al.* (2000), objetivaram relatar sobre a prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 780 crianças e adolescentes saudáveis de uma área rural da Itália Central e compará-la com indivíduos de uma área urbana da mesma região, investigando também a relação entre a presença desta bactéria e as condições clínicas periodontais. No grupo urbano, ambos indivíduos PIP+ abrigavam a bactéria, enquanto entre as crianças das áreas rurais, 3 com

periodontite juvenil e 13 com periodontite precoce abrigavam o patógenos. O risco relativo para sítios com PIP+ foi significativamente maior (2,42) nos indivíduos rurais que abrigavam a bactéria. Sua presença foi relacionada a um risco maior que 50% de sítios com SS+.

Segundo Cortelli, Cortelli e Jorge (2001), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um bastonete Gram-negativo, pequeno, não formador de esporo, imóvel, anaeróbio facultativo e que se desenvolve melhor em ambientes de anaerobiose. Segundo eles, a bactéria pode ser encontrada em maiores proporções em indivíduos com as formas de periodontite. Já nos indivíduos com saúde periodontal ou com gengivite, é encontrada em pequenas quantidades.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans está associada com a doença periodontal, especialmente periodontite agressiva localizada e produz uma leucotoxina potente. Sriraman, Mohanraj e Neelakantan (2014)

Vieira *et al* (2009) utilizaram a cultura e PCR e avaliaram a ocorrência desse micro-organismo e a distribuição de cepas leucotoxina isolado de 48 índios brasileiros com gengivite e 38 com periodontite crônica. Amostras supragengivais, subgengivais e saliva de cada paciente foram coletadas. A saliva foi coletada através de Salivettes. Os resultados mostraram que o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi isolado a partir de 8,33% de amostras de saliva, supragengival e subgengival de pacientes com gengivite e de 18,42% de saliva e biofilme supragengival, e 26,32% de biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica.

Por PCR, o DNA bacteriano foi detetado em 8,33% de saliva, biofilme supragengival e subgengival de pacientes com gengivite e de 23,68% de saliva, 28,95% do biofilme supragengival e 34,21% de biofilme subgengival de pacientes com periodontite. Os resultados sugeriram que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pode estar relacionado com a perda de inserção na população (VIEIRA *et al.*, 2009).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é frequentemente isolado de sítios periodontais e periimplantares, entretanto os fatores que modulam a colonização da mucosa bucal e o papel deste microrganismo na doença são controversos. O objetivo deste estudo foi comparar a presença da bactéria em amostras de fluido

gengival periimplantar e saliva de 14 pacientes parcialmente edêntulos e 8 totalmente edêntulos. A bactéria também foi pesquisada na saliva. Os resultados obtidos sugerem que a colonização do sulco periimplantar e cavidade bucal e o número de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nesses sítios não são modulados pela presença ou não de dentes naturais (MANSUR, 2008).

Este estudo teve por objetivo avaliar a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva e nos biofilmes supra e subgengival de crianças e adolescentes com Síndrome de Down e analisar a influência da dieta, fatores socioeconômicos e culturais e de condição periodontal. Após avaliação das condições sócio-econômicas coletaram-se os espécimes clínicos, os quais foram transportados para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOA-UNESP para detecção do microrganismo por método molecular. A saliva foi coletada com pipetas Pasteur plásticas, esterilizadas. A análise dos dados desse estudo permitiu verificar que a ocorrência variou de 0,0% a 25,0%, tanto no grupo de pacientes portadores de síndrome, quanto para os indivíduos do grupo controle (MESSIAS *et al.* 2013).

2.2 ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS BUCAIS EM PACIENTES EM TRATAMENTO ORTODÔNTICO

Paolantonio *et al.* (1996) pesquisaram a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na placa subgengival de 20 indivíduos jovens de 12 a 20 anos submetidos ao tratamento ortodôntico com aparelhos fixos por pelo menos 6 meses. Foi identificada diferença significativa para o índice de sangramento gengival (ISG) entre o grupo teste (57,5%) e grupo controle (25%). A bactéria foi detetada em pelo menos um sítio em 85% dos indivíduos teste e 15% dos indivíduos controle ($p < 0,001$). 41% abrigou a bactéria em concentração entre 0,1% e 1,0%, enquanto outros 40% resultaram concentração a 1,0%. Houve uma correlação positiva entre a porcentagem dos sítios positivos para o patógeno e a porcentagem daqueles que exibiram um ISG + ($p < 0,005$). A duração da terapia ortodôntica não foi relacionada com os parâmetros clínicos ou microbiológicos.

Em 1997, Paolantonio *et al.*, objetivaram relatar sobre a colonização subgengival de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e modificações periodontais em pacientes ortodônticos através de um estudo prospectivo longitudinal de 3 anos.

A porcentagem de indivíduos ortodônticos infectados com a bactéria no início e após 3 anos foram 86% e 80%, respectivamente, enquanto os valores correspondentes para indivíduos controle foram 16,6% e 26,6%. A distribuição de frequência do patógena microbiota subgengival entre os indivíduos controle permaneceu relativamente estável, enquanto que a proporção de indivíduos ortodônticos com sua presença em concentração maior ou igual a 1,0% caiu significativamente de 32% no início do estudo para 19% em 3 anos.

Os indivíduos ortodônticos positivos para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tinham risco relativo de piores condições periodontais em comparação com pacientes ortodônticos, nos quais o patógeno não foi detectado no início. Em contraste, indivíduos controle infectados inicialmente com a bactéria apresentaram risco de aumento do índice de sangramento gengival 6,6 vezes maior do que para indivíduos sem a bactéria. Os autores concluíram que indivíduos jovens com um periodonto íntegro usando aparelho ortodôntico fixo abrigam *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* com uma frequência significativamente maior do que aqueles que não usam aparelho.

Paolantonio *et al* (1999) avaliaram a relação direta entre o uso de aparelho ortodôntico e a colonização subgengival por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O estudo foi composto por vinte e quatro indivíduos, Os resultados mostraram que, durante o período com os aparelhos ortodônticos, a presença dos escores de placa e sangramento gengival à sondagem foram aumentados significativamente e que a bactéria, inicialmente ausente em todos, foi isolada em 19 e 20 indivíduos, após 4 e 8 semanas, respectivamente. Esta mudança microbiana é especificamente restrita à placa bacteriana subgengival de dentes com aparelhos ortodônticos. A presença de bandas e braquetes ortodônticos, não afetou o estado microbiológico de toda a boca (PAOLANTONIO *et al.*, 1999).

Sallum *et al.* (2004) avaliaram as alterações clínicas e microbiológicas que acompanham o processo inflamatório dos tecidos periodontais em torno dos aparelhos ortodônticos e o impacto destas mudanças após a remoção dos aparelhos em dez indivíduos com idade entre 16-18 anos. Houve uma redução de aproximadamente 50% dos níveis de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* encontrada após a remoção do aparelho ortodôntico, profilaxia e instrução de higiene bucal. Concluíram que a inflamação gengival foi associada com a presença

de periodontopatógenos, tanto supragengivalmente quanto subgengivalmente; a remoção dos aparelhos ortodônticos, juntamente com uma profilaxia profissional e instrução adequada de higienização oral, resultou em reduções significativas da bactéria.

Em estudo realizado em 2004, Speer *et al.*, avaliaram se a terapia ortodôntica na dentição adulta periodontalmente comprometida pode causar uma mudança na microbiota periodontopatogênica. Durante a terapia com aparelhos fixos, redução acentuada foi observada na contagem total de bactérias das bolsas subgengivais apesar de os parâmetros clínicos periodontais terem se mantidos praticamente inalterados. Contudo, a contagem total de algumas bactérias altamente patogênicas aumentou novamente após o fim do tratamento. Em nenhum dos pacientes deterioração do estado periodontal foi observada durante e após o tratamento ortodôntico (SPEER *et al.*, 2004).

