

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARÍLIA TEIXEIRA COSTA

**AVALIAÇÃO MICROBIANA DAS MANCHAS DENTÁRIAS
EXTRÍNSECAS NEGRAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A
TRATAMENTO ORTODÔNTICO**

**Goiânia
2011**

MARÍLIA TEIXEIRA COSTA

**AVALIAÇÃO MICROBIANA DAS MANCHAS DENTÁRIAS
EXTRÍNSECAS NEGRAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A
TRATAMENTO ORTODÔNTICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta
Co-orientador:
Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro-Dias

**Goiânia
2011**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno(a): Marília Teixeira Costa

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta

Co-Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro-Dias

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro-Dias

2. Prof^a. Dr^a. Cerise de Castro Campos

3. Prof^a. Dr^a. Cristyane Gonçalves Benício Bastos Rocha

4. Prof. Dr. Cláudio de Gois Nery

5. Prof. Dr. João Batista de Souza

Suplentes:

1. Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro

2. Prof^a. Dr^a. Míriam Leandro Dorta

Data: 04/07/2011

*Dedico este trabalho às minhas três “fadas-madrinhas” maravilhosas:
Fabiana, Fátima e Míriam.*



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela maravilhosa oportunidade de viver com saúde e gozar de tantos momentos felizes.

*À Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta pela confiança em mim depositada.
Obrigada por acreditar e viabilizar este projeto.*

Às professoras Dr^a. Fátima Ribeiro-Dias e Dr^a. Miriam Leandro Dorta. Pessoas importantíssimas na minha formação. Exemplos de dedicação, profissionalismo e, acima de tudo, amizade. Guiaram com muito carinho meus passos. Obrigada de coração!

*A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde –
Faculdade de Medicina/UFG, em especial à secretária Valdecina Quirino
Rodrigues, querida “Val”.*

Agradeço a colaboração de profissionais e amigos no encaminhamento dos pacientes para esta pesquisa, em especial: Dr^a. Cerise Castro Campos, Dr^a. Elaine Andrade Gomes Rosa, Dr^a. Helen Cristina Barbosa, Dr^a. Maria Ermínia Arruda, Dr^a. Maria Cristina Tavares Landeiro, Dr^a. Rosineide Santos Amorim Brito.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia e de Imunologia Celular do IPTSP, em especial à Nathália Ferreira Lima e aos professores: Dr^a. Lara Stefânia Netto de Oliveira Leão e Dr. André Kipnis.

Agradeço aos familiares e amigos que sempre torceram por mim. Em especial ao Prof.Dr. Marcos Vinícius Moreira de Castro (querido Marquim), que, na reta final, foi meu grande apoio e incentivador.

Em especial, à minha filha Letícia, razão do meu viver! Perdoa-me pelas horas que tive que ausentar-me para dedicar a este trabalho. Você é o meu grande estímulo para melhorar!

***“Quando a gente pensa que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas.”***

Mario Quintana

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	x
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivo Específico	26
3. MÉTODO(S)	
3.1. Obtenção das amostras	27
3.2. Coleta das amostras	28
3.3. Identificação das bactérias pela técnica da <i>multiplex</i> PCR	28
3.4. Análises estatísticas	31
4. RESULTADOS	
4.1. Frequências das bactérias detectadas nos biofilmes dos pacientes com e sem manchas extrínsecas negras.	32

4.2. Avaliação da composição bacteriana detectada nos biofilmes de pacientes com e sem manchas extrínsecas negras.	33
4.3. Avaliação da influência do uso de aparelho ortodôntico na composição bacteriana detectada nos biofilmes de pacientes com e sem manchas extrínsecas negras.	36
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	53
ANEXO	58

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

- Tabela 1 Sequência dos iniciadores para a detecção de *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces* spp e *S. mutans*.
- Tabela 2 Detecção de bactérias no biofilme de pacientes com manchas (Grupo I) e de pacientes sem manchas (Grupo II) dentárias extrínsecas negras.
- Tabela 3 Detecção de bactérias no biofilme de pacientes com manchas (Grupo I) e de pacientes sem manchas (Grupo II) dentárias extrínsecas negras subdivididos quanto a presença ou não de aparelhos ortodônticos fixos instalados nos pacientes.
- Figura 1 Manchas dentárias extrínsecas negras em diferentes superfícies dos dentes permanentes.
- Figura 2 Perfil de bactérias detectadas nas amostras positivas de pacientes com manchas (A) e sem manchas extrínsecas negras (B).
- Figura 3 Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes sem aparelho ortodôntico e com manchas dentárias extrínsecas negras.

- Figura 4 Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes sem aparelho ortodôntico e sem manchas dentárias extrínsecas negras.
- Figura 5 Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes com aparelho ortodôntico e com manchas dentárias extrínsecas negras.
- Figura 6 Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes com aparelho ortodôntico e sem manchas dentárias extrínsecas negras.
- Apêndice 1 Termo de consentimento Livre e Esclarecido
- Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CEPMHA)

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

PCR	Reação em cadeia da polimerase
BPN	Bactérias pigmentadoras de negro
CEPMHA	Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás
CONEP	Conselho Nacional de Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
pb	Pares de base
μ L	Microlitros
mM	Milimolar
M	Molar
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
NaCl	Cloreto de Sódio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal

RESUMO

As manchas dentárias extrínsecas negras aparecem nas superfícies lisas dos dentes, paralelas à gengiva marginal, e são consideradas uma forma de biofilme dentário devido ao grande conteúdo de cálcio, fosfato e sal insolúvel de ferro. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil bacteriano dos biofilmes dentários de pacientes portadores ou não de manchas dentárias extrínsecas negras, com ou sem aparelho ortodôntico metálico fixo instalado. Para isto foi utilizada a técnica de *multiplex* PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para investigar a presença das bactérias pigmentadoras de negro: *Prevotella nigrescens* e *Prevotella intermedia* e as bactérias não pigmentadoras de negro: *Streptococcus mutans* e *Actinomyces* spp nos biofilmes. A amostra consistiu de 52 pacientes, 25 do gênero feminino e 27 do gênero masculino. A amostra foi dividida em dois grupos: Grupo I: 26 pacientes portadores de manchas e Grupo II: 26 pacientes não portadores de manchas. Do total da amostra, 20 pacientes estavam sob terapia ortodôntica fixa, utilizando bráquetes de aço inoxidável. Os resultados mostraram que tanto no grupo I, quanto no grupo II, em 61,5% dos pacientes foi detectada pelo menos uma das bactérias investigadas. *P. nigrescens* foi a bactéria mais frequentemente detectada no Grupo I (30,8%) e no Grupo II (46,1%), enquanto *P. intermedia* foi detectada em 3,8% no Grupo I e 11,5% no Grupo II. As bactérias não pigmentadoras de negro foram encontradas em frequências similares nos Grupos I e II (19,2% versus 11,5% para *Actinomyces* spp e 23,1% versus 30,7% para *S. mutans*). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparando as frequências de cada bactéria entre os grupos, indicando que os perfis bacterianos são similares entre pacientes que apresentam e os que não apresentam manchas extrínsecas negras. Quando analisadas as frequências das bactérias nos biofilmes nas manchas dentárias extrínsecas negras dos pacientes portadores de aparelho ortodôntico, os resultados indicaram que o aparelho não alterou a frequência das bactérias encontradas, porém, foi observada redução significativa das associações entre as diferentes bactérias no biofilme das manchas extrínsecas negras ($p < 0,05$).

