RAQUEL FERNANDA BACHIEGA MORELLI

AVALIAÇÃO MICROBIANA DE LIGADURAS ELASTOMÉRICAS ESTÉTICAS

POR MEIO DA TÉCNICA *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION*:

ESTUDO *IN VIVO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientada: Raquel Fernanda Bachiega Morelli

Orientadora: Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Morelli, Raquel Fernanda Bachiega

Avaliação Microbiana de Ligaduras Elastoméricas Estéticas Por Meio da Técnica *Checkerboard DNA-DNA HYBRIDIZATION*: Estudo *In Vivo*
98p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa de Pós-graduação em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Matsumoto, Mírian Aiko Nakane

1. Aparelho Ortodôntico. 2. Bactérias. 3. Biologia Molecular. 4. Sondas DNA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Morelli, RFB. **AVALIAÇÃO MICROBIANA DE LIGADURAS ELASTOMÉRICAS ESTÉTICAS POR MEIO DA TÉCNICA *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION*: ESTUDO *IN VIVO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

RAQUEL FERNANDA BACHIEGA MORELLI

- Nascimento** 23 de junho de 1973 - Jaú, São Paulo
- Filiação** Orivaldo Roberto Bachiega
Valdete Maria Salmazo Bachiega
- 1992-1995** Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Lins
- 2000-2001** Especialização em Odontopediatria
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP
- 2010-2013** Curso de Aperfeiçoamento em Ortodontia
Centro de Ortodontia Ortogotardo
- 2014-2016** Curso de Pós- Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado
Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus, meu maior Mestre, pois na sua infinita bondade está sempre presente em minha vida, me acalmando e me fazendo superar qualquer obstáculo, através da minha fé inabalável, não me deixando desistir nas horas de aflição e angústia, me mostrando o caminho, através de seu amor e misericórdia.

À meu marido Claudío e meus filhos Helena e Bruno, obrigada por vocês me tornarem uma pessoa muito melhor, pelo amor, pelo carinho, pela paciência, por acreditarem em mim sempre, me incentivando, me encorajando, nas horas mais difíceis, vocês sempre estiveram lá...Me desculpem pela minha ausência, saibam que mesmo não estando presente fisicamente, meu pensamento estava conectado com vocês, porque nosso amor, nossa família, está acima de tudo. Claudío, te amo além da vida. Helena e Bruno, vocês são meus presentes de Deus, amor infinito, minha missão, minha essência, meu orgulho, minha razão. Amo vocês!!!

À todos meus familiares, em especial, meus pais, Orivaldo e Valdete, meus exemplos, minha base, o que sou hoje, devo a vocês, obrigada por sempre acreditarem em mim, não me deixar desistir jamais, a palavra certa, na hora certa, sempre. Essa vitória é de vocês também!!! Amo vocês!!

Aos meus irmãos queridos, Debora, Marcus e Ana Paula, estamos juntos desde sempre, pra sempre, falar de vocês é muito fácil, são minha alegria, são meus espelhos, minha história, amo vocês !!

Ao meu sogro e minha sogra Adelino e Ilva, muito obrigada por todo apoio incondicional e carinho sempre, são meus exemplos de vida também, amo vocês.

Aos meus queridos, cunhados e cunhadas, António Carlos, Karina, Cristiano, Ana Lucia, Clau, Douglas, e meus queridíssimos e amados sobrinhos: Raquel, Matheus, Maria Antônia, Elisa, Gabriela e Vinicius muito obrigada por poder compartilhar a vida com vocês. Amo vocês!

À minha querida Yara, sem você, a caminhada seria muito difícil, obrigada por cuidar com tanto amor da minha família.

Agradecimento Especial

AGRADECIMENTO **E**SPECIAL

À Profa. Dra. Mirían Aiko Nakane Matsumoto, minha orientadora, agradeço pelo acolhimento desde o início, com tanto respeito e dedicação, sempre transmitindo seus ensinamentos com paciência e sem medir esforços para o auxílio necessário. Agradeço por todos os conselhos, pelo incentivo, por acreditar em mim, e principalmente por sempre demonstrar o amor que nutre pela Ortodontia, exemplo a ser seguido pelos seus alunos e paradigma que levarei para a vida.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual diretora Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato.

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, por todo seu conhecimento, dedicação, paciência!! Por ensinar Odontologia, com maestria e amor, aos seus alunos!! Toda minha admiração e respeito!

Ao corpo docente do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva, Prof^a. Dr^a. Aldevina Campos de Freitas, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, Prof^a. Dr^a. Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof^a. Dr^a. Kranya Victória Díaz-Serrano, Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Borsatto, Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato, Prof^a. Dr^a. Andíara de Rossi Daldegan, Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof^a. Dr^a. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Sasso Stuaní, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof. Dr. Adilson Thomazinho, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano e Prof^a. Dr^a. Maria da Conceição Pereira Saraiva pela convivência agradável e por todo ensinamento a mim transmitido. Obrigada pelas inúmeras vezes que se disponibilizaram em me auxiliar de alguma forma.

Às minhas queridas, Thaís Aparecida Xavier, Nicole Lima, Laura Bastos e Claudía Carpio, meu muito obrigada, o que seria de mim sem vocês! Nunca irei esquecer o carinho, a parceria, o companheirismo, com vocês aprendi muito sobre nossa profissão, mas aprendi principalmente sobre a vida!

Aos meus queridos colegas de turma, Ana Maria Guerra, Alessandra Parreira Menino, Mariana Trevizan, Mariana Shirozaki, Guido Vasquez, Arthur Cunha, Ana Paula Dias, Thaíse Taira, Letícia Sgarbi Pinto, vocês foram essenciais nesta caminhada.

Aos meus amigos, pós-graduandos, que estiveram comigo lado a lado, durante toda minha pesquisa, me auxiliando, me incentivando, sempre com uma palavra amiga, como vocês foram gentis comigo, não tenho palavras para agradecer a vocês, Leonardo Gontijo Matos, Mariele Andrade, Karla Capio, muito obrigada.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil e da Clínica de Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Filomena Lelli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Rosemary Alves, Marco Antonio dos Santos, Vera do Nascimento Scandelaí, Benedita Viana Rodrigues, Renata Cristina Rosa e Fátima Aparecida Rizoli pela ajuda, sempre muito atenciosos.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Isabel Cristina Galino Sola e Mary Possani pela disposição e atenção que sempre deram a mim.

À Profa. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva, minha sincera gratidão pela ajuda com a análise estatística, por transmitir seus conhecimentos e pela disponibilidade com que sempre me recebeu.

À Dr^a. Ana Zilda Bergamo e Prof^a. Dr^a. Marcela Andrucíoli pelo exemplo de profissionais, sempre muito atenciosas e simpáticas, dispostas a ajudar em todas as minhas dúvidas sobre a metodologia da minha pesquisa. Agradeço de coração.

À querida Nílza Letícia Magalhães, sempre disposta a ajudar, colaborando para os meus experimentos, aprendi muito com você na nossa convivência, no laboratório, quanta paciência teve comigo, você é uma pessoa diferenciada, como já te disse, que Deus te abençoe sempre.

A todos os amigos da Pós-graduação, pela convivência e conhecimentos compartilhados.

À Profa. Dra. Magda Feres, pela colaboração na realização deste trabalho, pelo auxílio com os resultados e pela atenção e disponibilidade com que me recebeu, expresse minha gratidão.

À bióloga Izilvânia Q. Barreto, técnica do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Guarulhos, pelo auxílio na realização do processamento microbiológico das amostras. Obrigada pela atenção, prontidão em atender sempre minhas solicitações e por ter me recebido tão bem na Universidade.

À querida secretária do Curso de especialização em Ortodontia, Rosemary Alves de Sá, pela amizade, auxílio, e presteza na finalização deste trabalho.

As minhas queridas colegas de profissão e amigas, Lígia Gonçalves, Giovana Venezian e Renata Campi, que muito me apoiaram,

prestando auxílio e compartilhando comigo suas experiências acadêmicas, que muito contribuíram na elaboração deste trabalho.

Aos alunos da Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, meu eterno agradecimento pela ajuda com os pacientes e disponibilidade.

Aos queridos pacientes que, sem eles nada disso seria possível.

À todos que de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida durante todo o curso.

SONHE

*Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus
caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam
por suas vidas.*

CLARICE LISPECTOR

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	35
2. PROPOSIÇÃO	41
3. MATERIAIS E MÉTODO	45
4. RESULTADOS	55
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE	85
ANEXOS	91

Resumo

Morelli, RFB. **Avaliação Microbiana de Ligaduras Elastoméricas Estéticas por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*: Estudo *in vivo***. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2016. 98p.