Vários fatores são capazes de afetar a colonização microbiana, incluindo restaurações e braquetes ortodônticos. Assim, o controle inadequado da placa e a não detecção da inflamação gengival promovem a destruição periodontal que pode ser agravada pelo tratamento ortodôntico. Os autores compararam as mudanças na microbiota subgengival e os parâmetros periodontal antes e depois da colocação de braquetes ortodônticos. Em 30 indivíduos avaliados antes e três meses após a colocação dos braquetes e comparados com 30 indivíduos controle. PS e NIC mantiveram-se constantes em ambos os grupos, enquanto o SS, IP, e IG aumentaram nos pacientes ortodônticos três meses após a colocação do braquete ($p < 0,05$) (NARANJO *et al.* 2006).

O objetivo de Ristic *et al.* (2007) foi investigar a influência de aparelhos ortodônticos fixos sobre as mudanças quantitativas e qualitativas da microbiota subgengival e dos tecidos periodontais. Participaram 32 pacientes, com idade entre 12 e 18 anos, que receberam instruções de higiene oral. Três semanas antes de iniciar o tratamento. Os indivíduos foram avaliados clinicamente antes da fixação (T0) e 1 (T1), 3 (T2) e 6 (T3) meses após o início da terapia ortodôntica. A investigação microbiológica foi realizada para avaliar a presença ou ausência de anaeróbios periodontopatogênicos: *Pi*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e o grupo de outros anaeróbios pigmentados de negro (BAPN), como *Porphyromonas gingivalis* e *Fn*.

Os resultados positivos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram observadas nos incisivos em T1 e T2. Os autores concluíram que, em adolescentes, o tratamento com aparelhos fixos aumenta os valores dos índices periodontais e também o crescimento de bactérias patogênicas e anaeróbias. Estas alterações clínicas e microbiológicas específicas são estritamente limitadas aos dentes com braquetes e elas não têm um efeito destrutivo sobre os tecidos periodontais devido à sua transição e limitação durante o tempo (RISTIC *et al.*, 2007).

O aparelho ortodôntico cria superfícies de retenção adicionais e espaços para a adesão de microrganismos e de crescimento do biofilme. Estes pacientes tendem a apresentar sinais da gengivite e da ampliação gengival com bolsas falsas. Chernochová *et al.* (2008) avaliaram a ocorrência de patógenos periodontais em 32 pacientes com quadro clínico de gengivite associada à placa bacteriana tratados com aparelhos ortodônticos fixos. A ocorrência simultânea de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* foi registrada em 9,37% dos pacientes. Os autores concluíram que os patógenos periodontais representam um risco significativo para a doença periodontal e para a saúde geral do paciente (ČERNOCHOVÁ *et al.*, 2008).

O objetivo de Choi *et al.* (2009) foi avaliar as mudanças que ocorrem na microbiota subgengival após a remoção dos aparelhos ortodônticos através da PCR. A frequência para as espécies de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pi*, *Pn* e *Treponema denticola* foi ligeiramente reduzida entre T1 e T2 e não foram observadas diferenças significativas. Os autores concluíram que os periodontopatógenos presentes durante o tratamento ortodôntico foram significativamente reduzidos dentro de três meses da remoção do aparelho; a avaliação de médio prazo (três meses após a retirada do aparelho) mostrou que a frequência dos sítios positivos tendeu a voltar aos níveis encontrados em indivíduos com saúde gengival.

Fernandes *et al.* (2010) avaliaram a prevalência dos patógenos periodontais - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Pi* – em diferentes grupos populacionais, na condição de ausência ou presença de elemento dentário. O grupo de recém-nascidos apresentou somente a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (2,56%); as crianças apresentaram *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (10,00%) e *Pi* (92,50%); os adultos/idosos

dentados apresentaram a bactéria *Porphyromonas gingivalis* (46,67%) e os desdentados numa frequência de 3,33%. Concluíram que a microbiota periodontal se faz presente independentemente de alguns fatores de risco para a doença periodontal como a idade do indivíduo, a presença e o número de dentes.

(PEJDA *et al.*, 2013) avaliaram as alterações na microbiota subgengival antes e durante o nivelamento e fase alinhamento ortodôntico usando o método de PCR. Patógenos periodontais de microflora subgengival foram detectados em T3 usando uma PCR que continha sondas para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Houve uma significativa maior prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em pacientes com braquetes convencionais do que em pacientes com braquetes autoligáveis, mas não houve diferença estatisticamente significativa para outros patógenos periodontais.

YANEZ-VICO *et al.* (2015) avaliaram e compararam os parâmetros microbiológicos e clínicos de pacientes que usavam aparelho ortodôntico fixo 10 dias após ele ter sido removido após o tratamento. Parâmetros clínicos apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre T1 -T2, T1 e T2 -CT -CT. Em T2, foi encontrada uma correlação positiva entre a SS e *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,01$) e entre parâmetros clínicos e PI. Concluíram que fatores locais associados com o uso de aparelho fixo influenciam mudanças na placa subgengival e que leva a mais inflamação e sangramento.

2.3 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE

A técnica da PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

A biologia molecular está sendo cada vez mais usada e a PCR é o método mais empregado como ferramenta diagnóstica. Porém, com a evolução para a PCR em tempo real, este vem sendo substituído (Vernet, 2004).

A PCR possibilita a síntese de DNA, usando a enzima DNA-polimerase. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (*primer*, em inglês) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. Os iniciadores definem a sequência a ser

replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA com bilhões de cópias (MULLIS, 1990).

A PCR consiste na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através da extensão de uma região do ácido nucléico com a utilização de “primers” ou iniciadores (SOUZA, 2007).

A amplificação de uma amostra pela técnica de PCR requer um par de iniciadores, os quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), íons de magnésio (MgCl₂), que devem estar em maior concentração que os dNTPs e uma DNA polimerase termoestável para sintetizar o DNA. As concentrações de iniciador, dNTP e magnésio são variáveis de acordo com a reação (SOUZA, 2007).

O princípio da técnica é baseado na replicação natural de DNA. O processo pode ser dividido em três etapas: (desnaturação - quebra das pontes de hidrogênio que ligam as fitas do DNA, hibridização - anelamento dos *primers* na região complementar da fita de DNA e extensão - promovida pela enzima termo estável, DNA polimerase) que se repetem um número específico de vezes (SOUZA, 2007):

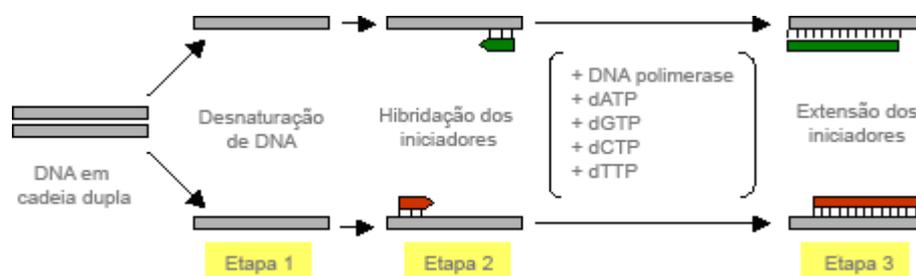


Figura 1: Etapas da PCR.