Palavras chaves: Bactérias pigmentadoras de negro, PCR, manchas dentárias negras, aparelhos ortodônticos

ABSTRACT

Black extrinsic tooth stains appear on the smooth surfaces of teeth, parallel to the marginal gum and are considered a specific form of biofilm due to the high content of calcium, phosphate and insoluble iron salt. This study evaluated the profile of bacterial biofilms in patients with black extrinsic tooth stain with or without fixed metal braces installed. Four bacteria were investigated using conventional multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction), black-pigmented bacteria: *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* and non pigmented bacteria: *Streptococcus mutans* and *Actinomyces* spp. The study enrolled 52 patients, 25 females and 27 males. They were divided into two groups: Group I: 26 patients with black extrinsic tooth stains and Group II: 26 without stains. Twenty patients had fixed orthodontic brackets of stainless steel. The results showed that in both group (I and II) 61.5% of patients had at least one of the bacteria investigated. The *P. nigrescens* was the most frequently bacteria detected [Group I (30.7%) and Group II (46.1%)], *P. intermedia* was detected in 3.8% in Group I and 11.5% in Group II. The non pigmented bacteria were found in similar rates in Groups I and II, 19.2% vs 11.5% for *Actinomyces* spp and 23.1% vs 30.7% for *S. mutans*. There were no statistically significant differences when comparing the frequencies of each bacterium between groups, indicating that bacterial profiles were similar between patients with or without black extrinsic stains. When analyzed the frequencies of bacteria in the biofilm in black extrinsic tooth stain in patients with braces results indicated that it did not alter the frequency of bacteria found, however, it was observed that the presence of fixed orthodontic appliance significantly reduces the associations between bacteria in the biofilm of black extrinsic stains ($p < 0.05$).

Key words: Black pigmented bacteria, PCR, black extrinsic tooth stains, orthodontics braces.

1 INTRODUÇÃO

A boca apresenta uma microbiota altamente complexa, contendo uma variedade de espécies de microrganismos que, em condições ecológicas, encontra-se em equilíbrio entre si e também com o seu hospedeiro. Porém, alterações intrínsecas e extrínsecas no ecossistema bucal podem levar à modificação da microbiota, favorecendo o desequilíbrio, o que pode resultar em uma infecção (PINHEIRO; PINHEIRO; SILVA FILHO, 1991; HARDIE, 1992).

Manchas extrínsecas negras que aparecem nas superfícies dentárias têm despertado especial interesse devido aos problemas estéticos que causam. A remoção destas manchas não é possível através da rotina doméstica de higiene bucal, pois, requer a limpeza feita pelo profissional de Odontologia, incluindo raspagem e polimento (RONAY; ATTIN, 2011). Estas manchas são caracterizadas por pontos escuros distintos, localizados nas superfícies lisas dos dentes, mais frequentemente paralelas à gengiva marginal (Figura 1). Este tipo particular de pigmentação é considerado uma forma específica de biofilme dentário que difere dos outros tipos porque contém um sal insolúvel de ferro e grande conteúdo de cálcio e fosfato (THEILADE *et al.*, 1973; REID *et al.*, 1977; SMALLEY *et al.*, 2003).

Os estudos para investigar a etiologia das manchas dentárias extrínsecas negras datam desde a década de 50. Leung (1950), Mellanby (1957) realizaram estudos nos Estados Unidos e Inglaterra, respectivamente, e

citaram os primeiros relatos de correlação entre a baixa prevalência de cáries com as manchas dentárias extrínsecas negras. Posteriormente, outros estudos também determinaram a correlação positiva entre a presença de manchas e a baixa prevalência de cárie (REID; BEELEY; MACDONALD, 1977; KOCH *et al.*, 2001; GASPARETTO *et al.*, 2003) e outros descreveram a estrutura (THEILADE *et al.*, 1973), as características da microbiota predominante nestas manchas (SLOTS, 1974) e análises bioquímicas (REID; BEELEY; MACFARLANE, 1976). Entretanto, a etiologia das manchas negras e os fatores que influenciam o seu aparecimento, permanência e controle são, ainda, temas controvertidos na literatura.



Figura 1: Manchas dentárias extrínsecas negras em diferentes superfícies dos dentes permanentes.
Fonte: a autora, 2011.

A prevalência das manchas dentárias extrínsecas negras no Brasil, encontrada por Gasparetto *et al.* (2003), foi de 14,8%, comparável a prevalência no grupo de crianças filipinas que foi de 16,0% (HEINRICH-WELTZIEN; MONSE; van PALENSTEIN, 2009). Koch *et al.* (2001), que avaliaram crianças italianas, encontraram uma prevalência de 6,3% enquanto Gallardo e Cencillo (2005) encontraram uma prevalência de 7,5% entre as crianças espanholas estudadas. Pouca informação pode ser encontrada sobre a sua prevalência na população adulta, embora, as manchas negras podem ocorrer em qualquer idade, tanto na dentição decídua como na permanente (RONAY; ATTIN, 2011). Nos trabalhos publicados por Koch *et al.*(2001) e Gallardo e Cencillo (2005) não foram encontradas nenhuma diferença na prevalência entre os gêneros masculino e feminino.

Ao estudar a ultra-estrutura das manchas negras presentes no biofilme de dentes decíduos em uma amostra de dez crianças, empregando microscopia eletrônica, Theilade, Slots e Fejerskov (1973) demonstraram que estes depósitos consistiam de microrganismos envolvidos por uma matriz microbiana de densidade variável e que, a maioria dos microrganismos eram Gram-positivos filamentosos, uma característica importante da mancha negra que a difere do biofilme dentário. Em um trabalho realizado em Hong Kong (China), utilizando 11 pacientes adultos, Theilade e Pang (1987) observaram que as manchas apresentavam duas camadas distintas: uma camada interna, calcificada, amarela e opaca e uma externa, contendo os microrganismos. A camada bacteriana externa era composta de microrganismos filamentosos, Gram-positivos, depositados perpendicularmente à superfície do esmalte,

exibindo uma aparência típica de placa dentária. A porção próxima ao esmalte continha uma substância indicativa de calcificação. Concluíram que a mancha negra é um tipo especial de biofilme caracterizada por uma microbiota bacteriana específica com tendência à calcificação e não pode ser facilmente removida sem a assistência do profissional.

Análises bioquímicas destas manchas indicam que não existe diferença quanto a quantidade de carboidratos ou proteínas encontrados no biofilme das manchas negras, porém, foi observado que o biofilme do grupo de indivíduos com manchas houve maior conteúdo de cálcio e fosfato do que o biofilme do grupo sem manchas (REID; BEELEY, 1976). Em outro trabalho, Reid, Beeley e MacDonald (1977) sugeriram que o pigmento encontrado nas manchas dentárias extrínsecas negras fosse um componente férrico insolúvel preto, provavelmente sulfeto férrico, produzido pela microbiota periodontal a partir de íons férricos provenientes da saliva ou do exsudato gengival.

A avaliação bacteriana para determinar a microbiota predominante das manchas negras apresenta resultados bem variados, devido às diferentes metodologias utilizadas (THEILADE; SLOTS; FEJERSKOV, 1973; REID; BEELEY; MACDONALD, 1977). Slots (1974) realizou um estudo microbiológico qualitativo e quantitativo em uma amostra de 11 crianças, entre três e cinco anos de idade e concluiu que a microbiota encontrada nas manchas negras era predominantemente (90,0%) de bactérias Gram-positivas, anaeróbias, catalase negativa e nestes foi identificado o gênero *Actinomyces*. Cocos Gram-positivos, anaeróbios, catalase negativa, foram classificados como *Streptococcus* e compreendiam apenas 5,0% dos microrganismos cultivados. As bactérias

Gram-negativas, anaeróbias, foram identificadas como *Bacteroides melaninogenicus* (1,0%), as quais, não tinham importância na determinação da cor da mancha. Também cocos Gram-negativos, anaeróbios, catalase positiva, foram detectados, principalmente espécies de *Neisseria* (4,0%). Baseado nos resultados encontrados constatou-se que as manchas negras apresentavam uma microbiota característica e relativamente estável, com predomínio de actinomicetos.