RESUMO

O método de fixação do arco ortodôntico aos bráquetes cerâmicos é principalmente realizado por meio de ligaduras elastoméricas estéticas e têm sido alvo de atenção, pois, apesar da praticidade, acumulam grande quantidade de biofilme que causa degradação de cor, comprometendo permanentemente a estética. O objetivo desta pesquisa foi avaliar, *in vivo*, a contaminação microbiana da saliva e de 4 diferentes marcas comerciais de ligaduras estéticas: 1- Unistick Pearl – American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA; 2- Power Sticks Pearl – Ortho Technology, Tampa, Flórida, EUA; 3- Ease to tie, Obscure - 3M Unitek, Monrovia, CA, USA; 4–Ligadura modular marfim–Morelli Ortodontia-Brasil, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Foram selecionados 23 pacientes (entre 11 e 25 anos) de ambos os sexos, em tratamento ortodôntico corretivo. Foi coletado 1 ml de saliva não estimulada no momento da inserção e trinta dias após a colocação das ligaduras estéticas. Decorridos 30 dias da colocação, as ligaduras elastoméricas foram removidas, processadas individualmente e estocadas a -20°C , até o momento da análise microbiológica. Os dados foram analisados utilizando o software SAS software for Windows versão 9.1.3. Na saliva, não foram encontradas alterações estatisticamente significantes, exceto para o grupo de bactérias do complexo laranja ($p=0,0493$). Os resultados encontrados nas ligaduras elastoméricas estéticas mostraram acúmulo significativo nas bactérias do complexo laranja ($p=0,0167$), enquanto que nos outros complexos e nas bactérias cariogênicas não observamos diferenças estatisticamente relevantes. Evidenciou-se que a ligadura estética da marca comercial Morelli, apresentou menores níveis de contaminação bacteriana ($p=0,0108$) nos meninos. Assim, conclui-se que as ligaduras elastoméricas estéticas, no período de 30 dias, foram multicolonizadas por várias espécies de micro-organismos, especialmente as do complexo laranja, reforçando a necessidade de uma higiene bucal rigorosa em pacientes ortodônticos.

Palavras-chave: Aparelho Ortodôntico, Bactérias, Biologia Molecular, Sondas DNA.

Abstract

Morelli, RFB. **Microbial Evalution of Esthetic Elastomeric Ligatures through the Checkerboard DNA-DNA Hybridization Technique: In Vivo study.** [Dissertation].
Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2016. 98p.

ABSTRACT

The attachment for orthodontic archwires to ceramic brackets are mainly done by means of aesthetic elastomeric ligatures, therefore, they have been subject of attention because they accumulate a great amount of biofilm, causing color degradation then compromising their aesthetic visual. The objective of this research was to analyze, *in vivo*, the microbial contamination of saliva and 4 different brands of aesthetic ligatures: 1- Unistick Pearl – American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA; 2- Power Sticks Pearl – Ortho Technology, Tampa, Florida, EUA; 3- Ease to tie, Obscure - 3M Unitek, Monrovia, CA, USA; 4– Ligadura modular marfim–Morelli Ortodontia-Brasil, through the *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* technique. Twenty-three patients (between 11 and 25 years old) of both genders, under orthodontic treatment were selected. One milliliter of non-stimulated saliva, at time of inserting the ligatures and 30 days after its insertion, was collected. Thirty days after the placement the elastomeric ligatures were removed, individually processed and stored at -20°C, until the microbiological analysis. The data were analyzed using the SAS software for Windows version 9.1.3. No statistically significant changes were found in the saliva values, except for the bacterias of the orange complex ($p = 0.0493$). The obtained results in the aesthetic elastomeric ligatures showed a significant increase in the orange bacterial complex ($p=0,0057$), while in the others complexes no statistically differences were observed. The Morelli commercial brand of aesthetic ligature showed lower bacterial contamination levels ($p=0,0108$) in boys. Thus, it can be concluded that the aesthetic elastomeric ligatures, in a 30-day period, were multi-colonized by various species of microorganisms, especially from the orange complexes, reinforcing the need for a thorough oral health care in orthodontic patients.

Keywords: Orthodontic Appliance, Bacteria, Molecular Biology, DNA probes.

1. Introdução

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal, com seus diversos nichos e ampla oferta de nutrientes é, sem dúvida, propícia para a formação irrestrita de biofilmes microbianos naturais, cujos micro-organismos convivem em equilíbrio com seu hospedeiro.¹ As comunidades microbianas bucais são consideradas uma das floras mais complexas existentes no corpo humano, contendo mais de 800 espécies bacterianas diferentes.²

Os biofilmes bucais são formados por diversas comunidades de micro-organismos aderentes incorporadas em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares que possuem uma estrutura complexa heterogênea e dinâmica. A matriz extracelular atua não só como um adesivo para o biofilme, mas assegura sua integridade e a adesão a um substrato.²⁻⁴

A ocorrência da doença resulta do desequilíbrio deste ecossistema complexo, onde as mudanças populacionais levam ao aumento das espécies patogênicas, que contribuem para o aparecimento e progressão das doenças bucais mais comuns como a cárie e a doença periodontal.⁵⁻⁸

O aparelho ortodôntico, com seus diversos sítios de retenção, favorece alterações específicas na cavidade bucal, como a diminuição do pH e elevação no número de micro-organismos presentes na saliva e no biofilme dental.⁹⁻¹² Consequentemente, além de aumentar o risco de desmineralização no esmalte e aumento no número de lesões de manchas brancas,¹³⁻¹⁷ também pode ser responsável por complicações sistêmicas, uma vez que alguns procedimentos ortodônticos podem causar bacteremias transitórias.^{10,18,19}

Medidas preventivas como bochechos com clorexidina a 0,12% têm sido usados exaustivamente para reduzir os níveis de micro-organismos cariogênicos na cavidade bucal em Ortodontia,^{11,20,21} já que o aparelho ortodôntico reduz significativamente a eficácia do processo natural de limpeza bucal e dificulta a remoção do biofilme através da escovação.^{2,22}

Dentro deste contexto, a utilização generalizada de acessórios ortodônticos, têm sido alvo de atenção no tratamento ortodôntico, principalmente no que se refere à capacidade de acúmulo de biofilme,^{2,23,24} atraindo muito interesse em pesquisas ortodônticas.^{25,26}

Atualmente, os pacientes buscam discrição e estética durante o tratamento ortodôntico e optam por braquetes estéticos.²⁷ Frente a essa nova exigência, as empresas desenvolveram ligaduras elastoméricas estéticas que respondam à expectativa do paciente em tornar o aparelho ortodôntico o mais imperceptível possível.^{23,28,29}

As ligaduras elastoméricas possuem certas vantagens no tratamento ortodôntico como fácil instalação, biocompatibilidade, e conforto para o paciente,^{30,31} pois diminuem o risco de danos à mucosa bucal.³² Porém, possuem algumas desvantagens como mudanças nas propriedades físicas quando expostas ao ambiente úmido, diminuição nas forças liberadas ao longo do tempo e acúmulo de biofilme.^{33,34}

Os elásticos sintéticos são produzidos a partir de materiais poliuretanos derivados do petróleo. Os elastômeros poliuretanos mais utilizados em Ortodontia são os elásticos em cadeia e as ligaduras elásticas.³⁵ A composição das ligaduras elastoméricas é o resultado do grau de tecnologia empregada, do refinamento da técnica de obtenção e da qualidade de matérias primas utilizadas durante sua confecção.^{30,31,36} Porém, quando distendidas e expostas em ambiente bucal absorvem água e saliva, quebrando suas ligações internas e promovendo deformação permanente.³⁵

Os micro-organismos aderem às superfícies elásticas devido às interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e reações específicas de lectina. A adesão bacteriana é favorecida pelas superfícies com maior energia livre. O ataque inicial é um fator importante que determina maior colonização.^{5,12}

Trabalhos de pesquisa têm sido realizados para a detecção de micro-organismos em aparelhos ortodônticos por meio de cultura microbiana,^{20,37,38} técnicas de microscopia^{16,39} e técnicas de biologia molecular.^{1,10,11,40,41} Esta última permite a detecção de micro-organismos nutricionalmente exigentes e de difícil cultivo, sendo possível a identificação de

espécies bacterianas de maneira mais confiável por meio de sondas de DNA.²⁴ Dentre as técnicas de biologia molecular, encontra-se a *técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, desenvolvida por Socransky et al.,⁴² que processa em menor espaço de tempo, grande número de amostras e detecta várias espécies bacterianas com maior precisão.

No entanto, não há estudos publicados avaliando a contaminação microbiana de ligaduras elastoméricas estéticas empregando técnicas de biologia molecular como a *técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

2. P_{proposição}

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vivo*, a contaminação microbiana da saliva e de ligaduras elastoméricas estéticas, por meio da técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, após 30 dias na cavidade bucal.