FONTE: <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?hid=339>

2.4 PCR EM TEMPO REAL

Uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em Tempo Real, vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de

forma mais precisa e rápida, em relação à PCR que apresenta somente resultados semi-qualitativos (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Nos últimos anos foram desenvolvidos ensaios PCR em Tempo Real a fim de aperfeiçoar o diagnóstico. A técnica de PCR em Tempo Real quantitativo é uma metodologia confiável, capaz de quantificar a concentração do produto de PCR gerado durante cada ciclo da reação. Para tanto, é necessário ter um método de detecção do acúmulo do produto de PCR e um termociclador que seja adaptado para gravar os resultados a cada novo ciclo da reação (SOUZA, 2007).

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold (CT)*. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em Tempo Real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

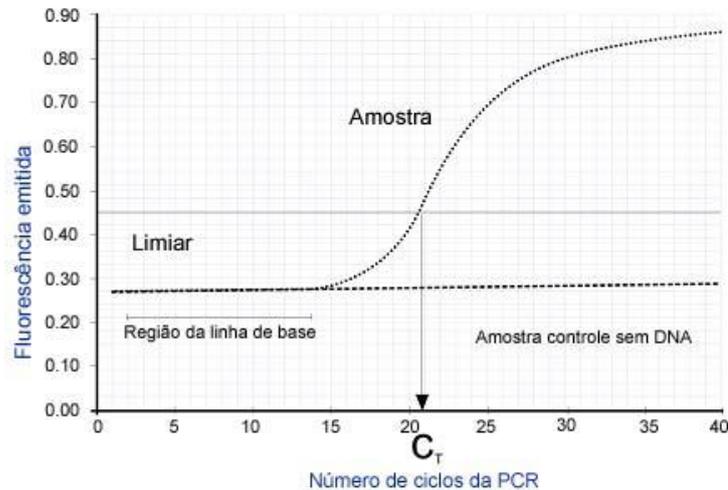


Figura 2: Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. C_T – Cycle Threshold. A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos.

Fonte: NOVAIS, C.M. PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento – Ed 33, p. 10-13. 2004.

2.4.1. Sistema SYBR® Green

O SYBR® Green se liga entre a fita dupla de DNA (Figura 7) e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. O SYBR® Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA. (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

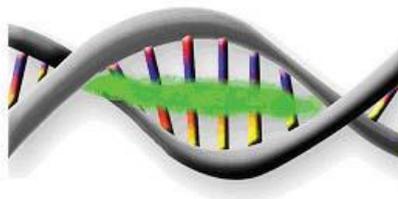


Figura 3: Molécula de SYBR Green® entre a fita dupla de DNA.

Fonte: NOVAIS, C.M. PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento – Ed 33, p. 10-13. 2004.

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. As moléculas não-ligadas do SYBR® Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise de computador. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR® Green podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. (VITZTHUM *et al.*, 1999).

No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (VITZTHUM *et al.*, 1999).

O resultado da PCR em Tempo Real é gerado em um gráfico, onde é representado o acúmulo de fluorescência pelo tempo ou número de ciclos da reação. Este é CT onde a fluorescência detectada de uma determinada amostra intercepta a linha de threshold acima do background de fluorescência (MACKAY *et al.*, 2002), ou seja, inicia a fase exponencial, permitindo uma quantificação exata e reprodutível do número inicial de ácidos nucleicos presentes na amostra (do material amplificado) (LEE *et al.*, 1993; LIVAK *et al.* 1995).

Os dados brutos gerados em uma reação de PCR em tempo Real devem ser exportados em formatos compatíveis, para análises em programas-padrão como, por exemplo, o Excel, o que oferece, assim, uma gama maior de possibilidades na análise dos resultados. A padronização das análises garante um resultado mais preciso e real, confirmando a credibilidade desta tecnologia, e consolidando-a no cenário de técnicas de diagnóstico molecular (DIAS, 2011).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a condição periodontal e a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva total em indivíduos antes e após a instalação do aparelho ortodôntico fixo metálico.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL

Foram selecionados 15 pacientes da Clínica do Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFJF e de consultórios particulares, 7 homens e 8 mulheres, com idade média de 18 anos e 3 meses (14-18 anos). Todos os indivíduos apresentavam dentição permanente completa, com exceção dos terceiros molares, não fumantes, sem histórico de doença periodontal, sem doença sistêmica, que não tivessem utilizando medicação sistêmica nos últimos seis meses, que não estivessem grávidas, sem histórico de doença periodontal e que necessitassem de tratamento com aparelho fixo.

Para inclusão na amostra os pacientes foram selecionados através de exame clínico da condição periodontal, onde deveriam apresentar índice de placa com grau 1 (sem presença de placa na área gengival da superfície dental quando se passa uma sonda), sangramento gengival negativo em até 15 segundos e profundidade de sondagem ≤ 3 mm.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o Parecer número 0217.0.180.000-09. Todos os indivíduos foram orientados dos procedimentos, aceitaram participar da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Calibração

Previamente aos exames clínicos de seleção e avaliação dos pacientes da amostra, a examinadora foi submetida ao processo de calibração, que consistiu da avaliação clínica de 10 voluntários (com as mesmas características dos indivíduos da amostra), treinamento teórico e prático, coleta de dados e cálculo da concordância.

O treinamento teórico consistiu da exposição teórica e discussão junto com equipe de exame (Periodontista, examinadora da pesquisa e anotadores), dos

índices, códigos e critérios (OMS, 1997) a serem utilizados, com duração de quatro horas.

O treinamento prático consistiu de calibração inter e intra-examinadores. Para calibração inter-examinador, a examinadora e o Periodontista realizaram exames clínicos nos 10 voluntários e determinaram o índice de placa, o sangramento gengival e a profundidade de sondagem. Estes exames foram repetidos 15 dias após nos mesmos pacientes para determinar a concordância intra-examinador.

4.2.2 Exame clínico

Os exames clínicos realizados nas fases de calibração, seleção e avaliação dos pacientes consistiram de determinação do índice de placa bacteriana, índice de sangramento gengival e profundidade de sondagem.

Os exames foram realizados com os pacientes sentados e sob a luz artificial do refletor da cadeira odontológica. Em cada paciente foram avaliados seis dentes-índices: primeiro molar superior direito; primeiro molar superior esquerdo, primeiro molar inferior direito, primeiro molar inferior esquerdo, incisivo central superior direito e incisivo central inferior esquerdo.

O índice de placa bacteriana foi determinado por inspeção visual com auxílio de espelho clínico (nº 5, Golgram, São Caetano do Sul, Brasil) e sonda clínica (sonda exploradora, Golgram, São Caetano do Sul, Brasil), onde foi avaliada a quantidade de placa bacteriana nas faces vestibular e lingual dos dentes-índices, classificando os mesmos com os seguintes critérios:

Grau 1: não há placa na área gengival da superfície dental quando se passa uma sonda;

Grau 2: há um filme de placa aderido à margem gengival livre e à área adjacente ao dente. A placa somente pode ser reconhecida passando-se uma sonda sobre a superfície do dente, não sendo visível a olho nu;

Grau 3: há um moderado acúmulo de depósitos moles dentro do sulco gengival e/ou superfície dental adjacente, visível a olho nu;

Grau 4: há abundante acúmulo de depósitos moles dentro do sulco gengival, na margem gengival e/ou na superfície dental.

O índice de sangramento gengival foi determinado pela inserção suave de uma sonda periodontal (OMS, Golgram, São Caetano do Sul, Brasil) no sulco gengival das superfícies vestibular e lingual dos dentes-índices. Se houvesse sangramento em até 15 segundos o índice era marcado como positivo, caso contrário era marcado como negativo.