Saba *et al.* (2006), se propuseram a investigar *Actinomyces* spp, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella melaninogenica* como possíveis agentes envolvidos na formação das manchas negras presentes na superfície externas de dentes decíduos e permanentes. Utilizaram a técnica de PCR para a detecção dos genes bacterianos e concluíram que *P. gingivalis* e *P. melaninogenica* não estavam presentes nas manchas negras e *Actinomyces* foi detectado em 50,0% das amostras, sendo sugerido que esta bactéria poderia estar envolvida no processo da pigmentação.

A produção de pigmentos negros por bactérias tem sido analisada e associada às diferentes maneiras com que essas bactérias formam colônias negras em diferentes meios de cultura. As bactérias que produziam colônias pigmentadas de negro quando cultivadas em meio ágar-sangue receberam, inicialmente, o nome de *Bacterium melaninogenicum* e posteriormente foram descritas como bactérias pigmentadoras de negro (BPN) (DUERDEN, 1974; REID; BEELEY; MACFARLANE, 1976; HARDING *et al.*, 1976; VAN WINKELHOFF *et al.*, 1988).

As BPN são bactérias anaeróbias, Gram-negativas, imóveis, apresentando a forma de bastonetes pleomórficos não produtores de esporos e também estão presentes na cavidade bucal (YOSHIDA *et al.*, 2005). Já foram associadas a várias formas de doença periodontal (ASHIMOTO *et al.*, 1996; CORTELLI *et al.*, 2008), infecções de origem endodôntica (SEOL *et al.*, 2006; TOMAZINHO; ÁVILA-CAMPOS, 2007) e com manchas dentárias extrínsecas negras (SLOTS, 1974; SABA *et al.*, 2006). Dentre as BPN, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* têm sido reconhecidas como dois genótipos de *P. intermedia* (genótipo I corresponde a *P. intermedia* e genótipo II a *P. nigrescens*) (YOSHIDA *et al.*, 2005). *P. intermedia* está associada às periodontites, enquanto *P. nigrescens* é uma bactéria comensal do sulco gengival e do biofilme supragengival. Estas espécies são dependentes da porção heme da hemoglobina que atua como fonte de ferro para a sua multiplicação (SOUKOS *et al.*, 2005). O estudo de Guan *et al.* (2004) demonstrou que *P. nigrescens* expressa proteínas de superfície específicas para se ligar a hemoglobina. Guan *et al.* (2006) afirmaram que *P. intermedia* pode degradar a hemoglobina. Esta degradação proteolítica, em pH ácido, expõe o grupo heme da hemoglobina e o ferro é liberado e sequestrado. O acúmulo do ferro monomérico insolúvel Fe(III)PPIX.OH na superfície da bactéria aparece como um pigmento preto que age como uma barreira contra o oxigênio, protegendo a bactéria e funcionando como um importante fator de virulência (SMALLEY *et al.*, 2003). Os estudos de Smalley *et al.* (2003), Guan *et al.* (2004, 2006), Yoshida *et al.* (2005), Soukos *et al.* (2005) permitiram avanços nas linhas de pesquisa para a análise das manchas dentárias

extrínsecas negras, embasadas na capacidade das BPN de acumular o íon de ferro na superfície de sua membrana. Ainda não foi evidenciado, na literatura, o papel das bactérias *P. nigrescens* e *P. intermedia* diretamente nas manchas dentárias extrínsecas negras.

A presença das manchas dentárias extrínsecas negras foi correlacionada à baixa prevalência de cáries nos indivíduos portadores de manchas. Isto foi atribuído ao aumento das concentrações dos níveis de cálcio e fosfato nestes biofilmes o que contribuiria impedindo eventos de desmineralização do esmalte dentário, pois, os altos níveis de cálcio e fosfato elevariam a capacidade tampão da saliva destes indivíduos (REID; BEELEY, 1976; FRANCO; ISSAO, 1990). Slots (1974) encontrou apenas 5,0% de estreptococos nas manchas negras, confirmando ser este um tipo de biofilme de baixo risco cariogênico. Estes dados são corroborados por Koch *et al.* (2001) que estudaram a prevalência de cáries em crianças escolares com e sem manchas dentárias extrínsecas negras e concluíram que existe uma correlação negativa entre o aparecimento das manchas negras e cáries na dentição permanente. Isto reforçaria a hipótese de que a mancha dentária extrínseca negra pode ser fator de proteção contra cárie.

Estudos das manchas dentárias extrínsecas negras já foram realizados no Brasil. Alguns autores (BASTOS; GALAN JR., 1992; COSTA *et al.*, 1997; ROSA *et al.*, 2002; GASPARETTO *et al.*, 2003; ARRUDA *et al.*, 2003) observaram uma correlação positiva entre a presença de manchas negras e o baixo índice de cárie dental, enquanto outros autores (CALDAS; MIALHE; SILVA, 2008) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre

os índices de cárie quando compararam um grupo que apresentava manchas e um grupo controle. A razão destes resultados não está muito clara na literatura, mas, especula-se que esteja relacionada a uma microbiota específica dos indivíduos portadores das manchas dentárias extrínsecas negras (RONAY; ATTIN, 2011).

Sabe-se que a dificuldade de higienização e remoção do biofilme dentário pode alterar a microbiota bucal, favorecendo o desequilíbrio entre os microrganismos e o hospedeiro. Os pacientes submetidos à terapia ortodôntica fixa são expostos a uma grande quantidade de componentes do aparelho ortodôntico, que propiciam um aumento de superfícies adicionais, facilitando a retenção mecânica dos alimentos e o acúmulo de biofilme bacteriano. Estudos sobre a alteração da microbiota bucal, principalmente em pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo, têm sido realizados (BLOOM; BROWN JR., 1964; PINHEIRO; PINHEIRO; SILVA FILHO, 1991; CAMPBELL, 2003; KITADA, TOLEDO; OHO, 2009). Bloom e Brown Jr. (1964) detectaram um aumento no total de microrganismos anaeróbios, aeróbios, estreptococos, veillonelas, lactobacilos e estafilococos, após a instalação dos aparelhos ortodônticos. Campbell (2003) avaliando a dinâmica de colonização dos microrganismos bucais em 12 pacientes, antes e após a instalação do aparelho ortodôntico fixo, concluiu que a presença dos acessórios ortodônticos promoveu um aumento significativo no número de colônias de estreptococos e lactobacilos e houve uma alteração quantitativa de leveduras do gênero *Candida*. Já no trabalho de Kitada, Toledo e Oho (2009) foram estudadas a presença de bactérias e fungos oportunistas na cavidade bucal dos pacientes ortodônticos. Foram analisados

58 pacientes (grupo ortodôntico: 42 e grupo controle: 16) sendo que, 16 pacientes do grupo ortodôntico e um do grupo controle apresentaram pelo menos um dos microrganismos estudados (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*). Notaram que houve um aumento de bactérias e fungos oportunistas na cavidade bucal dos pacientes ortodônticos e ressaltaram a importância dos cuidados com a higiene destes pacientes para a prevenção das doenças periodontais e o agravamento de doenças sistêmicas, principalmente nos pacientes imunocomprometidos.