3. *M*ateriais e *M*étodo

MATERIAIS E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 2015.1.338.829) (Anexos) sendo obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis (Anexos). Foram selecionados 25 pacientes entre 11 e 25 anos de idade, de ambos os gêneros, portadores de dentição permanente completa e que iniciaram tratamento ortodôntico corretivo no Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

A amostra foi calculada utilizando de estudo prévio,²⁴ admitindo um erro amostral de 5%, poder do teste de 80% e diferença de 2 valores entre os escores. Estabeleceu-se o cálculo amostral através do software G*Power 3.1.9.2.

Os pacientes deveriam apresentar boa saúde geral e não ter feito uso de antibióticos e/ou bochechos com soluções antimicrobianas por um período mínimo de 3 meses, previamente ao início da pesquisa.

Coleta e processamento da saliva

As coletas de saliva foram feitas no momento da colocação das ligaduras estéticas e trinta dias após. As amostras de saliva foram coletadas em tubos tipo Falcon, contendo pérolas de vidro e homogeneizadas em vortex por 30s a 2000rpm. Seguidamente, 30 µL de saliva foram depositados em tubos plásticos para microcentrífuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany) contendo 120 µL de solução tampão TE [10 mM Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Co., St. Luis, MO, EUA)] (pH 7,6) e acrescentados 100 µL NaOH a 0.5 M (Labsynth). Após homogeneização em vortex por 30s a 2000rpm, as amostras foram estocadas a - 20°C até o momento da análise molecular, para a contagem inicial das bactérias na saliva.

Colagem dos bráquetes ortodônticos e inserção das ligaduras elastoméricas

Previamente à colagem dos bráquetes, realizou-se a profilaxia utilizando água e pedra-pomes de granulação fina sem flúor (S.S. White, Petrópolis, RJ, Brasil), com escova Robinson (KG Sorensen, Barueri, Brasil), montada em contra ângulo em baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Posteriormente, os dentes foram lavados durante 10 segundos e secos com jatos de ar comprimido, livre de óleo.

Os 25 pacientes selecionados receberam bráquetes metálicos convencionais (Gemini™, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) em todos os dentes permanentes superiores e inferiores de 1º molar a 1º molar, colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Após a colagem dos bráquetes foi inserido um fio ortodôntico 0.014" (Dentsply, GAC), que foi amarrado com 4 diferentes marcas comerciais de ligaduras estéticas:

1. Unistick Pearl – American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA.
2. Power Sticks Pearl – Ortho Technology, Tampa, Flórida, EUA.
3. Ease to tie, Obscure - 3M Unitek, Monrovia, CA, USA.
4. Ligadura modular marfim código 60.06.120 – Morelli Ortodontia, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

Os pacientes selecionados receberam as ligaduras elastoméricas estéticas nos dentes 13, 23, 33 e 43, seguindo o protocolo conduzido de forma randomizada e cruzada para eliminar fatores de confusão. O processo de alocação foi aleatório seguindo as seguintes etapas: inicialmente, foram estabelecidas 25 combinações alternadas dos 4 tipos de elásticos a serem recebidos por cada paciente. Em seguida, estas combinações foram aleatoriamente sorteadas criando uma lista com uma sequência na qual os pacientes eram alocados conforme se apresentavam para o estudo. O processo de aleatorização foi realizado com auxílio do programa SAS (*Statistical Analysis System*) for Windows versão 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Em seguida, todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal, fornecidas por um único operador, para minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados obtidos. A fim de padronizar o protocolo de higiene bucal, os pacientes também receberam escovas dentais (Professional®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda., S B Campo, SP, BR) e dentifrícios fluoretados (Colgate Máxima Proteção Anticáries®, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda., S B Campo, SP, BR). Os pacientes foram orientados a escovar os dentes 3 vezes ao dia, após as refeições principais, durante todo o período do experimento.

Decorridos 30 dias, foi realizada nova coleta de saliva não estimulada e as ligaduras elastoméricas estéticas foram removidas com aplicador de amarrilho elástico (Morelli Ortodontia) e processados para posterior análise.

Processamento das amostras

Cada ligadura foi colocada individualmente em tubos plásticos para microcentrifuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany), contendo 150 µL de solução tampão TE (pH 7,6) e 100 µL de NaOH a 0,5 M, codificados e agitados vigorosamente em aparelho Mixtron (Toptronix – São Paulo, SP, BR), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para dessorção do material. Os tubos contendo a suspensão bacteriana foram estocados a -20°C, até o momento do processamento.

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Guarulhos.

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

O conteúdo de cada amostra foi avaliado utilizando-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, para verificar a presença de 40 espécies bacterianas diferentes, por meio de sondas de DNA (Tabela 1). As amostras foram aquecidas para lisar as células bacterianas e o DNA contido nas mesmas foi depositado sobre uma membrana de nylon com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA), com o auxílio de um dispositivo específico (*Minislot-30* - Immunetics, Cambridge, MA, USA).

Após a fixação do DNA sobre a membrana, esta foi colocada em outro dispositivo (*Miniblotter-45* - Immunetics), com as linhas contendo o DNA das amostras posicionadas perpendicularmente às canaletas do *Miniblotter-45*. As sondas de DNA para os 40 micro-organismos diferentes, marcadas com digoxigenina, foram depositadas nas canaletas do *Miniblotter-45* para a hibridização das sondas com o DNA das amostras. As membranas foram então lavadas em alta adstringência e as sondas de DNA foram detectadas utilizando-se o anticorpo anti-digoxigenina, conjugado à fosfatase alcalina, por meio da observação dos sinais de quimioluminescência. Os sinais produzidos foram comparados aos controles. A leitura dos resultados foi realizada duas vezes para a conferência dos resultados por um único examinador calibrado ($Kappa > 0,8$) e cego com relação aos grupos avaliados. A sensibilidade foi ajustada para permitir a detecção de 10^4 das espécies que serão avaliadas pelo ajuste da concentração das sondas de DNA. A descrição detalhada da técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA hybridization* encontra-se no Apêndice.

O acúmulo de bactérias nas amostras de saliva e nas quatro ligaduras foi estudado em relação a cada espécie bacteriana e também em relação aos grupos e complexos.⁴² Estes agrupamentos incluíram bactérias cariogênicas, grupo dos *Actynomices* e os complexos vermelho, laranja, verde, amarelo, roxo (Tabela 1).

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

Microrganismo	Cepa
Bactérias cariogênicas	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356 ^a
<i>Streptococcus mutans</i>	25175 ^a
Grupo dos Actinomyces	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104 ^a
<i>Actinomyces oris</i>	43146 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i> I	17929 ^a
Complexo roxo	
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a
<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
Complexo amarelo	
<i>Aggregatibacter</i>	43718 ^a
<i>actinomycetemcomitans</i> a + b	29523 ^a
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Propionibacterium acnes</i> I + II	11827 ^a
	11828 ^a
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a
Complexo verde	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a
Complexo laranja	
<i>Gemella morbilorum</i>	27824 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	49256 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
Complexo vermelho	
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Haffajee et al. (2008), e bactérias cariogênicas.

^a ATCC (American Type Culture Collection).

^b Forsyth Institute, Boston, MA.

A fim de facilitar a análise dos resultados, com relação aos micro-organismos avaliados, foram empregados os seguintes escores:

- Escore 0: sem sinal de quimioluminescência;
- Escore 1: sinal menos intenso que o controle de 10^5 células;
- Escore 2: sinal equivalente a 10^5
- Escore 3: sinal entre 10^5 e 10^6 células;
- Escore 4: sinal equivalente a 10^6 células e
- Escore 5: sinal equivalente a mais de 10^6 células.

Análise dos dados

Os resultados obtidos com o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram tabulados e submetidos à análise estatística, utilizando o software *SAS (Statistical Analysis System)* for Windows versão 9.1.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA), a fim de avaliar o nível de contaminação das ligaduras e da saliva, para micro-organismos totais, complexos bacterianos e para cada um dos 40 micro-organismos estudados.

A análise das características demográficas foi realizada por meio de teste qui-quadrado e Teste t de Student para comparação de médias de idade entre meninos e meninas.