A profundidade de sondagem foi determinada pela inserção suave de uma sonda periodontal (OMS, Golgram, São Caetano do Sul, Brasil) no sulco gengival nas regiões mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual dos dentes-índices. Foram determinadas a profundidade de sondagem média de cada região e a profundidade média de cada indivíduo, como descrito por Medeiros (2010).

O exame clínico dos pacientes da amostra foi realizado um mês antes (T1) e 1 mês após (T4) a instalação de aparelho fixo Edgewise Standard (10.30.900 – Morelli, Sorocaba, Brasil) nos dentes superiores, com exceção dos segundos e terceiros molares. Para colagem do aparelho foi feito ataque ácido nos dentes com condicionador ácido fosfórico à 37% (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, Brasil). Após lavar e secar os dentes, os braquetes foram colados com Adesivo Ortodôntico Orthocem (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, Brasil) e cada um fotopolimerizados ao final (40 segundos). Após a colagem foi inserido arco de NiTi 0,012” (Morelli, Sorocaba, Brasil).

Os pacientes receberam um kit contendo uma escova e pasta dental (Professional - Colgate/Palmolive Industria e Comércio, São Paulo, Brasil) e foram instruídos a utilizarem a técnica de escovação de Bass.

4.2.3 Coleta das amostras de saliva

Foram coletadas amostras de saliva total de todos os indivíduos um mês antes (T1), imediatamente antes (T2), 15 dias após (T3) e 1 mês após (T4) a instalação do aparelho ortodôntico fixo.

A coleta de saliva foi realizada com o dispositivo Salivette Cortisol (*Sarstedt*® Nümbrecht, Alemanha), com *swab* neutro de poliéster e microtubo. Os indivíduos removeram o *swab* do Salivette e o mantiveram debaixo da língua por 120 segundos, recolocando-o de volta no recipiente e fechando o Salivette.

Para coleta com microtubo, os pacientes foram instruídos a se posicionarem em uma cadeira com a cabeça inclinada para frente e deixarem a saliva acumular na boca. Com uma pipeta Pasteur descartável estéril (3ml, Prolab, São Paulo, Brasil) a saliva foi coletada e transferida da boca para um microtubo de 5mL. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã.

De acordo com projeto piloto realizado (Apêndice 1), não houve diferença entre a identificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* através de PCR com o uso de microtubos e salivete.

Após a coleta, os recipientes contendo as amostras foram mantidos em caixas térmicas com gelo por até 3 h e estocado em freezer a -80°C até o momento da análise, que ocorreu 64 dias após a última coleta.

4.2.4 Análise das amostras de saliva - PCR

A partir das amostras de saliva coletadas, foi realizado na Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG a extração do DNA para identificação da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por meio do método Reação em Cadeia Polimerase em tempo real, utilizando um par de *primers* específicos (SAKAI *et al.*, 2007; PRESTES, 2007).

Protocolo para o PCR em tempo real:

O equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA) foi utilizado para análise.

Como controle positivo, DNA da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: cepas JP2 e Y4 doadas pela professora Marcia Mayer do Instituto de Ciências Biológicas – USP. O controle positivo garante a padronização da PCR, pois contém DNA conhecido, cujo resultado idêntico ao final do exame garante a precisão daquele processamento específico.

Cada reação continha 10 µL DNA, 100nM de cada *primer* para a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e 12,5L 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um volume final de 25 µL. Cada amostra foi feita em duplicata em placas óticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo ótico e amplificadas no 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems,

Foster City, EUA), sendo cada amostra amplificada separadamente. As condições de amplificação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C. Ao final de cada reação foi feita a curva de dissociação (*melting point*) para assegurar que cada reação produziu um único fragmento.

Foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparar os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem entre os tempos T1 e T4.

5 RESULTADOS

Valores de concordância intra e inter-examinador obtidos (Kappa 0,80 e Kappa 0,81) na primeira etapa. Kappa 0,80 e 0,85 (placa visível) e Kappa 0,80 e 0,88 para profundidade de sondagem.

A Tabela 1 mostra média e desvio padrão da profundidade de sondagem nas regiões avaliadas nos tempos T1 e T4. Não houve diferença significativa entre os tempos para os valores de profundidade de sondagem nas regiões avaliadas.

Tabela 1: média e desvio-padrão da profundidade de sondagem nas regiões avaliadas um mês antes T1 e um mês após (T4) a instalação do aparelho fixo.

Regiões	Tempo 1		Tempo 4		p-valor*
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
Vestibular	1,173	0,2086	1,173	0,2086	1,000
Mesio-vestibular	1,167	0,1877	1,160	0,1805	0,317
Disto-vestibular	1,180	0,2178	1,173	0,2187	0,317
Lingual	1,160	0,2230	1,160	0,2230	1,000
Mesio-lingual	1,167	0,2193	1,166	0,2193	1,000
Disto-lingual	1,166	0,2193	1,166	0,2193	1,000
Média	1,169	0,2095	1,167	0,2082	0,180

*p-valor segundo teste de Wilcoxon

Todos os indivíduos, nos tempos T1 e T4, apresentaram sangramento à sondagem negativo para todos os dentes e se enquadrava no grau 1 de índice de placa, não havendo diferença entre os tempos.

Após as análises laboratoriais, somente o controle positivo amplificou, ou seja, a reação estava funcionando: na presença do DNA alvo haveria amplificação das amostras.

Na análise foi estabelecido que o baseline (ciclos iniciais da PCR nos quais há uma pequena alteração no sinal de fluorescência) iria de 3 a 15. Pelas figuras 6, 7, 8 e 8 nota-se que a emissão está abaixo do nível de detecção do equipamento.

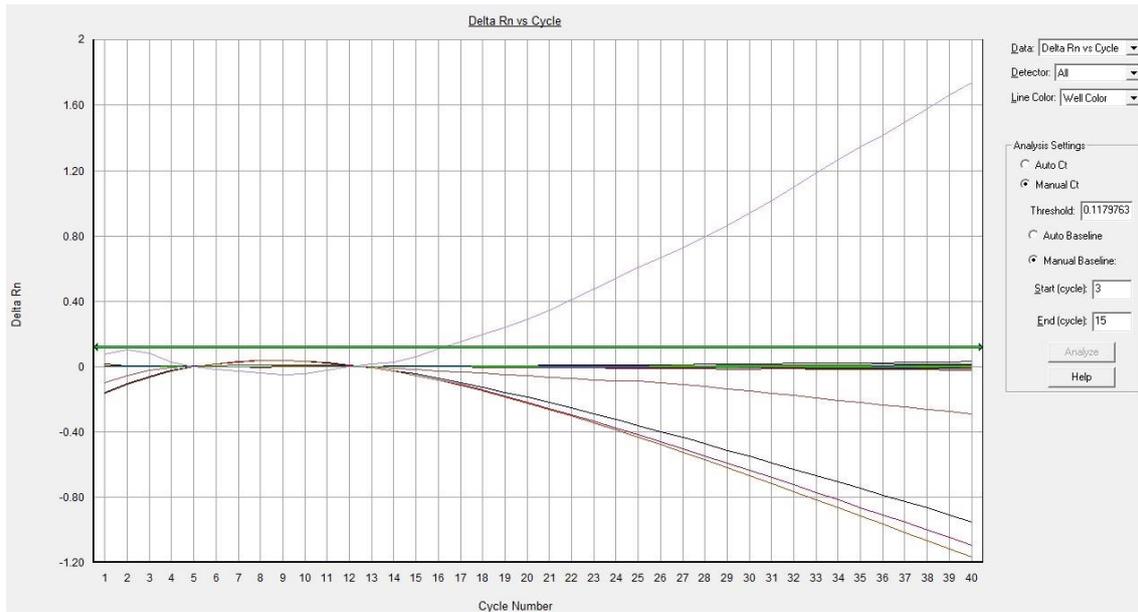


Figura 6: Escala linear da amplificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em T1. É considerada amostra positiva aquela que cruza a linha verde que está na vertical.