Não foram encontrados trabalhos que investigassem a microbiota dos pacientes portadores de aparelhos ortodônticos e portadores de manchas dentárias extrínsecas negras, simultaneamente. Alguns trabalhos sugerem que os produtos da corrosão dos aparelhos ortodônticos metálicos, em contato com o biofilme dentário, podem causar mudanças neste meio (HWANG; SHIN; CHA, 2001; COSTA *et al.*, 2007) ou ficar depositados na superfície dos materiais metálicos (KOCIJAN; MILOSEV, 2003). O papel destes produtos liberados, a partir da corrosão dos metais dos aparelhos ortodônticos, sobre o aparecimento e manutenção as manchas dentárias extrínsecas negras ainda não foi investigado. Embora Gorlin e Goldman (1970) tenham classificado as manchas dentárias extrínsecas nas categorias metálicas e não metálicas, não são todos os metais que causam pigmentações extrínsecas negras (NATHOO, 1997). Segundo Nathoo (1997), íons de cobre, níquel e ferro são capazes de aderir na

superfície externa dos dentes pigmentando estas superfícies de castanho, negro ou verde.

Vários métodos laboratoriais têm contribuído para o esclarecimento das diferentes etiopatogenias bucais. A maioria consiste de técnicas caras, demoradas e trabalhosas. A PCR baseia-se na amplificação de um fragmento de um gene do DNA, sendo ideal para identificação de microrganismos de espécimes clínicos, pois não requer o cultivo da bactéria, o que é uma vantagem, principalmente para o estudo de espécies anaeróbias, cujo cultivo é difícil e requer o processamento em ambiente com reduzida concentração de oxigênio. A PCR apresenta a vantagem de poder ser empregada em amostras contendo microrganismos viáveis, mortos ou lisados. Quando comparados os resultados da PCR com os dos métodos convencionais de cultura microbiana, os ensaios da PCR são mais rápidos, sensíveis e precisos na detecção dos patógenos (SEOL; CHO; CHUNG *et al.* 2006). Nas pesquisas odontológicas, a PCR têm sido usada para detectar os agentes envolvidos na etiologia de várias doenças como: cárie dental (GALAVIZ; MEDINA; GARCIA, 2002), doença periodontal (ASHIMOTO *et al.*, 1996; SAKAI *et al.*, 2007), infecções endodônticas (TOMAZINHO; ÁVILA-CAMPOS, 2007) e câncer bucal (JORDAN *et al.*, 2001). A PCR apresentou maior sensibilidade na detecção das bactérias anaeróbias pigmentadoras de negro (*P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*) em pacientes com lesões periapicais crônicas (TOMAZINHO; ÁVILA-CAMPOS, 2007) e na investigação dos microrganismos envolvidos na formação das manchas negras na dentadura mista (SABA *et al.*, 2006).

A associação e a interação microbiana para o desenvolvimento do biofilme na cavidade bucal é um processo complexo, que segundo Jakubovics (2010), assemelha-se a uma mini-cidade. A troca de mensagens, na forma de moléculas sinalizadoras e metabólitos, é importante para a manutenção do biofilme. O entendimento das adaptações pelas quais as bactérias passam para sobreviver nas comunidades de espécies mistas, como no biofilme dentário, abre novos caminhos para o controle dos biofilmes microbianos. As manchas dentárias extrínsecas negras podem ter diversas etiologias e fatores ainda não completamente entendidos, como: a associação bacteriana heterogênea na forma de biofilme e as condições bucais do hospedeiro envolvidos no desenvolvimento e manutenção das manchas negras são tópicos importantes a serem investigados.

A utilização de técnicas mais específicas e sensíveis, como a PCR, seria um recurso de grande contribuição para a identificação das espécies das bactérias envolvidas na etiopatogenia destas manchas. A possibilidade de que os aparelhos ortodônticos fixos possam exercer alguma influência na colonização da cavidade bucal por microrganismos associados às manchas dentárias extrínsecas negras também deve ser investigado. A elucidação dos fatores que podem influenciar a colonização de microrganismos na superfície dentária e na cavidade bucal é muito importante para o entendimento do aparecimento e manutenção das manchas dentárias extrínsecas negras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil bacteriano das manchas dentárias extrínsecas negras em pacientes com ou sem aparelho ortodôntico metálico fixo instalado.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

2.2.1. Investigar, pela técnica de *multiplex* PCR, a presença das bactérias pigmentadoras de negro: *Prevotella nigrescens* e *Prevotella intermedia* e das bactérias: *Streptococcus mutans* e *Actinomyces* spp nas manchas dentárias extrínsecas negras de pacientes com ou sem aparelho ortodôntico metálico fixo.

3 MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Fizeram parte deste estudo, 52 pacientes voluntários, na faixa etária de nove a 50 anos, 25 do gênero feminino e 27 do gênero masculino. A amostra foi dividida em dois grupos de acordo com a presença das manchas dentárias extrínsecas negras, sendo: Grupo I: 26 pacientes portadores de manchas e Grupo II: 26 pacientes não portadores de manchas dentárias extrínsecas negras (grupo controle). Dos 52 pacientes participantes da pesquisa, 20 pacientes estavam sob terapia ortodôntica fixa utilizando bráquetes de aço inoxidável, em atendimento na cidade de Goiânia, Goiás.

Como critério de inclusão na pesquisa exigiu-se:

- 1) Boas condições gerais de saúde;
- 2) Não fumante;
- 3) Não fazer uso de antimicrobianos nos últimos três meses;

Como critério de exclusão:

- 1) Não fazer, ou ter feito, ingestão de sulfato ferroso nos últimos três meses;
- 2) Indivíduos que tenham se submetido à clareação dental recentemente (menos de três meses);

O protocolo de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CEPMHA) (nº 033/2009) atendendo à Resolução 196/96 (Anexo 1). As coletas das amostras foram obtidas após assinatura do termo de consentimento informado (Apêndice 1).

3.2. COLETA DA AMOSTRA

Utilizando-se curetas autoclavadas, as amostras do biofilme bacteriano foram colhidas do terço cervical das superfícies vestibulares e/ou linguais dos dentes com manchas (Grupo I) e terço cervical das vestibulares dos dentes sem manchas (Grupo II). Não foi realizado nenhum procedimento de profilaxia ou limpeza prévia à coleta. As amostras foram transferidas para tubos plásticos contendo 500 μ L de solução salina e armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA. As coletas foram realizadas por um único pesquisador (a autora) no período de 12 meses.

3.3. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS PELA TÉCNICA DA MULTIPLEX PCR

A detecção de bactérias pela técnica da multiplex PCR foi realizada de acordo com Seol *et al* (2006). O DNA genômico foi extraído utilizando o illustra™blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK.). Foi feita a extração do DNA de *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *Actinomyces* spp e *S. mutans* para controle da reação.