As análises dos escores bacterianos isolados ou em grupo foram realizadas empregando-se testes não paramétricos para dados ordinais e medidas repetidas. A comparação entre os escores de espécies ou grupos bacterianos na saliva (T0 e T1) foi realizada por meio de teste de Wilcoxon para medidas pareadas. As comparações de crescimento bacterianos entre as diferentes ligaduras foram realizadas empregando-se o teste não paramétrico para dados ordinais e medidas repetidas descrito por Brunner et al..⁴³ Este método requer o ranqueamento global do desfecho a ser analisado que é submetido ao procedimento específico para modelos mistos (proc mixed) no programa *SAS (Statistical Analysis System)* for Windows versão 9.1.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). A estatística proposta requer a utilização da opção ANOVA, do método de estimação

quadrática não enviesada de variância mínima, e também a utilização de matriz de covariância não estruturada por grupo. O pós-teste quando necessário foi realizado por meio de estimação de contrastes entre os elásticos e com a utilização de ajuste de Bonferroni. O nível de significância utilizado no estudo foi de 0.05.

4. Resultados

RESULTADOS

Dos 25 pacientes selecionados, 23 completaram o estudo, sendo 10 meninos e 13 meninas, com média das idades de 13,7 anos (Desvio Padrão= 2,2; Erro padrão= 0.7) para meninos e de 15,5 anos (DP= 4,1; EP = 1,16) para meninas, não sendo possível encontrar diferenças estatisticamente significantes ($p = 0.2238$) entre a média de idade de meninos e meninas.

Análise dos Complexos Bacterianos na Saliva

Comparando a soma total dos escores bacterianos na saliva no dia da colocação dos elásticos (T0) com os valores após trinta dias (T1), não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes ($p=0,5316$). De forma geral, não houve diferença entre complexos no período de um mês, exceto para o aumento nas bactérias do complexo laranja (bactérias periodontopatogênicas) ($p=0,0493$). (Figura 1 e Tabela 2)

Figura 1- Total da soma dos escores bacterianos na saliva.

Tabela 2 - Comparação dos escores bacterianos na saliva.

	T 0		T1		<i>p</i> *
	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	
Soma Total	42	26 - 59	47	29 - 67	0,0531
Bactérias Cariogênicas	1	1 - 3	2	0 - 4	0,3173
Complexo Vermelho	0	0 - 3	2	0 - 4	0,3173
Complexo Laranja	11	6 - 9	14	11 - 21	0,0493*
Complexo Verde	1	3 - 4	3	1 - 5	0,6547
Complexo Amarelo	17	12 - 21	15	11 - 21	0,9999
Complexo Roxo	5	2 - 6	4	3 - 5	0,9999
Grupo <i>Actynomices</i>	5	3 - 7	6	4 - 8	0,1444

*Valor de p para o teste Wilcoxon para dados pareados

Análise dos Complexos Bacterianos nas Ligaduras Estéticas

A análise do total da soma dos escores bacterianos nas ligaduras elastoméricas estéticas mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os 4 grupos com valor de $p = 0,0439$ (Figura 2 e Tabela 3). Quando os grupos bacterianos foram analisados separadamente observou-se diferença no acúmulo de bactérias entre as ligaduras apenas no complexo laranja (periodontopatogênicas) ($p = 0,0167$) (Figura 3 e Tabela 3). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos na saliva. A análise dos contrastes revelou significância estatística apenas entre a ligadura Morelli e 3M Unitek, sendo que o elástico Morelli exibiu menor contaminação (Figura 2). Por outro lado, a soma dos escores bacterianos do complexo laranja para a ligadura Morelli, foram estatisticamente diferentes das demais ligaduras (Tabela 4 e Figura 3). Foram realizadas apenas 3 comparações por meio da correção de Bonferroni, pois, a análise dos box-plots, indicou a necessidade de comparação de apenas três contrastes.

Figura 2- Total da soma dos escores bacterianos nas ligaduras elastoméricas estéticas.

Tabela 3 - Comparação dos escores bacterianos nas ligaduras estéticas (n = 23).

	American Orthodontics		Ortho Technology		3M Unitek		Morelli		P
	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	
Soma Total	84	66-100	88	72-106	87	79-104	80	58-93	0,0439*
Bactérias Cariogênicas	4	3-4	3	2-5	4	3-5	3	2-4	0,1721
Complexo Vermelho	5	3-6	4	3-7	5	3-7	4	3-5	0,5915
Complexo Laranja	26	18-31	27	21-32	27	23-32	22	16-28	0,0167*
Complexo Verde	7	6-9	8	5-9	9	5-9	7	5-9	0,2203
Complexo Amarelo	23	20-26	24	20-28	24	21-29	23	17-25	0,0768
Complexo Roxo	7	7-8	8	7-8	8	7-9	7	7-8	0,5002
Grupo <i>Actynomices</i>	12	10-14	15	11-16	13	10-15	11	9-15	0,0672

* Valor de p referente ao teste não paramétrico-modelo misto para dados dependentes e Anovaf.

Figura 3 - Total da soma dos escores bacterianos nas ligaduras elastoméricas estéticas, por complexo.

Tabela 4 - Valores de significância de contrastes comparando as ligaduras entre si.

		Soma Total	Complexo laranja
American Orthodontics	Morelli	0.0628	0.0060*
Ortho Technology	Morelli	0.0408	0.0068*
3M Unitek	Morelli	0.0114*	0.0022*

* Valores significantes considerando-se correção de Bonferroni para apenas 3 comparações ($\alpha = 0.05/6 = 0.008$).

Na análise individual das espécies do complexo laranja, diferenças entre as ligaduras foram observadas para *F. Nucleatum sp nucleatum* ($p=0,0007$), enquanto que, no complexo amarelo, diferenças foram observadas para *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,00191$) e *S. constellatus* ($p=0,0018$) (Tabela 5). Na análise dos contrastes comparando as ligaduras entre si, por correção de Bonferroni, verificou-se diferenças estatísticas entre as ligaduras Morelli e 3M Unitek, considerando cada uma das bactérias. A ligadura estética 3M Unitek foi estatisticamente diferente da Ortho Technology e Morelli quanto ao acúmulo de *S. Constellatus*. Quanto à contaminação com *A. Actinomycetemcomitans*, apenas as ligaduras Morelli e 3M Unitek foram estatisticamente diferentes, assim como, entre a ligadura Morelli e as demais ligaduras, quanto à presença de *F. nucleatum sp nucleatum* (Tabela 6).

Tabela 5 - Distribuição da quantidade de microrganismos presentes nas ligaduras estéticas

Microrganismo	American Orthodontic	Ortho Technology	3M Unitek	Morelli	P
Bactérias Cariogênicas	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>S. mutans</i>	3 (2 – 3)	3 (2 - 3)	3 (2 - 3)	2 (1 – 3)	0,0582
<i>L. acidophilus</i>	1 (0 – 1)	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)	1 (0 – 1)	0,4795
Complexo Amarelo	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2 (1 - 2)	2 (1 - 2)	2 (1 – 3)	1 (1 – 2)	0,0191*
<i>L. buccalis</i>	2 (1 – 2)	2 (1 – 3)	2 (1 – 2)	1 (1 – 2)	0,0599
<i>P. acnes</i>	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0,3906
<i>S. anginosus</i>	2(1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (2 – 3)	2 (1 – 3)	0,3916
<i>S. constellatus</i>	2 (1 – 3)	2 (1 – 2)	3 (2 – 3)	2 (1 – 2)	0,0018*
<i>S. gordonii</i>	4 (3 – 4)	4 (4 – 4)	4 (4 – 4)	4 (3 – 4)	0,6030
<i>S. intermedius</i>	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	0,3265
<i>S. mitis</i>	3 (3 – 3)	3 (3 – 3)	3 (3 – 4)	3 (3 – 3)	0,0794
<i>S. oralis</i>	3 (3 – 4)	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	3 (3 – 4)	0,9802
<i>S. sanguinis</i>	3 (3 – 4)	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	3 (3 – 4)	0,5820
Complexo Laranja	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>C. gracilis</i>	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	0,2032
<i>C. rectus</i>	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (0 – 2)	0,3096
<i>C. showae</i>	2 (2 – 3)	3 (2 - 3)	2 (2 – 3)	2 (1 – 3)	0,1492
<i>C. ochracea</i>	1 (1 – 2)	2 (1 - 2)	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)	0,0617
<i>F. nucleatum</i> sp <i>nucleatum</i>	2 (1 – 2)	2 (1 – 2)	2 (1 – 2)	1 (0 – 2)	0,0007*
<i>F. nucleatum</i> sp <i>vincentii</i>	3 (2 – 3)	3 (3 – 3)	3 (3 – 4)	3 (3 – 3)	0,2602
<i>F. nucleatum</i> sp <i>polymorphum</i>	2 (0 – 2)	2 (1 - 2)	2 (1 – 3)	1 (0 – 2)	0,0643
<i>F. periodonticum</i>	1 (0 – 1)	1 (0 – 2)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0,0557
<i>G. morbillorum</i>	2 (2 – 3)	2 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (1 – 3)	0,3676
<i>P. intermedia</i>	3 (2 - 3)	3 (2 - 3)	3 (2 - 3)	2 (1 – 3)	0,0583
<i>P. melaninogenica</i>	3 (2 – 4)	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	0,2679
<i>P. nigrescens</i>	3 (2 – 3)	3 (3 – 3)	3 (3 – 3)	3 (2 – 3)	0,4310
<i>S. noxia</i>	2 (2 – 3)	2 (2 – 3)	3 (2 – 3)	2 (2 – 3)	0,1588
Complexo Roxo	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>V. parvula</i>	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	0,7590
<i>N. mucosa</i>	3 (3 – 4)	3 (3 – 4)	3 (3 – 4)	3 (2 – 4)	0,4780
Complexo Verde	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>C. gingivalis</i>	2 (2 – 3)	3 (1 – 3)	3 (2 – 3)	2 (1 – 3)	0,5125
<i>C. sputigena</i>	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (1 – 3)	2 (1 – 3)	0,1924
<i>E. corrodens</i>	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	2 (2 – 3)	0,3322
Complexo Vermelho	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>E. nodatum</i>	1 (0 – 1)	1 (0 – 2)	1 (1 – 2)	1 (0 – 1)	0,0883
<i>P. gingivalis</i>	1 (1 – 1)	1 (0 – 1)	1 (0 – 1)	1 (1 – 1)	0,8538
<i>T. forsythia</i>	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0,3915
<i>T. denticola</i>	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	0,5581
<i>T. socranskii</i>	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (1 – 2)	0,4466
Grupo Actinomices	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>A. gerencseriae</i>	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	0,1881
<i>A. israelii</i>	2 (0 – 2)	2 (1 – 3)	2 (0 - 3)	2 (0 - 3)	0,2841
<i>A. naeslundii</i>	3 (3 – 4)	3 (3 – 4)	3 (3 – 4)	3 (3 – 3)	0,0762
<i>A. odontolyticus</i>	2 (2 - 3)	3 (2 – 3)	2 (2 - 3)	2 (2 - 3)	0,1238
<i>A. oris</i>	2 (2 - 3)	3 (2 – 4)	3 (2 – 3)	2 (2 - 3)	0,2131