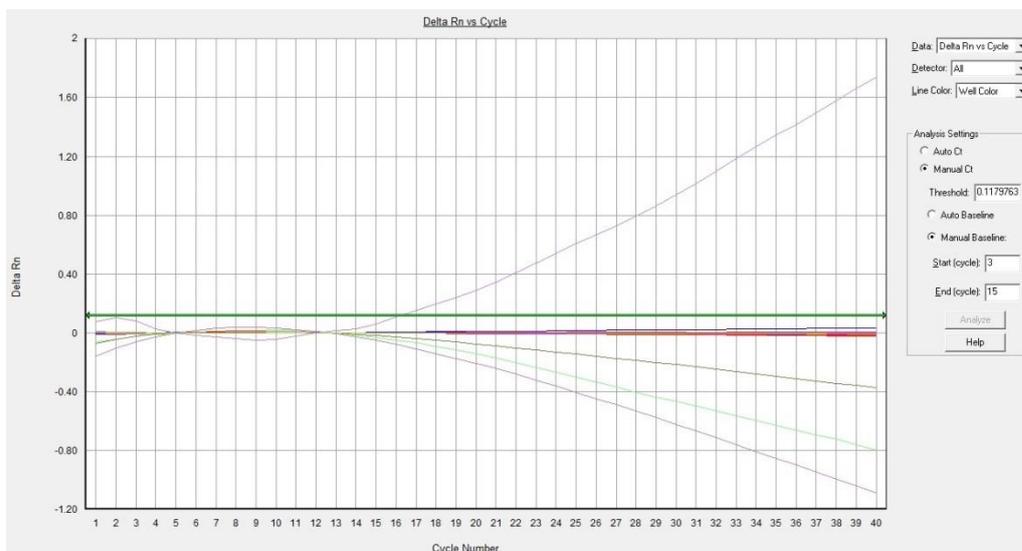


Figura 7: Escala linear da amplificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em T2. É considerada amostra positiva aquela que cruza a linha verde que está na vertical.

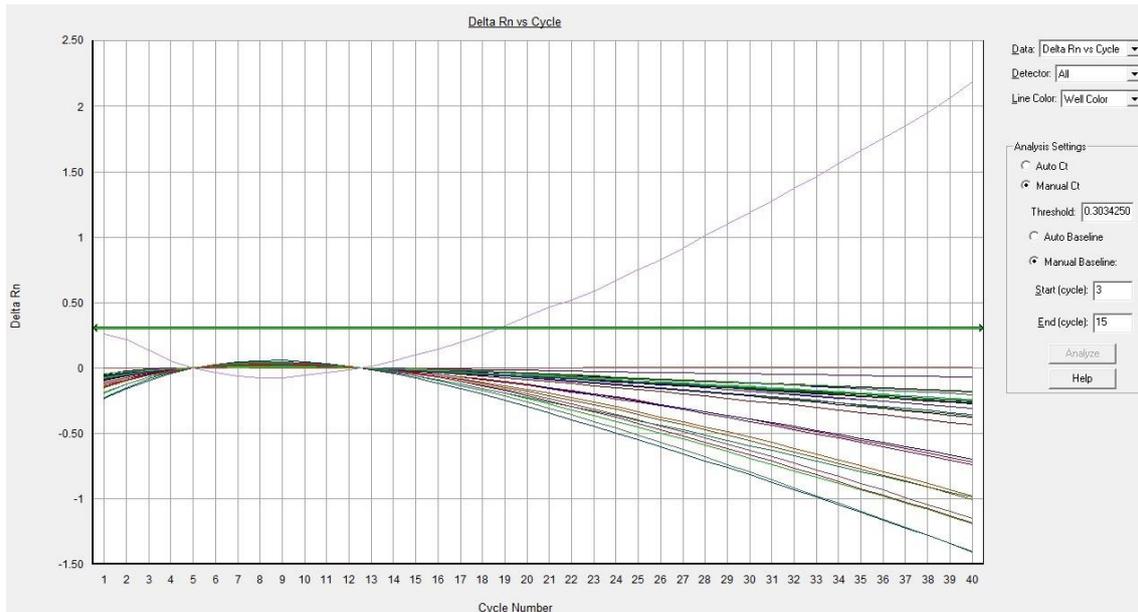


Figura 8: Escala linear da amplificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em T3. É considerada amostra positiva aquela que cruza a linha verde que está na vertical.

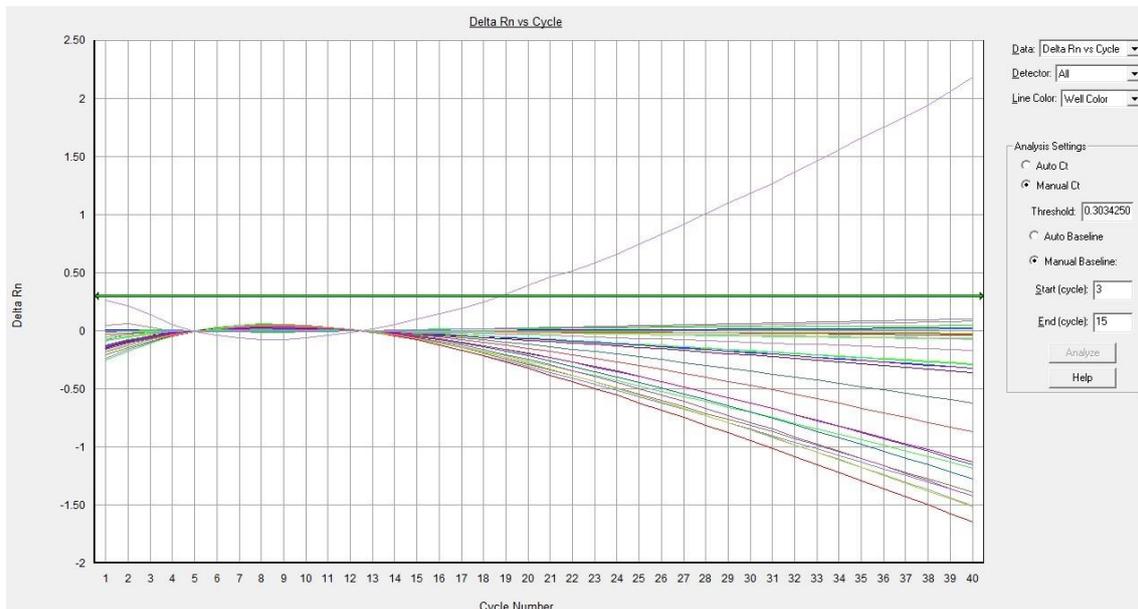


Figura 9: Escala linear da amplificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em T4. É considerada amostra positiva aquela que cruza a linha verde que está na vertical.

Nas duas placas de reação, onde as amostras foram colocadas, somente o controle positivo ultrapassou este limiar, ou seja, não foi possível identificar bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nas amostras testadas, no período descrito.

6 DISCUSSÃO

As alterações subgengivais que o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* provoca no fluido gengival em pacientes em tratamento ortodôntico com aparelhos fixos tem sido bastante estudada na literatura (PAOLANTONIO *et al.* 1996, 1997, 1999; SALLUM *et al.*, 2004; SPEER *et al.*, 2004; NARANJO *et al.*, 2005; CHERNOCHOVÁ *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2009; DEMLING *et al.*, 2009); entretanto, não há estudos sobre a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva desses pacientes.