Para a extração do DNA as amostras do biofilme bacteriano estocadas à -20° C foram descongeladas em banho de gelo, à temperatura ambiente. O protocolo de utilização do *illustra™blood genomicPrep Mini Spin Kit* consistiu em cinco passos: 1- Lise celular: Dez microlitros de Proteinase K e 200 μ L de tampão de lise tipo10 foram adicionados à amostra, que foi vigorosamente homogeneizada por dez segundos e posteriormente agitada por dez minutos (Agitador Evlab - modelo EVOTE. Londrina-PR, Brasil). 2- Ligação do DNA genômico na coluna: As amostras foram colocadas em uma minicoluna e em tubo coletor que posteriormente foram centrifugadas por um minuto a 11.000 x g. O sobrenadante foi descartado. 3- Lavagem: Trezentos microlitros de tampão de lise tipo 10 foram adicionados à minicoluna que foi centrifugada por um minuto a 11000 x g. Novamente o sobrenadante foi descartado. 4- Lavagem e secagem: Trezentos microlitros de tampão de lavagem foram adicionados à minicoluna que foi centrifugada por três minutos a 11.000 x g. O sobrenadante foi descartado. 5- Eluição: Cem microlitros de tampão de eluição cinco, pré aquecido a 70° C, foi adicionado à minicoluna que foi centrifugada por um minuto a 11.000 x g. O eluato contendo o DNA genômico foi coletado e estocado a -20° C.

A PCR para detecção microbiana foi realizada após o preparo dos reagentes específicos (Mix) para *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *Actinomyces* spp e *S. mutans*, sendo que para cada amostra analisada o Mix foi composto por: 2,5 μ L de solução tampão PCR 10X (Invitrogen, Carsbad, CA, EUA), 1,75 μ L de solução de cloreto de magnésio 50 mM (MgCl₂) (Invitrogen, Carsbad, CA, EUA),

0,5 μL de dNTP 10 mM (DNA Polymerization Mix – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,0 μL de cada um dos iniciadores (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) específicos para os microrganismos estudados (Tabela 1), 0,2 μL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 13,55 μL de água ultra-pura. O volume total de cada reação foi de 25,0 μL , sendo 22,5 μL da mix e 2,5 μL de DNA extraído de cada amostra. Os controles positivos de DNA genômico usados em cada experimento foram: *S. mutans* (ATCC 35668), *P. nigrescens* (ATCC 35406), *P. intermedia* (ATCC 25611) e *Actinomyces* spp (B19SC). Como controle negativo foram utilizados 25 μL do Mix.

Os tubos foram acondicionados em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany), seguindo o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C durante cinco minutos e desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 56°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto, seguido por 40 ciclos, sendo a reação finalizada a 72°C por cinco minutos. Oito microlitros da amostra acrescidos de 2 μL de azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), diluídos em solução tampão TBE (tampão tris-borato-EDTA, pH 8,5). O corante GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X (Biotium Hayward, CA, EUA) foi o evidenciador de ácido nucléico utilizado para pigmentar o DNA no gel de agarose.

O marcador de massa molecular *Lambda Hind* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi utilizado. A eletroforese foi realizada em solução tampão TBE em corrente contínua de 100 volts por 60 minutos. O gel foi corado com 15 μL de

GelRed™ 10.000X diluído em 100 mL de NaCl a 0,1M, mantido em agitador (Agitador Evlab-modelo EVOTE, Londrina, PR, Brasil) por 30 minutos e posteriormente visualizado em um sistema de fotodocumentação (BIORAD LABORATORIES LTD, UK).

3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados são apresentados em frequências (%) e estas foram comparadas entre grupos usando teste Exato de Fisher. Foi utilizado o programa PRISM Software V.3 (San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores para a detecção de *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces* spp e *Streptococcus mutans*.

Bactérias	Iniciadores	Tamanho do fragmento amplificado (pb) ^a	Referência
<i>Prevotella nigrescens</i>	5' ATGAAACAAAGGTTTTCCGGTAAG 3' 5' CCCACGTCTCTGTGGGGCTGCGA 3'	804	Tomazinho; Ávila-Campos (2007)
<i>Prevotella intermedia</i>	5' TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG 3' 5' TCAACATCTCTGTATCCTGCGT 3'	575	Tomazinho; Ávila-Campos (2007)
<i>Actinomyces</i> spp	5'CTTAGCTTGCTAAGTATGCCGTTTAG 3' 5' CAGCTGACTTATACTCCCGAAATC 3'	889	Saba <i>et al.</i> (2006)
<i>Streptococcus mutans</i>	5' ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG 3' 5' CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC 3'	517	Franco e Franco <i>et al.</i> (2007)

Nota: ^a pb: pares de base.
Fonte: a autora, 2011.

4 RESULTADOS

4.1 Frequências das bactérias detectadas nos biofilmes dos pacientes com e sem manchas extrínsecas negras.

Para avaliar se havia diferença entre as frequências de bactérias nos biofilmes de pacientes com manchas em relação aos pacientes sem manchas, a amostra analisada (n = 52) foi dividida em dois grupos (independentemente do uso ou não de aparelho ortodôntico fixo): Grupo I: pacientes portadores de manchas dentárias extrínsecas negras (n = 26) e Grupo II: grupo controle, ou seja, pacientes não portadores de manchas dentárias extrínsecas negras (n = 26). Os resultados mostraram que tanto no grupo I, quanto no grupo II, em 16 pacientes (61,5%) foi detectada pelo menos uma das bactérias investigadas.

No grupo dos pacientes portadores de manchas dentárias extrínsecas negras (grupo I), *P. nigrescens* foi a bactéria mais frequentemente detectada (30,8%, 8/26). Porém, esta frequência foi similar àquela detectada em pacientes controles (46,1%, 12/26). Outra bactéria que produz pigmentação, *P. intermedia* foi detectada em somente 3,8% (1/26) das amostras colhidas das manchas extrínsecas negras, não sendo atestada diferença significativa entre esta frequência e a frequência detectada no grupo controle (11,5%, 3/26). Entre as bactérias que não produzem pigmentos negros, *Actinomyces* spp e *S. mutans* estavam presentes nas amostras em frequências similares nos dois grupos

avaliados (19,2% vs 11,5% e 23,1% vs 30,7%, respectivamente; n = 26). Estes dados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Detecção de bactérias no biofilme de pacientes com manchas (Grupo I) e de pacientes sem manchas (Grupo II) dentárias extrínsecas negras^a.

Bactérias	Grupo I ^a		Grupo II ^a		p
	(n = 26)		(n = 26)		
	n	%	n	%	
<i>P. nigrescens</i>	8	30,7	12	46,1	0,27
<i>P. intermedia</i>	1	3,8	3	11,5	0,59
<i>Actinomyces spp</i>	5	19,2	3	11,5	0,72
<i>S. mutans</i>	6	23,1	8	30,7	0,42

Nota: ^a As amostras foram submetidas à técnica da *multiplex* PCR. Os dados representam o número (n) e a frequência (%) e (p) o Teste Exato de Fisher das amostras analisadas em cada grupo.

Fonte: a autora, 2011.

4.2 Avaliação da composição bacteriana detectada nos biofilmes de pacientes com e sem manchas extrínsecas negras.

Para avaliar a composição bacteriana das amostras de pacientes com manchas ou sem manchas extrínsecas negras, detectando quais seriam as bactérias mais prevalentes em cada grupo, somente as amostras positivas (16 amostras em cada grupo) foram analisadas subsequentemente. Entre as bactérias detectadas no grupo I, *P. nigrescens* foi a mais frequente (50,0%, 8/16), enquanto *P. intermedia* foi detectada em apenas uma amostra (6,3%, 1/16). As bactérias não pigmentadoras, *Actinomyces spp* e *S. mutans* foram detectadas em cinco e seis amostras, respectivamente (31,3% e 37,5%,

respectivamente, n = 16). Este perfil é apresentado na Figura 2A. Um perfil similar foi detectado nos pacientes que não apresentaram manchas extrínsecas negras (Grupo II), com *P. nigrescens* sendo a bactéria pigmentadora mais frequentemente detectada (75,0%, 12/16) e *P. intermedia*, menos detectada (18,7%, 3/16). As bactérias não pigmentadoras, *Actinomyces* spp e *S. mutans* foram detectadas em três e oito amostras, respectivamente (18,7% e 50,0%, respectivamente, n = 16). Este perfil é apresentado na Figura 2B. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparando as frequências de cada bactéria entre os grupos, indicando que os perfis bacterianos são similares entre pacientes que apresentam e os que não apresentam manchas extrínsecas negras, considerando as quatro espécies de bactérias investigadas.