Tabela 6 - Valores de significância de contrastes comparando as ligaduras entre si.

		S. <i>constellatus</i>	A. <i>Actinomycetemcomitans</i>	<i>F. nucleatum</i> <i>sp nucleatum</i>
American Orthodontics	Ortho Technology	0,6725	0,5344	0,9670
American Orthodontics	3M Unitek	0,0094	0,0416	0,7677
Ortho Technology	3M Unitek	0,0058*	0,2035	0,7692
American Orthodontics	Morelli	0,3139	0,2124	0,0014*
Ortho Technology	Morelli	0,6218	0,0905	0,0001*
3M Unitek	Morelli	0,0008*	0,0019*	0,0001*

* Valores de p considerados significantes com ajuste de Bonferroni (alfa = 0.05/6 = 0.008)

Embora seja um estudo clínico aleatorizado, a aleatorização foi realizada para os dentes do mesmo indivíduo. Desta forma, é possível que variáveis externas possam influenciar no desempenho das ligaduras. Ao estratificar a análise entre meninos e meninas, nota-se que as diferenças foram estatisticamente significantes entre meninas ($p=0.4655$) e meninos ($p = 0,0108$) (Tabelas 7 e 8). Quando os complexos bacterianos foram analisados, estratificando para meninos e meninas, diferenças estatisticamente significantes só foram observadas para os meninos nos complexos vermelho ($p= 0,0054$), laranja ($p= 0,0187$), verde ($p= 0,0049$) e o grupo *Actinomyces* ($p=0.0053$) (Tabela 8).

Para os meninos, o pós-teste mostrou diferença entre as ligaduras Morelli com as demais (3M Unitek, Ortho Technology e American Orthodontics), tanto para o total da soma dos escores bacterianos como para os complexos bacterianos laranja e verde. A ligadura Morelli foi diferente da Ortho Technology e 3M Unitek quanto ao acúmulo de bactérias do complexo vermelho. A ligadura Ortho Technology foi diferente das ligaduras Morelli e American Orthodontics quanto ao acúmulo de bactérias do grupo *Actinomyces* (Tabela 9 e Figura 4).

Tabela 7- Comparação dos escores bacterianos nas ligaduras estéticas nas meninas (n = 13).

	American Orthodontics		Ortho Technology		3M Unitek		Morelli		P
	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	
Soma Total	94	82-100	85	72-106	98	82-107	91	76-97	0,4655
Bactérias Cariogênicas	4	3-5	3	3-5	5	3-5	4	3-5	0,4877
Complexo Vermelho	5	4-6	3	3-7	5	4-6	5	4-7	0,3921
Complexo Laranja	29	23-31	27	21-32	27	25-34	25	22-29	0,2899
Complexo Verde	9	6-9	8	7-9	9	6-10	8	7-9	0,7053
Complexo Amarelo	25	22-28	24	22-27	26	22-29	24	23-25	0,2158
Complexo Roxo	7	7-9	8	8-8	8	7-9	7	7-9	0,6694
Grupo Actynomices	13	10-14	15	10-15	13	11-15	12	11-15	0,8328

Tabela 8 - Comparação dos escores bacterianos nas ligaduras estéticas nos meninos (n = 10).

	American Orthodontics		Ortho Thechnology		3M Unitek		Morelli		P
	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	M	Q1- Q3	
Soma Total	68,5	66-89	90,5	77-99	82,5	67-100	58,5	47-80	0,0108*
Bactérias cariogênicas	4	2-4	3,5	2-4	3	2-4	2	1-4	0,2006
Complexo Vermelho	4	3-5	6	3-7	5	3-7	2,5	1-4	0,0054*
Complexo Laranja	20	17-26	28	24-31	26,5	17-30	15	10-22	0,0187*
Complexo Verde	7	5-9	7	5-9	8,5	4-9	4	2-6	0,0049*
Complexo Amarelo	21	20-24	24	18-29	23	20-28	18,5	14-25	0,1471
Complexo Roxo	8	7-8	7,5	7-8	8	7-8	7	7-8	0,3638
Grupo Actynomices	12	10-13	15	14-16	12,5	10-15	10	8-14	0,0053*

Tabela 9 - Valores de significância de contrastes na comparação entre as ligaduras nos meninos.

		Soma				
		Total	Laranja	Vermelho	Verde	Actynomices
American Orthodontics	Ortho Technology	0,1716	0,2390	0,0824	0,8013	0,0039*
American Orthodontics	3M Unitek	0,3166	0,5853	0,2449	0,9896	0,2260
Ortho Technology	3M Unitek	0,8539	0,6239	0,6978	0,8535	0,1255
American Orthodontics	Morelli	<0,0001*	<0,0001*	0,0244	0,0005*	0,4808
Ortho Technology	Morelli	0,0007*	0,0014*	<0,0001*	0,0011*	0,0022*
3M Unitek	Morelli	0,0044*	0,0066*	0,0016*	0,0062*	0,1047

* Valores de p considerados significantes com ajuste de Bonferroni (0.05/6 = 0.008).

Figura 4- Soma dos escores bacterianos das ligaduras estéticas nos meninos.

6. Discussão

DISCUSSÃO

Atualmente, as ligaduras elastoméricas têm substituído as ligaduras metálicas, devido à facilidade de aplicação, otimizando assim o tempo na clínica ortodôntica. No entanto, apesar de apresentarem maior praticidade, as ligaduras elastoméricas podem acumular maior quantidade de biofilme comparadas às ligaduras metálicas.⁶ Entretanto, Brêtas et al.³⁷ não evidenciaram, por meio de cultura bacteriana e microscopia eletrônica de varredura (MEV), diferenças na contaminação microbiana da superfície de ligaduras elastoméricas e metálicas. Do mesmo modo, Condò et al.¹² observaram menor susceptibilidade à adesão de placa nas ligaduras elastoméricas do que nas metálicas, após 28 dias na cavidade bucal, quantificadas por espectrofotometria e análise morfológica por meio de MEV.

Entretanto, não há estudos em Ortodontia que verificam a contaminação bacteriana de ligaduras elastoméricas estéticas, empregando técnicas de biologia molecular como o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, fato que limita a possibilidade de comparação dos resultados obtidos no presente estudo com a literatura específica.