A presença dessa bactéria é mais frequente em indivíduos que apresentam bolsas periodontais profundas e inflamação gengival (CORTELLI *et al.* 2004; Van HOOGMOED *et al.*, 2008). Por isso, no presente estudo, não foram selecionados indivíduos com sangramento gengival positivo e índices de placa graus 2, 3 e 4.

No presente estudo, não foi observada presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva total coletada antes e após a instalação do aparelho ortodôntico fixo. Este resultado está de acordo com o relato de Messias *et al.* (2013), que verificou a ocorrência da bactéria entre 0,0% e 25% na saliva de pacientes com Síndrome de Down e de indivíduos do grupo controle pelo método de PCR. Vieira *et al.* (2009) detectaram *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 8,33% de amostras de saliva de indígenas através do método de PCR.

O fato de não ter sido detectado *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva dos pacientes após a instalação do aparelho ortodôntico pode estar relacionado à manutenção dos parâmetros clínicos de avaliação periodontal (índice de placa visível, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem) entre os tempos T1 e T4.

Alguns estudos não identificaram deterioração do estado periodontal (SPEER *et al.*, 2004) ou alteração significativa da profundidade de sondagem (NARANJO *et al.* 2006) em pacientes ortodônticos durante e após o tratamento. Tais resultados confirmam os achados do o presente estudo, que não encontrou alteração significativa dos índices utilizados para a avaliação da condição periodontal após a instalação do aparelho ortodontico fixo.

Em contrapartida, alguns autores descreveram alterações significativas na condição periodontal de pacientes durante o tratamento ortodôntico. Naranjo *et al.* (2006) relataram um aumento significativo dos índices de placa e sangramento à sondagem em pacientes após o uso de aparelho fixo. Ristic *et al.* (2007) afirmaram que o tratamento com aparelhos fixos aumenta os valores dos índices periodontais e também o crescimento de bactérias patogênicas e anaeróbias. Yanez-vico *et al.* (2015) afirmaram que fatores locais associados com o uso de aparelho fixo influenciam mudanças na placa subgengival e que leva a mais inflamação e sangramento.

7. CONCLUSÃO

Não foi possível identificar ocorrência da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva em nenhum dos tempos avaliados.

Não houve alteração significativa das condições periodontais (índice de placa, profundidade de sondagem e sangramento periodontal) entre os períodos de um mês antes e um mês após a instalação do aparelho fixo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.F. et al. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, Porto, v.22, n.3, p.379-390. 2006.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Consensus report on periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. **Annals of Periodontology**. v.67, n.1, p.926–932, 1996.

BASCONES, A. CABALLEROS, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* como principales patógenos periodontales. **Revista de Periodoncia**, Madrid, v.12, n.2, p.69-75. 2000.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Houndmills ,v. 25, n.2, p.169-93. 2000.

CORTELLI, J.B.; CORTELLI, S.C.; JORGE, A.O.C. Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na doença periodontal. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v.7, n.1, p.55-61. 2001.

DIAS, R.F. **Ensaio Molecular para Vigilância Epidemiológica de Gripe com ênfase no diagnóstico de Influenza A H1N1**. Rio de Janeiro. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz.

DZINK, J.; SOCRANSKY, S.; HAFFAJEE, A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v.15, n.5, p.316–323. 1988.

FIVES-TAYLOR, P. M.; MEYER, D. H.; MINTZ, K. P.; BRISSETTE, C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycescomitans*. **Periodontology 2000**, Malden , v. 20, n.1, p. 136- 167, 1999.

GASPARETTO, A.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Aderência de *Aggregatibacter actinomycescomitans* às células epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v.14, n.4, p.311-331. 2000.

INOUE, T. et al. Biofilm formation by a fimbriae-deficient mutant of *Actinobacillus actinomycescomitans*. **Microbiology and Immunology**, Malden, v. 47, n.11, p. 877-881, 2003.

ITO, A. K. et al. Investigation of subgingival profile of periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, Tokyo, v.51, n.3, p.139–144. 2010.

KESIĆ,L., et al. The importance of *Aggregatibacter actinomycescomitans* in etiology of periodontal disease - mini review. **Acta Medica Medianae**, Servia, v.48, n.3, p. 35-37. 2009.

KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, Malden, v.25, n.1, p 8–20, 2001.

KINANE, D. F.; LINDHE, J.; M. Periodontite Cronica. In: LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 8, p.205-211.

LEE, L.G, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.11, n.16, p.:3761-6. 1993.

LIÉBANA, J.; CASTILLO, A. M.; ÁLVAREZ, M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, Madrid, v.9, n.9, p.75-91. 2004.

LIVAK KJ, FLOOD SJ, MARMARO J, GIUSTI W, DEETZ K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods and Applications**, Seattle, v.4, n. 6, p.357-62. 1995.

LOTUFO, R. F. M.; PANNUTI, C. M.; SARAIVA, M. C. Bacteroides forsythus: sensibilidade a antimicrobianos em amostras de pacientes portadores de periodontite. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v.15, n.1, p.47-50. 2001.

MACHION, E. et al. A influência do sexo e da idade na prevalência de bolsa periodontais. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.1, p.33-37. 2000.

MACKAY IM, ARDEN KE, NITSCHKE A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n.6, p. 1292-305. 2002.

MANSUR , M.E.C. **Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em sulco periimplantar e saliva de pacientes portadores de prótese sobre implantes saudáveis com e sem a presença de dentes naturais**. Ponta Grossa. 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia – area de concentração: clínica integrada) – Faculdade de Odontologia/ Universidade Estadual de Ponta Grossa.

MARIOTTI, A. Dental plaque-induced gingival diseases. Review. **Annals of Periodontology**. v.4, n.1, p.7-19. 1999.

MARTÍNEZ, A. B.; RUIZ E. F., Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, Madrid, v.9, n.3, p.92-107. 2004.

MESSIAS, L. P. A. et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans em Pacientes com Síndrome de Down: Influência da Condição Periodontal e Higiene Bucal. **Archives of Health Investigation**, Araçatuba, v. 2, n. 5, p. 16-25. 2013.

MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. **Infeccion and Immunity**, Washington, v. 62, n.3, p. 928-935, 1994.

MUHLE, I.; RAU, J.; RUSKIN, J. Vertebral osteomyelitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 241, n.17, p. 1824-1825, 1979.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de biologie Clinique**, Paris, v. 48, n. 8, p.579-82, 1990.

NAGY, R. J.; NOVAK, M. J. Periodontite Crônica. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H. H.; CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.26, p.354-362.

NARANJO, A. A. et al. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, Saint Louis, v.130, n.3, p.275.e17-275.e22. 2006.

NOVAIS, C.M. PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Goiás, v. 33, n.1, p. 10-13. 2004.

NOVAK, M. J. Classificação das Doenças e Condições que Afetam o Periodonto. In: NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.4, p.58-65.

PAGE, M. I.; KING, E. O. Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. **The New England Journal of Medicine**, Chicago, v. 275, n.4, p. 181-188, 1966.

PAOLANTONIO, M. et al. Clinical significance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young individuals during orthodontic treatment. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v.24, n.9, p.610-617. 1997.

PAOLANTONIO, M. et al. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients wearing orthodontic appliances. A cross-sectional study. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v.23, n.2, p.112-118. 1996.

PAOLANTONIO, M. et al. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and clinical conditions in children and adolescents from rural and urban areas of central Italy. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v.27, n.8, p.549–557. 2000.