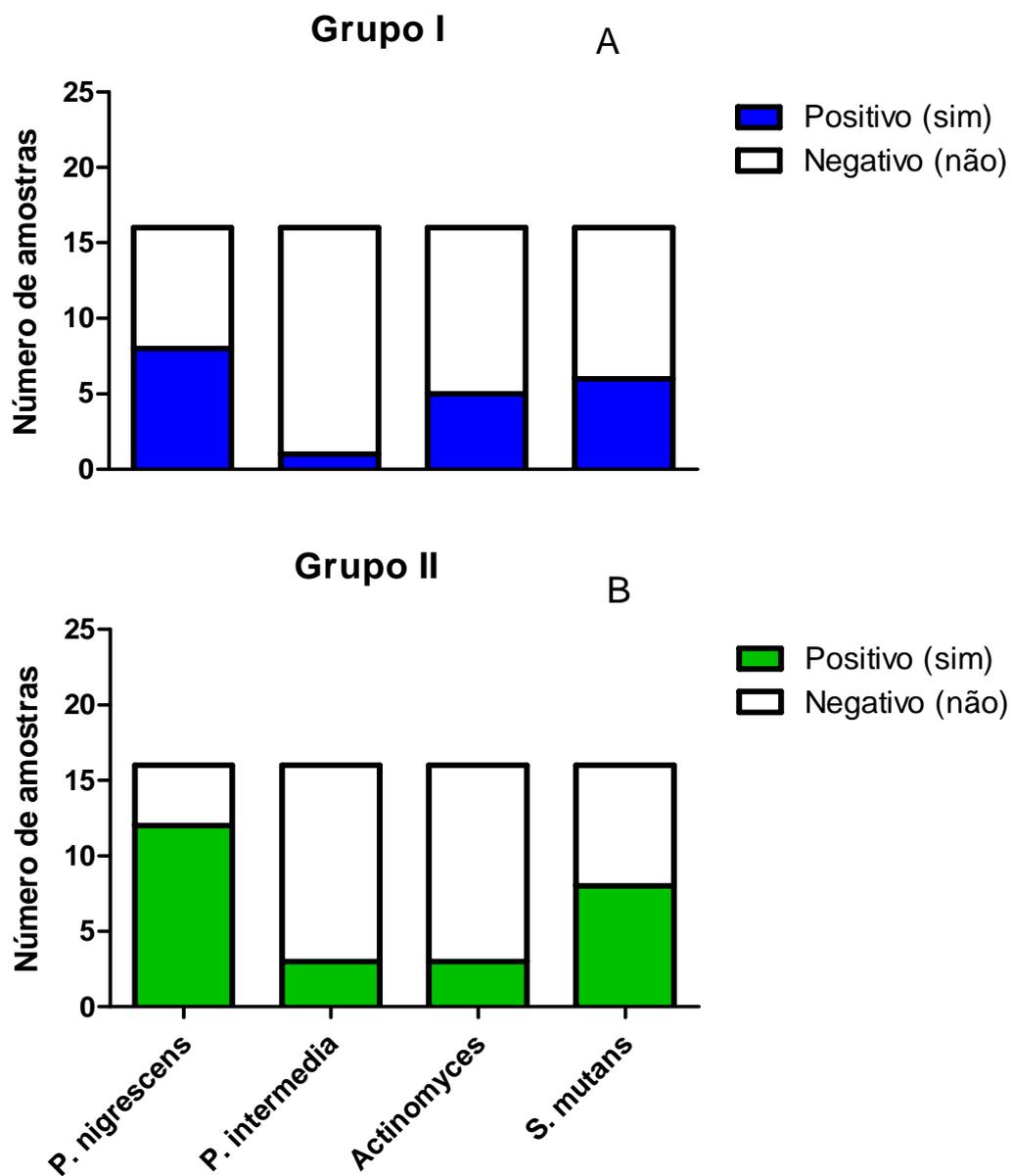


Figura 2. Perfil de bactérias detectadas nas amostras positivas de pacientes com manchas (A) e sem manchas extrínsecas negras (B). Em 16 amostras foram identificadas as bactérias pigmentadoras (*P. nigrescens* e *P. intermedia*) e as bactérias não pigmentadoras (*Actinomyces* spp e *S. mutans*). Os dados representam o número de amostras analisadas (n =16) e os números de amostras positivas (azul em A, verde em B) ou negativas para as referidas bactérias.

4.3 Avaliação da influência do uso de aparelho ortodôntico na composição bacteriana detectada nos biofilmes de pacientes com e sem manchas extrínsecas negras.

Para avaliar se o uso de aparelho ortodôntico poderia interferir na composição bacteriana dos biofilmes, os Grupos I e II foram subdivididos quanto à presença ou não de aparelhos ortodônticos fixos instalados nos pacientes. No Grupo I (portadores de manchas dentárias extrínsecas negras), sete pacientes estavam com aparelhos ortodônticos fixos instalados e 19 pacientes estavam sem aparelhos ortodônticos fixos instalados. No Grupo II (não portadores de manchas dentárias extrínsecas negras), 13 pacientes estavam com aparelhos fixos instalados e 13 sem aparelhos fixos instalados.

Foi detectada pelo menos uma das bactérias investigadas em 71,4% (5/7) dos pacientes do Grupo I que estavam com aparelho fixo instalado e não houve associação entre as bactérias investigadas neste grupo (Figura 5). Ainda no Grupo I, pacientes que não estavam com aparelho fixo, em 57,9% (11/19) foi detectada pelo menos uma das bactérias investigadas e a associação de duas bactérias foi detectada em 36,4% das amostras (4/11) (Figura 3). No Grupo II, foi detectada pelo menos uma das bactérias investigadas em 53,8% (7/13) dos pacientes com aparelho ortodôntico fixo instalado, sendo que, em 71,4% (5/7) destes pacientes houve associação de duas bactérias. Em um paciente (20%, 1/5) foi detectada a presença de três das bactérias investigadas (Figura 6). No Grupo II, nos pacientes sem aparelho fixo instalado, em 61,5% (8/13) foi detectada pelo menos uma das bactérias investigadas, sendo que em 12,5%

(1/8) houve associação de duas bactérias e em 12,5% (1/8) houve associação de três espécies das bactérias investigadas (Figura 4).

Analisando a frequência de associação entre as diferentes bactérias nos biofilmes, foi observado que a presença do aparelho ortodôntico fixo reduz significativamente as associações entre as bactérias no biofilme das manchas extrínsecas, pois, foi observado que não houve nenhuma associação bacteriana nos pacientes do Grupo I que estavam com aparelho ortodôntico fixo instalado (0/5), enquanto que, nos pacientes do Grupo II, houve a associação de bactérias em cinco das sete amostras dos pacientes ($p < 0,05$).