Ao avaliar a contaminação microbiana da saliva e de ligaduras elastoméricas estéticas, os resultados do presente estudo mostraram que na saliva não houve diferença nos complexos bacterianos no período de um mês, exceto para o aumento nas bactérias do complexo laranja (bactérias periodontopatogênicas). Este fato pode evidenciar a presença de inflamação gengival, indicando doença periodontal em estágio inicial. O aumento no número de micro-organismos presentes na saliva e no biofilme dental também foi evidenciado por vários autores ao investigarem a capacidade de acúmulo de biofilme dos acessórios ortodônticos.⁹⁻¹²

Torna-se importante salientar que as espécies bacterianas pertencentes aos complexos amarelo, verde, roxo, e do grupo dos *Actynomices*, que não sofreram alterações

significantes no período avaliado, não estão relacionadas com doenças específicas e normalmente colonizam o biofilme dental previamente às espécies dos complexos laranja e vermelho, espécies altamente relacionadas à doença periodontal, segundo Socransky et al..⁴⁴

Por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, Bergamo et al.²⁴ observaram que, embora um aumento do número de micro-organismos 30 dias após a colagem do aparelho ortodôntico foi evidenciado, somente 60 dias após pode-se observar uma maior incidência de espécies bacterianas dos complexos laranja e vermelho. Por isso, neste estudo foram incluídos pacientes com no mínimo 60 dias em tratamento ortodôntico a fim de evitar a influência da colagem de bráquetes no desenvolvimento da microbiota oral.

Por outro lado, no presente estudo, não foi observado aumento significativo de bactérias cariogênicas, trinta dias após a inserção das ligaduras estéticas, sugerindo baixo risco de desenvolvimento de manchas brancas e lesões de cárie, no período avaliado. Este resultado está de acordo com estudos que não evidenciaram aumento no número de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* e *S. sobrinus* em amostras de saliva, após 15, 30³⁷ e 120⁴⁵ dias da colocação do aparelho ortodôntico. Do mesmo modo, Peros et al.⁴⁶ relataram que o período de maior crescimento de *S. mutans* e *L. acidophilus* ocorre entre 6^a e 12^a semanas de tratamento ortodôntico, além da função salivar e resposta fisiológica serem muito intensas.

Ao compararmos as ligaduras estéticas de diferentes marcas comerciais, considerando principalmente o total da soma de micro-organismos, observou-se significativa contaminação, principalmente pelas bactérias do complexo laranja (periodontopatogênicas). Se considerarmos a proximidade das ligaduras com os bráquetes, pode-se afirmar que estes resultados foram semelhantes aos achados por Andrucoli et al.¹⁰ onde as espécies do complexo laranja foram as bactérias mais prevalentes nos bráquetes metálicos.

Esse fato não significa necessariamente o desenvolvimento da doença periodontal⁴⁷. Entretanto, as bactérias do complexo laranja, apesar de terem características menos agressivas, precedem à colonização do complexo vermelho, que estão associados à

maior destruição tecidual.⁴⁴ Portanto, torna-se necessário o controle da higiene bucal do paciente ortodôntico, como prevenção das periodontopatias.

Ao analisarmos as bactérias individualmente, constatou-se que a contaminação pelas bactérias *F. Nucleatum sp nucleatum* (complexo laranja) e *A. actinomycetemcomitans* e *S. constellatus* (complexo amarelo) foi diferente entre as ligaduras. Essa informação indicou que as ligaduras sofreram maior acúmulo de algumas bactérias do que de outras. Em concordância com um estudo prévio,⁴⁰ o acúmulo elevado dos níveis do patógeno periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nos acessórios ortodônticos pode indicar necessidade de controle de higiene rigoroso, uma vez que, esses micro-organismos são um dos mais importantes patógenos da doença periodontal inflamatória, bem como da periodontite agressiva,⁴⁷ especialmente em pacientes jovens,⁴⁸ os quais correspondem a média de idade de nossa amostra.

Em semelhança com nosso estudo, Bergamo et al.²⁴ encontraram significativo aumento de bactérias do complexo laranja, *C. gracilis*, *F. nucleatum sp nucleatum* e *F. periodonticum*, nos bráquetes ortodônticos, 30 dias após a colagem. Entretanto, em nosso estudo apenas a bactéria *F. nucleatum sp nucleatum* sofreu elevação no mesmo período de tempo avaliado.

A ligadura elástomérica estética da marca comercial Morelli Ortodontia (Sorocaba, São Paulo, Brasil), apresentou valores menores para a adesão de bactérias ($p < 0,05$). Embora as razões para estes resultados não estejam claras, uma possível explicação pode estar relacionada ao fato de que as ligaduras da marca Morelli apresentam menor resistência durante a inserção nos bráquetes, portanto, podem manter sua superfície com menores alterações, ou seja, mais íntegra e lisa, levando à menor agregação de micro-organismos. Em contrapartida, as ligaduras que oferecem maior resistência durante a inserção nos bráquetes, podem apresentar rupturas em suas superfícies, provocando irregularidades e consequentemente maior adesão bacteriana. Como já relatado por Magno et al.,¹⁶ a formação de fissuras na superfície das ligaduras elástoméricas pode favorecer o acúmulo de micro-organismos.

Apesar dos resultados favoráveis deste estudo para a ligadura da marca Morelli, um estudo recente sobre alteração de cor envolvendo estas ligaduras mostrou que houve uma significativa pigmentação destas.²⁷

Do mesmo modo, Rangarajan et al.,¹⁷ não encontraram diferença significativa na contaminação por *S. mutans* em ligaduras elastoméricas de silicone de baixo atrito quando comparadas com ligaduras elastoméricas estéticas convencionais, em estudo realizado por meio de cultura microbiana e MEV, contradizendo assim a afirmação do fabricante, de que a aderência microbiana seria mínima. Assim como, Akgun et al.,⁴⁹ revelaram que as ligaduras elastoméricas convencionais e do tipo não convencional *Slide* (Leone Florence- Itália) foram semelhantes entre si quanto à contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias.

Um resultado surpreendente constatado no presente trabalho refere-se à menor contaminação bacteriana nas ligaduras Morelli dos meninos. A literatura não relata essa questão relacionada a diferenças na contaminação microbiana em pacientes de diferentes sexos. Portanto, torna-se difícil definir a razão pela qual esses resultados foram obtidos. Um aspecto a ser considerado reside no fato das meninas apresentarem uma conformação salivar diferente quando comparada a dos meninos, com maior concentração de proteína total e menor fluxo salivar e atividade da peroxidase.⁵⁰

Tem sido relatado que o fluxo salivar é maior no sexo masculino, sendo essa diferença atribuída a 2 teorias: as mulheres apresentam glândulas salivares menores em comparação aos homens e o padrão hormonal feminino pode contribuir para a secreção salivar diminuída.⁵¹ De acordo com Luckas et al.,⁵² a composição bioquímica da saliva em mulheres pode ser modificada devido às variações hormonais, puberdade, menstruação e gravidez, tornando o ambiente bucal significativamente mais cariogênico para mulheres que para os homens.

Além disso, os pacientes do sexo masculino, apresentam maior capacidade tampão que os pacientes do sexo feminino.⁵¹ Sendo que esta função salivar evita a colonização de micro-organismos patogênicos na cavidade bucal.

Finalmente, fica evidente que um fator muito importante é o controle da higiene bucal do paciente, onde através de protocolos e orientações guiadas pelo profissional, consegue-se preservar uma microbiota saudável e isentar-se de riscos de evolução da doença periodontal e de cáries e lesões de manchas brancas durante o tratamento ortodôntico.⁵³

7. Conclusões

CONCLUSÕES

1. A saliva e as ligaduras elastoméricas estéticas encontraram-se multicolonizadas por diversas espécies bacterianas, destacando-se a maior concentração de bactérias do complexo laranja.
2. A ligadura estética da marca comercial Morelli, apresentou menores níveis de contaminação bacteriana nos pacientes do sexo masculino.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod* 2002;72:338-343.
2. Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation-a potential public health threat? *Clin Oral Investig* 2014;18:1711-1718.
3. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 2010;54:441-454.
4. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623-633.
5. Benson PE, Douglas CW, Martin MV. Fluoridated elastomers: effect on the microbiology of plaque. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:325-330.
6. Türkkahraman H, Sayin MÖ, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Önal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod* 2005;75:231-236.
7. Sanpei S, Endo T, Shimooka S. Caries risk factors in children under treatment with sectional brackets. *Angle Orthod* 2010;80:509-514.
8. Baka ZM, Basciftci FA, Arslan U. Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: a quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;144:260-267.
9. Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:275. e217-275. e222.
10. Andruccioli MCD, Nelson-Filho P, Matsumoto MAN, Saraiva MCP, Feres M, De Figueiredo LC et al. Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141:24-29.
11. Nelson-Filho P, Olmedo LYG, Andruccioli MCD, Saraiva MdCP, Matsumoto MAN, De Queiroz AM et al. Use of the checkerboard DNA-DNA hybridisation technique for in vivo detection of cariogenic microorganisms on metallic brackets, with or without use of an antimicrobial agent. *J Dent* 2011;39:513-517.
12. Condò R, Casaglia A, Condò SG, Cerroni L. Plaque retention on elastomeric ligatures. An in vivo study. *Oral Implantol (Rome)* 2012;5:92-99.
13. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *American Journal of Orthodontics* 1982;81:93-98.
14. Forsberg CM, Brattström V, Malmberg E, Nord CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. *Eur J Orthod* 1991;13:416-420.