PAOLANTONIO, M. et al. Site-specific subgingival colonization by actinobacillus actinomycetemcomitans in orthodontic patients. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, Saint Louis, v.115, n.4, p.423-428. 1999.

PEJDA *et al.* Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. **The Angle Orthodontist**, Richmond, v. 83, n 1. 2013.

PÉREZ, P.J.; PÉREZ, G. E. Periodonto y enfermedad cerebrovascular. **Guia Neurológica**, Bogotá, v.16, n., p.264-274. 2007.

POESCH, C. **Desenvolvimento e avaliação dos métodos moleculares para dengue**. Curitiba. 2007. 113p. Tese (Doutorado). Instituto Oswaldo Cruz.

RISTIC, M. et al. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. **Orthodontics & Craniofacial Research**, Malden, v.10, n.4, p.187–195. 2007.

SALLUM, E.J. et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, Saint Louis, v.126, n.3, p.363-366. 2004.

SILVA, C. H. P. M. Características da microbiota subgingival em pacientes com periodontite. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.38, n.3, p.207-210. 2006.

SILVA, L. A. F. e PASSOS, N. S. **Coleta de Amostras Biológicas em Locais de Crime para Estudo do DNA**, Maceió, Ed. Ufal, 2002.

SLOTS, J.; BRAGD, L.; WIKSTROM, M.; DAHLEN, G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v. 13, n.6, p. 570-577, 1986.

SOUZA, A.C.M.F. **Comparação das técnicas de PCR em tempo real e PCR para o estudo dos genes MYCN, DDX1 e NAG em pacientes portadores de neuroblastoma**. São Paulo, 2007. 92p. Dissertação – Área de concentração: Hematologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

SPAHR, A. et al. Periodontal Infections and Coronary Heart Disease. **Internal Medicine**, Chicago, v.166, n.5, p.554-559. 2006.

SPEER, C. et al. Investigations on the Influencing of the Subgingival Microflora in Chronic Periodontitis A Study in Adult Patients during Fixed Appliance Therapy. **Journal of Orofacial Orthopedics**, München, v.65, n.1, p.34-47. 2004.

SRIRAMAN, P., MOHANRAJ, R. e NEELAKANTAN, P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* In Periodontal Disease. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, India, v.5, n.2, p. 406-419. 2014.

TAN, K. S.; SONG K. P.; ONG, G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 37, n.4, p. 268-272, 2002.

TOUYZ, L. Z. G. Doenças Cardiovasculares e periodontite (parte I). **Dentistry Edição Portuguesa**, Largo da Lagoa, v.34, n.1, p.40-47. 2008.

VIEIRA, E. M. M. **Estudo das condições de saúde bucal e avaliação da microbiota periodontopatogênica de uma população indígena brasileira**. Araçatuba, 2009. 115 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

VITZTHUM, F., GEIGER, G., BISSWANGER, H., BRUNNER, H. BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 276, n.1, p.59-64, 1999.

WILSON, M.; HENDERSON, B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 17, n.4, p. 365-379, 1995.

ZAMBON, J. J.; HARASZTHY, V. I.; HARIHARAN, G.; LALLY, E. T.; DEMUTH, D. R. The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v. 67, n.3, p. 282-290, 1996.

YANEZ-VICO *et al.* Short-term effect of removal of fixed orthodontic appliances on gingival health and subgingival microbiota: A prospective cohort study. **Acta Odontologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 73, n. 7, p. 496-502. 2015.

ANEXOS

Anexo1: Aprovação do projeto

Andamento do projeto - CAAE - 0217.0.180.000-09					
Título do Projeto de Pesquisa					
Prevalência de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> no sítio subgingival de pacientes indicados ao tratamento ortodôntico, nos períodos de pré-instalação e após a ativação do aparelho.					
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP	
Aprovado no CEP	02/12/2009 14:05:28	15/03/2010 15:28:03			
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem	
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	02/12/2009 14:05:28	Folha de Rosto	0217.0.180.000-09	CEP	
4 - Protocolo Aprovado no CEP	15/03/2010 15:28:03	Folha de Rosto	324/2009	CEP	
3 - Protocolo Pendente no CEP	14/12/2009 11:42:53	Folha de Rosto	324/2009	CEP	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	01/12/2009 10:54:24	Folha de Rosto	FR308829	Pesquisador	

Andamento do projeto - CAAE - 0064.0.180.000-11					
Título do Projeto de Pesquisa					
Influência do dispositivo da coleta de saliva na contagem de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>					
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP	
Aprovado no CEP	07/04/2011 15:56:58	10/08/2011 14:40:53			
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem	
3 - Protocolo Pendente no CEP	19/05/2011 14:43:39	Folha de Rosto	094/2011	CEP	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	07/04/2011 13:52:26	Folha de Rosto	FR416864	Pesquisador	
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	07/04/2011 15:56:58	Folha de Rosto	0064.0.180.000-11	CEP	
4 - Protocolo Aprovado no CEP	10/08/2011 14:40:53	Folha de Rosto	094/2011	CEP	

Anexo 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –UFJF

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL Prof^a Dr^a Maria das Graças Afonso Miranda Chaves

Endereço: Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia, CLO.

CEP: 36100-000 – Juiz de Fora – MG

Fone: (32) 3229-3881

E-mail: duque05@gmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Influencia do dispositivo de coleta de saliva na contagem de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Neste estudo pretendemos verificar se é possível identificar a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* através da coleta de saliva pelo método do Salivette e posterior análise de seu DNA através do método PCR em tempo real (feito em laboratório).

O motivo que nos leva a este estudo é que este método citado acima, ainda não tem relatos em pesquisas anteriores. Desta forma, este estudo torna-se necessário para verificar se a identificação deste micro-organismo por estes métodos é possível.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: você permanecerá sentado de maneira confortável em cadeira comum (não odontológica), com a cabeça levemente inclinada para baixo, sem movimentar lábios e língua, sem

deglutir e deixando acumular a saliva na boca. Depois de acumulada, você irá cuspir em um frasco de plástico, e esta saliva será avaliada em laboratório.

A saliva também será coletada com dispositivo “salivete”. Você irá remover o *swab* do Salivete e o deixará debaixo da língua por 120 segundos, recolocando-o de volta no recipiente e fechando o Salivete.

Este estudo apresenta risco mínimo, isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras como conversar, tomar banho, ler, etc. Apesar disso, você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento está de acordo com a Res. 196/96 CNS e encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo “Influencia do dispositivo de coleta de saliva na contagem de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 2011.

_____	_____
Nome	Assinatura participante Data
_____	_____
Nome	Assinatura pesquisador Data
_____	_____
Nome	Assinatura testemunha Data

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o:

CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - UFJF

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA / CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF

JUIZ DE FORA (MG) - CEP: 36036-900

FONE: (32) 2102-3788 / E-MAIL: cep.propesq@ufjf.edu.br

APÊNDICE

Apêndice 1: PROJETO PILOTO

- Amostra:

Participaram do estudo, 15 pacientes da Clínica do Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFJF e de consultórios particulares, 7 homens e 8 mulheres, com idade média de 18 anos e 3 meses (14-18 anos).

Foram selecionados indivíduos com dentição permanente completa, com exceção dos terceiros molares, não fumantes, sem histórico de doença periodontal, sem doença sistêmica, que não tivessem utilizando medicação sistêmica nos últimos seis meses, que não estivessem grávidas, sem histórico de doença periodontal e que necessitassem de tratamento com aparelho fixo.