No grupo dos pacientes portadores de manchas dentárias extrínsecas negras (Grupo I) e com aparelho ortodôntico ($n = 7$), *P. nigrescens* foi detectada em 14,3% da amostra (1/7), enquanto no grupo sem aparelho ortodôntico esta espécie foi detectada em uma maior frequência (36,8%; 7/19), mas, no entanto, não foi atestada diferença significativa entre estas frequências. Quanto à *P. intermedia*, no grupo com aparelho ortodôntico, não foi detectada a presença desta espécie em nenhuma amostra, enquanto, no grupo sem aparelho apenas uma amostra foi positiva para *P. intermedia* (5,3%; 1/19). Em relação às bactérias não pigmentadoras, *Actinomyces* spp e *S. mutans*, as frequências foram similares (28,6% vs 15,8% e 28,6% vs 21,1%, respectivamente, comparando pacientes com aparelho vs sem aparelho). Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que o uso do aparelho ortodôntico não alterou as frequências das bactérias investigadas nos biofilmes dos pacientes com manchas dentárias extrínsecas negras.

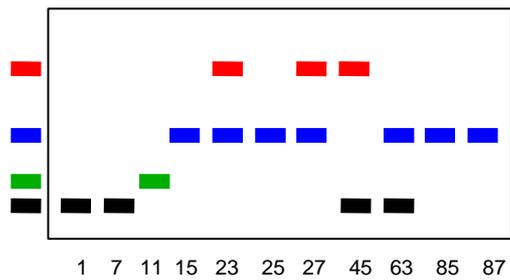


Figura 3. Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes sem aparelho ortodôntico e com manchas dentárias extrínsecas negras. No eixo x os números dos pacientes registrados. No eixo y: em vermelho: *Actinomyces* spp, em azul: *P. nigrescens*, em verde: *P. intermedia* e em preto: *S. mutans*.

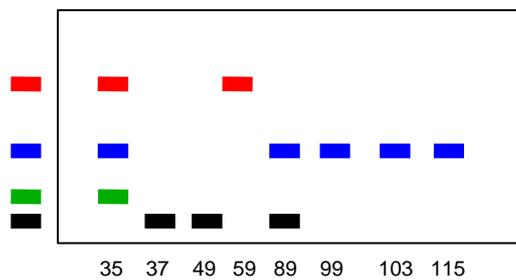


Figura 4. Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes sem aparelho ortodôntico e sem manchas dentárias extrínsecas negras. No eixo x os números dos pacientes registrados. No eixo y: em vermelho: *Actinomyces* spp, em azul: *P. nigrescens*, em verde: *P. intermedia* e em preto: *S. mutans*.

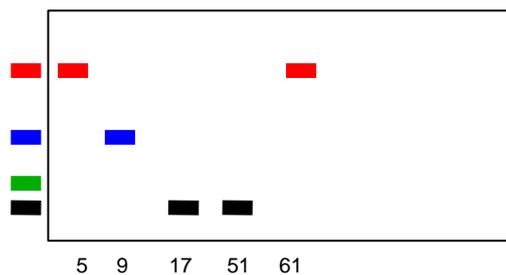


Figura 5. Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes com aparelho ortodôntico e com manchas dentárias extrínsecas negras. No eixo x os números dos pacientes registrados. No eixo y: em vermelho: *Actinomyces* spp, em azul: *P. nigrescens*, em verde: *P. intermedia* e em preto: *S. mutans*.

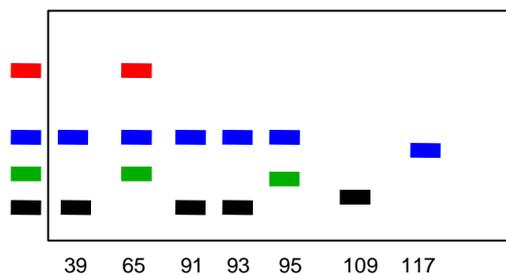


Figura 6. Diagrama representativo das associações de bactérias nas amostras de pacientes com aparelho ortodôntico e sem manchas dentárias extrínsecas negras. No eixo x os números dos pacientes registrados. No eixo y: em vermelho: *Actinomyces* spp, em azul: *P. nigrescens*, em verde: *P. intermedia* e em preto: *S. mutans*.

No grupo dos pacientes não portadores de manchas dentárias extrínsecas negras (Grupo II) e com aparelho ortodôntico (n = 13), *P. nigrescens* foi detectada em 53,8% da amostra (7/13), uma frequência similar àquela detectada no grupo sem aparelho ortodôntico (38,5%; 5/13). Quanto à presença de *P. intermedia*, no grupo com aparelho ortodôntico foi detectada a presença desta espécie em 15,4% da amostra (2/13), enquanto no grupo sem aparelho apenas uma amostra foi positiva (7,7%; 1/13). Entre as bactérias não pigmentadoras, *Actinomyces* spp estava presente em 7,7% das amostras com aparelho ortodôntico (1/13) versus 15,4% (2/13) das amostras dos pacientes sem aparelho ortodôntico. As frequências de *S. mutans* nas amostras do Grupo II, comparando a presença de aparelho ortodôntico fixo (38,5%; 5/13) com ausência de aparelhos ortodônticos fixos (23,1%; 3/13), foram similares. Estes dados são apresentados na Tabela 3. Os resultados mostram que o uso de aparelho ortodôntico não alterou as frequências das bactérias investigadas nos biofilmes de pacientes não portadores de manchas extrínsecas negras, mas alterou a associação entre as bactérias presentes nos biofilmes das manchas.

Tabela 3. Detecção de bactérias no biofilme de pacientes com manchas (Grupo I) e de pacientes sem manchas (Grupo II) dentárias extrínsecas negras subdivididos quanto a presença ou não de aparelhos ortodônticos fixos instalados nos pacientes.^a

Bactérias	Grupo I				Grupo II			
	^b Com aparelho		^c Sem aparelho		^b Com aparelho		^c Sem aparelho	
	ortodôntico		ortodôntico		ortodôntico		ortodôntico	
	(n = 7)		(n = 19)		(n = 13)		(n = 13)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>P. nigrescens</i>	1	14,3	7	36,8	7	53,8	5	38,5
<i>P. intermedia</i>	0	0	1	5,3	2	15,4	1	7,7
<i>Actinomyces spp</i>	2	28,6	3	15,8	1	7,7	2	15,4
<i>S. mutans</i>	2	28,6	4	21,1	5	38,5	3	23,1

Nota:^a O biofilme foi colhido de pacientes portadores ou não de manchas dentárias extrínsecas negras, subdivididos em grupos ^b com aparelho ortodôntico fixo e ^c sem aparelho ortodôntico fixo. Os dados representam o número (n) e a frequência (%) das amostras positivas analisadas em cada grupo.

Fonte: a autora, 2011.

5 DISCUSSÃO

Para este estudo utilizou-se a técnica de PCR para a detecção de bactérias presentes no biofilme das manchas dentárias extrínsecas negras priorizando a identificação das bactérias pigmentadoras de negro: *P. nigrescens* e *P. intermedia*, e das bactérias não pigmentadoras: *Actinomyces* spp e *S. mutans*. As espécies *P. nigrescens* e *P. intermedia* apresentam 94,0% de similaridade e 6,6% de diferença nos genes 16S rRNA (PASTER *et al.*, 1994, TOMAZINHO; ÁVILA-CAMPOS, 2007), o que faz com que a PCR seja uma técnica mais específica para a identificação de cada um destes microrganismos.

Vários estudos compararam a PCR aos testes de cultura bacteriana e confirmaram a sua maior eficiência na detecção das bactérias (GOMES *et al.*, 2005; SEOL *et al.*, 2006; TOMAZINHO; ÁVILA-CAMPOS, 2007). Esta comparação com testes de cultura bacteriana não foi realizado neste estudo, mas, os resultados da PCR (em 61,5% das amostras foi detectada pelo menos uma das bactérias estudadas, 32/52) confirmam estudos prévios (ASHIMOTO *et al.*, 1996; DOUNGUDOMDACHA; RAWLINSN; DOUGLAS, 2000; GOMES *et al.*, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2005) que mostram a alta sensibilidade da PCR para detecção das bactérias anaeróbias pigmentadoras de negro.