15. Zimmer BW, Rottwinkel Y. Assessing patient-specific decalcification risk in fixed orthodontic treatment and its impact on prophylactic procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:318-324.
16. Magno AFF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, 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* 2008;133:S104-S109.
17. Rangarajan S, Mogra S, Shetty VS, Shetty S, Jose NP. Comparison of Contamination of Low-Frictional Elastomeric Rings with That of Conventional Elastomeric Rings by *Streptococcus mutans*-An In-vivo Study. *J Clin Diagn Res* 2015;9:ZC26.
18. Lucas VS, Omar J, Vieira A, Roberts GJ. The relationship between odontogenic bacteraemia and orthodontic treatment procedures. *Eur J Orthod* 2002;24:293-301.
19. Gürel HG, Basciftci FA, Arslan U. Transient bacteremia after removal of a bonded maxillary expansion appliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:190-193.
20. Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:705.e711-707.
21. Sari E, Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients. *Angle Orthod* 2007;77:881-884.
22. Øgaard B. White spot lesions during orthodontic treatment: mechanisms and fluoride preventive aspects *Semin Orthod*: Elsevier; 2008: p. 183-193.
23. Bortoly TG, Guerrero AP, Rached RN, Tanaka O, Guariza-Filho O, Rosa EA. Sliding resistance with esthetic ligatures: an in-vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133:340.e341-347.
24. Bergamo AZN, Nelson-Filho P, Andrucio MCD, do Nascimento C, Pedrazzi V, Matsumoto MAN. Microbial complexes levels in conventional and self-ligating brackets. *Clin Oral Investig* 2016:1-10.
25. Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO, Romanos MTV, Araújo MT. Cytotoxicity of orthodontic elastic chain bands after sterilization by different methods. *Orthod Waves* 2010;69:151-155.
26. Martínez-Colomer S, Gatón-Hernández P, Romano FL, De Rossi A, Fukada SY, Nelson-Filho P et al. Latex and nonlatex orthodontic elastics: In vitro and in vivo evaluations of tissue compatibility and surface structure. *Angle Orthod* 2015;86:278-284.
27. Silva AVMd, Mattos GVd, Kato CM, Normando D. In vivo color changes of esthetic orthodontic ligatures. *Dental Press J Orthod* 2012;17:76-80.
28. Ardeshtna AP, Vaidyanathan TK. Colour changes of orthodontic elastomeric module materials exposed to in vitro dietary media. *J Orthod* 2009;36:177-185.
29. Fernandes ABN, Ribeiro AA, Araujo MVAd, Ruellas ACdO. Influence of exogenous pigmentation on the optical properties of orthodontic elastic ligatures. *J Appl Oral Sci* 2012;20:462-466.

30. Taloumis LJ, Smith TM, Hondrum SO, Lorton L. Force decay and deformation of orthodontic elastomeric ligatures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111:1-11.
31. Cavalcante JS, Sobral MC. Evaluation of the susceptibility to pigmentation of orthodontic esthetic elastomeric ligatures. *Dental Press J Orthod* 2013;18:20e21-20e28.
32. Lariato LB, Machado AW, Pacheco W. Considerações clínicas e biomecânicas de elásticos em Ortodontia. *Rev Clin Ortodon Dental Press* 2006;5:44-57.
33. Huget E, Patrick K, Nunez L. Observations on the elastic behavior of a synthetic orthodontic elastomer. *J Dent Res* 1990;69:496-501.
34. Henriques J, Hayasaki S, Henriques R. Elásticos ortodônticos: como selecioná-los e utilizá-los de maneira eficaz. *J Bras Ortodon Ortop Facial* 2003;8:471-475.
35. Martins MM, Mendes ÁdM, Almeida MAdO, Goldner MTdA, Ramos VF, Guimarães SdS. Estudo comparativo entre as diferentes cores de ligaduras elásticas. *Dental Press J Orthod* 2006;11:81-90.
36. de Souza EV, de Moraes Mendes A, de Oliveira Almeida MA, Quintão CCA. Percentual de degradação das forças liberadas por ligaduras elásticas 2008.
37. Brêtas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MAN. Effect of 0.4% stannous fluoride gel on Streptococci mutans in relation to elastomeric rings and steel ligatures in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;127:428-433.
38. Peixoto I. Avaliação de protocolos clínicos para desinfecção de aparelhos ortodônticos removíveis (cultura microbiana e MEV) [Dissertação] Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: University of São Paulo; 2007.
39. do Nascimento LEAG, Pithon MM, dos Santos RL, Freitas AOA, Alviano DS, Nojima LI et al. Colonization of Streptococcus mutans on esthetic brackets: self-ligating vs conventional. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;143:S72-S77.
40. Nelson-Filho P, Carpio-Horta KO, Andrucio MCD, Feres M, da Silva RAB, Paula-Silva FWG et al. Molecular detection of Aggregatibacter actinomycetemcomitans on metallic brackets by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;142:481-486.
41. Barker CS, Soro V, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Microbial contamination of "as received" and "clinic exposed" orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;143:317-323.
42. Socransky S, Smith C, Martin L, Paster B, Dewhirst F, Levin A. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-792.
43. Brunner E, Domhof S, Langer F. Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial designs. 1 ed. New York: Wiley-Interescience; 2002.
44. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent R. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
45. Jurela A, Repic D, Pejda S, Juric H, Vidakovic R, Matic I et al. The effect of two different bracket types on the salivary levels of S mutans and S sobrinus in the early phase of orthodontic treatment. *Angle Orthod* 2012;83:140-145.

46. Peros K, Mestrovic S, Anic-Milosevic S, Slaj M. Salivary microbial and nonmicrobial parameters in children with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2011;81:901-906.
47. Löe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1967;38:610-616.
48. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4:39-52.
49. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MPA, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;36:739-749.
50. Akgun OM, Altug H, Karacay S, Polat GG, Duyan S, Bedir O. Effect of 2 elastomeric ligatures on microbial flora and periodontal status in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2014;145:667-671.
51. Farghaly JG, Fachin LV, Otton R, Guaré RO, Leite MF. Effect of Gender on Dental Caries and Salivary Parameters of Children. *Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic* 2013;13:11-15.
52. Lara-Carrillo E, Montiel-Bastida N-M, Sánchez-Pérez L, Alanís-Tavira J. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15:e924-929.
53. Lukacs JR, Largaespada LL. Explaining sex differences in dental caries prevalence: Saliva, hormones, and "life-history" etiologies. *Am J Hum Biol* 2006;18:540-555.
54. Zotti F, Dalessandri D, Salgarello S, Piancino M, Bonetti S, Visconti L et al. Usefulness of an app in improving oral hygiene compliance in adolescent orthodontic patients. *Angle Orthod* 2015;86:101-107.

Apêndice

Materiais e Método

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Guarulhos. Descreve-se abaixo, detalhada, a técnica de biologia molecular aplicada em nosso estudo.

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 800 µL de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão contendo o DNA livre das bactérias presentes nas amostras dos bráquetes foi depositada em uma das canaletas do aparelho *Minislot-30* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA). As duas últimas das 30 canaletas do Minislot foram ocupadas por controles contendo uma mistura das sondas das espécies de micro-organismos investigados, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi então removida do *Minislot-30* e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos.

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% de caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) [1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15 M de citrato de sódio (J.T. Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0], 25 mM de fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura.

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter-45* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter-45* foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130µL de solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 x SSC, 20 mM de Na_2HPO_4 (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano

(Amersham) e 1% de caseína. Para a hibridização, aguardou-se um período mínimo de 20 horas, a 42°C.

Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter-45* (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente (solução tampão SSC a 0,4 M) composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20 mM de Na₂HPO₄, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução de bloqueio contendo 1% de ácido maléico (C₄H₄O₄, Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e , logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maléico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl, pH 9,5, para a remoção de excessos do anticorpo.

Para a detecção dos sinais de quimioluminescência a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent*. Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete de autorradiografia, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por, aproximadamente, 40 minutos. O filme foi revelado manualmente pelo método convencional tempo-temperatura, de acordo com orientações do fabricante, empregando soluções Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas à temperatura de 20°C.