- Metodologia

Foram coletadas amostras de saliva total de todos os indivíduos um mês antes (T1) e 1 mês após (T2) a instalação de aparelho fixo Edgewise Standard (10.30.900 – Morelli, Sorocaba, Brasil) nos dentes superiores, com exceção dos segundos e terceiros molares. Para colagem do aparelho foi feito ataque ácido nos dentes com condicionador ácido fosfórico à 37% (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, Brasil). Após lavar e secar os dentes, os braquetes foram colados com Adesivo Ortodôntico Orthocem (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, Brasil) e cada um fotopolimerizados ao final (40 segundos) Após a colagem foi inserido arco de NiTi 0,012” (Morelli, Sorocaba, Brasil).

Os pacientes receberam um kit contendo uma escova e pasta dental (Professional - Colgate/Palmolive Industria e Comércio, São Paulo, Brasil) e foram instruídos a utilizarem a técnica de escovação de Bass.

A coleta de saliva foi realizada com o dispositivo Salivette Cortisol (*Sarstedt*® Nümbrecht, Alemanha), com *swab* neutro de poliéster e microtubo. Os indivíduos removeram o *swab* do Salivette e o mantiveram debaixo da língua por 120 segundos, recolocando-o de volta no recipiente e fechando o Salivette.

Para coleta com microtubo, os pacientes foram instruídos a se posicionarem em uma cadeira com a cabeça inclinada para frente e deixarem a saliva acumular na boca. Com uma pipeta Pasteur descartável estéril (3ml, Prolab, São Paulo, Brasil) a saliva foi coletada e transferida da boca para um microtubo de 5mL. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã.

Após a coleta, os recipientes contendo as amostras foram mantidos em caixas térmicas com gelo por até 3 h e estocado em freezer a -80°C até o momento da análise, que ocorreu um mês após a coleta.

A partir das amostras de saliva coletadas, foi realizado na Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG a extração do DNA para identificação da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por meio do método Reação em Cadeia Polimerase em tempo real, utilizando um par de *primers* específicos (SAKAI *et al.*, 2007; PRESTES, 2007).

Protocolo para o PCR em tempo real:

O equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA) foi utilizado para análise.

Como controle positivo, DNA da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: cepas JP2 e Y4 doadas pela professora Marcia Mayer do Instituto de Ciências Biológicas – USP. O controle positivo (DNA sabidamente com a sequência alvo) garante a padronização da PCR, pois contém DNA conhecido, cujo resultado idêntico ao final do exame garante a precisão daquele processamento específico.

Cada reação continha 10 μL DNA, 100nM de cada *primer* para a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e 12,5L 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um volume final de 25 μL . Cada amostra foi feita em duplicata em placas óticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo ótico e amplificadas no 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA), sendo cada amostra amplificada separadamente. As condições de amplificação foram 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C , seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C , 1 minuto a 60°C .

Ao final de cada reação foi feita a curva de dissociação (*melting point*) para assegurar que cada reação produziu um único fragmento.

- Resultados

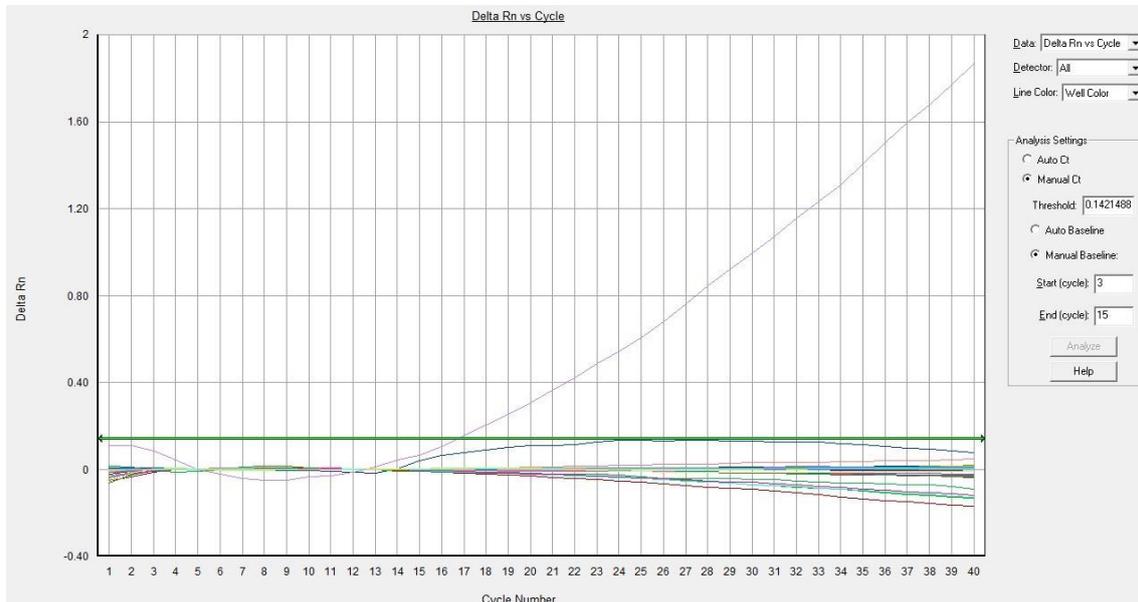


Figura 10: Resultados para microtubo.

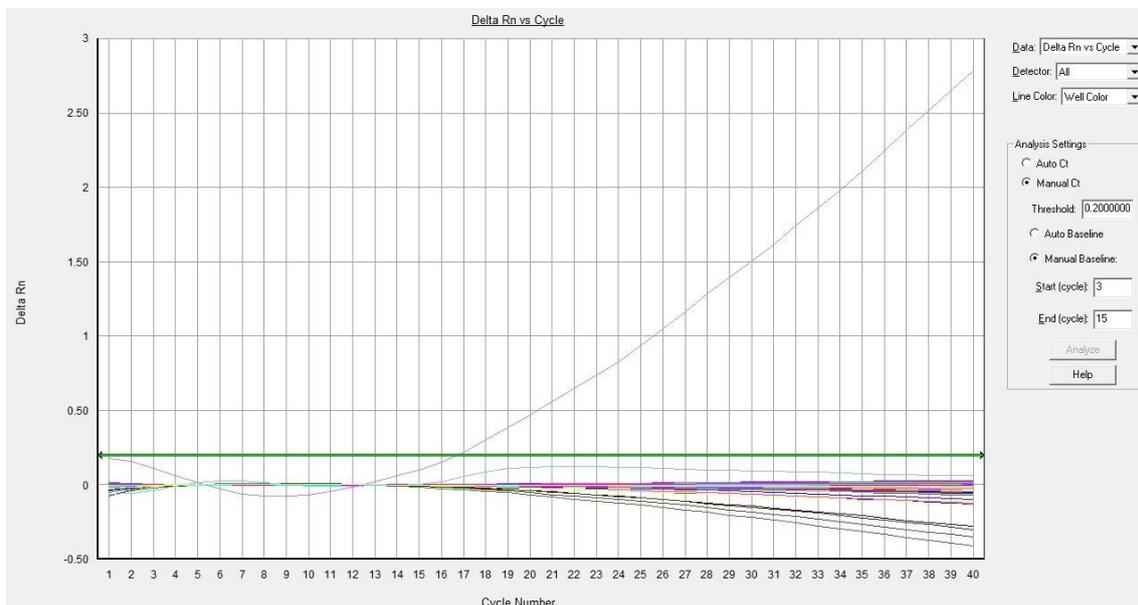


Figura 11 Resultados para salivete.

De acordo com as figuras acima, observou-se que não foi possível identificar a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em nenhum dos pacientes com nenhum dos métodos testados.