Desta forma, foi obtido um filme radiográfico com os sinais de quimioluminescência, produzidos pela fosfatase alcalina, onde as linhas horizontais representam as amostras e as verticais as sondas de DNA, propiciando um formato de “tabuleiro de xadrez”.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador calibrado ($Kappa > 0,8$) e cego com relação aos grupos avaliados. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência dos resultados. Quando as leituras não foram coincidentes, foi realizada uma terceira leitura para aquela amostra. A intensidade de cada sinal produzido por uma determinada sonda na suspensão microbiana oriunda dos bráquetes foi comparada ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias.

A fim de facilitar a anotação dos resultados em fichas específicas, com relação aos microrganismos avaliados, foram empregados os seguintes escores:

- Escore 0: registrado quando não houve detecção de sinal de quimioluminescência;
- Escore 1: quando observou-se um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células;
- Escore 2: sinal equivalente a 10^5 células;
- Escore 3: sinal entre 10^5 e 10^6 células;
- Escore 4: sinal equivalente a 10^6 células; e
- Escore 5 : sinal equivalente a mais de 10^6 células.

Anexos

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: LIGADURAS ELASTOMÉRICAS ESTÉTICAS: CONTAMINAÇÃO MICROBIANA(CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION)

Pesquisador: Raquel Fernanda Bachiega Morelli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51117415.5.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.338.829

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente. O projeto de pesquisa em questão pretende analisar 4 diferentes marcas comerciais de ligaduras elásticas estéticas, o objetivo do presente estudo será avaliar, in vivo, após 30

dias na cavidade bucal: 1- a contaminação microbiana da saliva e das ligaduras empregando 40 sondas de DNA para diferentes espécies bacterianas, por meio da técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization.. A temática proposta é original e importante para a área da saúde humana.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A hipótese levantada no presente estudo será, quais microrganismos estarão presentes nas 4 diferentes marcas de ligaduras estéticas e quais irão contaminar mais.

Objetivo Primário: Analisar através da técnica do Checkerboard DNA-DNA Hybridization, as diferentes espécies bacterianas, presentes na saliva e ligaduras estéticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 1.338.829

O risco do paciente será baixo, e podemos enumerar a não adaptação ao aparelho ortodôntico e ligaduras, assim como na fase de colagem do

aparelho ortodôntico, possíveis traumas em sua mucosa, (aftas), o que corresponde à adaptação natural dos braquetes em sua cavidade bucal. Caso aconteça algum problema, os pesquisadores se responsabilizam para solucionar o problema.

Benefícios: Os benefícios enumerados são: realização do tratamento ortodontico, instruções de higiene e cuidados mensais a cada volta do paciente à clínica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, pesquisadores habilitados, projeto bem descrito, com referências atuais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta orçamento detalhado, cronograma adequado, TCLE claro, objetivo e explicativo, garante todos os direitos aos participantes.

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 186ª Reunião Ordinária do CEP, realizada em 25/11/2015.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_539348.pdf	19/11/2015 10:29:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ligaduras_esteticas.doc	10/11/2015 14:15:04	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_LABORATORIO.pdf	10/11/2015 14:08:54	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_CLINICA.pdf	10/11/2015 14:08:36	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Termo_Assentimento.doc	10/11/2015 14:03:52	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 1.338.829

Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento.doc	10/11/2015 14:03:52	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Raquel_para_maiores_final.doc	10/11/2015 13:59:40	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PAIS_Final.doc	10/11/2015 13:58:22	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito
Folha de Rosto	scan0001.pdf	10/11/2015 13:53:07	Raquel Fernanda Bachiega Morelli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Novembro de 2015

**Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)**

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL - ORTODONTIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Eu, Raquel Fernanda Bachiega Morelli, mestrande da Universidade de São Paulo (FORP/USP), responsável pelo projeto **“LIGADURAS ELASTOMÉRICAS ESTÉTICAS: CONTAMINAÇÃO MICROBIANA (CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION)”**, convido você _____, bem como seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados _____ a participar do referido projeto de pesquisa, que será realizado sob orientação da Profª. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto e do Prof. Dr. Paulo Nelson Filho na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP). Este termo consta de 2 vias idênticas, que serão assinadas por todos os pesquisadores e por você. Uma via ficará com você e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Este trabalho tem como objetivo avaliar após 30 dias na boca se aconteceu uma contaminação microbiana da saliva e nos elásticos do aparelho fixo que ficam no aparelho. Para tanto será necessário que o seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados comparecer duas vezes na Clínica II, sendo que na primeira consulta, será feita a coleta da saliva sem o aparelho ortodôntico instalado, e após sua instalação, 30 dias, nova coleta de saliva e dos elásticos.

Você e seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados terão de comparecer à Clínica II da FORP/USP, durante o período das consultas periódicas do tratamento ortodôntico. Você está sendo esclarecido que esta pesquisa pode oferecer riscos mínimos, pois o uso de qualquer aparelho para os dentes pode causar reabsorção da raiz e retração da gengiva, mas caso ocorra algum desses riscos ou qualquer outro relativo ao uso do aparelho, nós, os pesquisadores, seremos responsáveis pelo tratamento. O uso do aparelho poderá causar algum desconforto, como dificuldade para se alimentar e traumas na mucosa, nos primeiros dias.

Rubrica do responsável

Rubrica do pesquisador

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL - ORTODONTIA**

O seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados terá como benefício correção da sua mordida, uma melhora na posição da língua, mastigação, deglutição dos alimentos e estética. A participação do seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados nesta pesquisa é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. Não será oferecido nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa, mas caso necessário será pago o transporte de ônibus municipal e alimentação para o comparecimento na FORP, sendo que, todo o atendimento ao seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados será gratuito. A identidade do seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados será mantida em segredo, mas ele participando da pesquisa, você autorizará que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte de nós, pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a privacidade.

Você terá total liberdade para pedir maiores esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento da pesquisa. Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Raquel Fernanda Bachiega Morelli – Avenida do Café S/N – Departamento de Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Tel: (16) 3315.3995. Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do CEP/FORP/USP ((16) 3315-0493 - Horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira, devendo conter seu nome que será mantido em sigilo. A participação de vocês não é obrigatória, e vocês poderão desistir a qualquer momento, retirando sua autorização. A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo ao seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados, bem como a sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Eu _____, portador do RG _____, CPF _____, residente a _____, número _____, na cidade de _____ no Estado _____, Telefone _____. Declaro que li compreendi e concordo com o presente Termo, por isso assino este documento de livre e espontânea vontade.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do responsável direto pelo participante de pesquisa

Raquel Fernanda B. Morelli
CPF: 255.061.318-01
Pesquisador responsável.

Dra. Mirian A. Nakane Matsumoto
CPF: 039.580.618-69
Pesquisador Orientador.

Dr. Paulo Nelson Filho
CPF: 156.200.398-46
Pesquisador Orientador.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL – ORTODONTIA**

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você, _____ está sendo convidado (a) por mim, Raquel Fernanda Bachiega Morelli, mestranda da Universidade de São Paulo (FORP/USP), responsável pelo projeto, "**LIGADURAS ELASTOMÉRICAS ESTÉTICAS: CONTAMINAÇÃO MICROBIANA (CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION)**", a concordar em participar da pesquisa. Este papel tem duas vias idênticas (folhas iguais), que será assinada por você, pelo seu responsável legal e por mim. Uma via (folha) ficará com você e a outra será guardada por mim.

Esta pesquisa quer saber se a sua saliva e os elásticos do aparelho durante 30 dias estão funcionando e limpos de forma certa.

Você e o seu responsável legal virão a Clínica de Ortodontia da Faculdade 2 vezes (primeira consulta e após 30 dias), para coleta da saliva e dos elásticos. Se você quiser participar neste projeto de pesquisa, seu responsável também terá que concordar. Mas se você não quiser, mesmo que seu responsável concorde, você poderá falar não quero. Você pode conversar com seu responsável antes de decidir se quer ou não participar. Pode ter algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais, porque você ficou interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare, a qualquer momento, e explique novamente. Ninguém ficará bravo com você se você disser não; a escolha é sua.

Esta pesquisa não machuca, não causa dor e não causa danos. Poderá haver apenas o desconforto durante a adaptação do aparelho na boca. A sua participação é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. O seu nome, bem como o do seu responsável serão mantidas em segredo, mas participando da pesquisa você autoriza que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a privacidade de vocês.

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Raquel Fernanda Bachiega Morelli) – Avenida do Café S/N – Departamento de Clínica Infantil, Ortodontia – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Tel: (16) 3315.3995. Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do CEP/FORP/USP (16- 3315-0493 - Horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira), devendo conter seu nome que será mantido em sigilo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____.

Nome do responsável legal: _____.

Assinatura e CPF: _____.

Nome da criança ou adolescente: _____.

Assinatura: _____.

Raquel Fernanda Bachiega Morelli
CPF: 255.061.318-01
Pesquisadora responsável