Neste trabalho foi demonstrado que não há diferenças significantes entre as frequências das bactérias detectadas nos biofilmes de pacientes com e sem

manchas extrínsecas negras. Para todas as bactérias analisadas (*P. nigrescens*, *P. intermedia*, *Actinomyces* spp e *S. mutans*) as frequências detectadas foram similares nos grupos com ou sem manchas extrínsecas negras, sugerindo uma composição bacteriana similar nos biofilmes destes pacientes. No Grupo I, *P. nigrescens* foi a bactéria mais frequentemente detectada (30,8%), enquanto a *P. intermedia* foi detectada em somente 3,8%. No Grupo II, *P. nigrescens* foi encontrada em 46,1% e *P. intermedia* foi detectada em 11,5%. Nos trabalhos revistos na literatura (ASHIMOTO *et al.*, 1996; GHARBIA *et al.*, 1994; YOSHIDA *et al.*, 2005) os autores concordam que dentre as 13 espécies de *Prevotella*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* são as mais frequentemente encontradas na cavidade bucal, sendo que *P. nigrescens* está mais relacionada à cavidade bucal saudável e *P. intermedia* está relacionada à doença periodontal. A frequência maior de *P. nigrescens* em nossas amostras, tanto no Grupo I quanto no Grupo II, corrobora com a correlação positiva entre saúde bucal e prevalência de *P. nigrescens* sobre *P. intermedia* nos indivíduos periodontalmente saudáveis.

Nas amostras estudadas, entre as bactérias não pigmentadoras, *Actinomyces* spp estava presente em frequências similares nos dois grupos avaliados, ou seja, no Grupo I e no Grupo II (19,2% vs 11,5%, respectivamente). Estes resultados diferem do trabalho de Saba *et al.* (2006) que encontraram que os indivíduos com *Actinomyces* spp tem quatro vezes mais chances de apresentarem manchas negras comparados aos indivíduos que não apresentam estas bactérias. Os autores consideraram surpreendente a presença destas bactérias, uma vez que, a amostra consistia de pacientes

periodontalmente saudáveis. Sugeriram acompanhamento periodontal dos pacientes da amostra, demonstrando necessidade de aumentar a amostra para confirmar os resultados do trabalho. No trabalho de Sato *et al.* (1998), os autores comprovaram a eficiência do método PCR-RFLP (do inglês: *restriction fragment length polymorphism*) na detecção e diferenciação das sete espécies de *Actinomyces* (*A. israelii*, *A. gerencseriae*, *A. naeslundii* genoespécies 1 e 2, *A. odontolyticus*, *A. meyeri* e *A. georgiae*) reconhecidas na cavidade bucal humana. Neste estudo esta diferenciação das espécies não foi realizada, mas, em estudos futuros, para confirmação de associações bacterianas do biofilme das manchas, talvez seja uma boa ferramenta a ser utilizada.

A outra bactéria não pigmentadora investigada, *S. mutans*, estava presente em frequências similares nos dois grupos avaliados, ou seja, no Grupo I em 23,1% e no Grupo II em 30,7% das amostras estudadas. A alta frequência de *S. mutans* encontrada no Grupo I difere dos dados encontrados na literatura, como no trabalho de Slots (1974) que detectou *S. mutans* em apenas 5,0% das amostras de biofilme das manchas negras. Slots (1974) detectou uma correlação positiva entre o baixo número de *S. mutans* e o baixo índice de cárie associados à presença das manchas negras e isto sugere que a presença das manchas diminui a colonização por *S. mutans*. Reid e Beely (1976), no entanto, sugerem que a redução do índice de cárie dos indivíduos portadores de manchas dentárias extrínsecas negras seja devido ao conteúdo de cálcio e fosfato do biofilme da mancha. A literatura relata resultados controversos, sendo que em alguns trabalhos foi identificada uma correlação positiva entre a presença das manchas e um baixo índice de cárie (REID; BEELEY;

MACDONALD, 1977; FRANCO; ISSAO, 1990; KOCH *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2002; GASPARETTO *et al.*, 2003). Enquanto outros trabalhos (GALLARDO; CENCILLO, 2005; CALDAS; MIALHE; SILVA, 2008) não foi detectada esta correlação. Estas diferenças nos resultados dos estudos podem estar relacionadas à característica multifatorial da doença cárie e o perfil bacteriano das manchas negras presentes nos pacientes. Neste contexto, a correlação positiva entre presença das manchas e baixo índice de cárie seria uma avaliação simplista e unifatorial, que não aborda o conceito ampliado do processo saúde-doença (BAELUM; FEJERSKOV, 2003). Sabe-se que a microbiota bucal associada com a cárie é dominada por bactérias Gram-positivas, particularmente do gênero *Actinomyces*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, mais predominantemente pelo *S. mutans* (CORBY *et al.*, 2005). A detecção de *S. mutans* no biofilme das manchas negras demonstrada neste trabalho, usando a PCR, indica que a microbiota bucal destes pacientes não está livre das bactérias cariogênicas.

O efeito da presença de aparelho ortodôntico no perfil bacteriano dos biofilmes foi estudado neste trabalho. A diferença encontrada na frequência de aparecimento das bactérias foi: *P. nigrescens* (40,0% no grupo com aparelho vs 37,5% no grupo sem aparelho), seguida por *S. mutans* (35,0% no grupo com aparelho vs 21,8% no grupo sem aparelho), *Actinomyces* spp (15,0% no grupo com aparelho vs 15,6% no grupo sem aparelho) e *P. intermedia* (10,0% no grupo com aparelho vs 6,3% no grupo sem aparelho). Esta diferença foi atribuída à mudança da microbiota que acontece nos pacientes submetidos à terapia ortodôntica fixa que são expostos a uma grande quantidade de

acessórios metálicos que propiciam um aumento de superfícies adicionais facilitando a retenção do biofilme bacteriano (BLOOM *et al.*, 1964). Estes achados foram confirmados por Anhoury *et al.* (2002) quando compararam o perfil bacteriano de pacientes com aparelho metálico e com aparelho cerâmico e por Naranjo *et al.* (2006), que afirmaram que após três meses da colocação dos bráquetes ocorre uma mudança no perfil bacteriano do biofilme destes pacientes, predominando as bactérias periodontopáticas. Para Bloom *et al.* (1964), Pinheiro; Pinheiro; Silva Filho (1991), Campbell (2003) e Kitada *et al.* (2009) os acessórios ortodônticos são superfícies adicionais que retêm biofilme, dificultando a higienização natural da saliva, permitindo o acúmulo de extratos essenciais para microrganismos produtores de ácidos, aumentando a população microbiana, conseqüentemente o número de *Streptococcus* do grupo *mutans*.

A importância das técnicas moleculares, como a PCR, vem colaborar para a ampliação dos conhecimentos sobre a etiologia das manchas dentárias extrínsecas negras e contribuir para a inserção de medidas preventivas e estratégias de tratamento mais efetivas.

6 CONCLUSÕES

6.1 As bactérias pigmentadoras de negro *P. nigrescens* e *P. intermedia* estão presentes nos biofilmes dentários dos pacientes portadores de manchas dentárias extrínsecas negras com ou sem aparelho ortodôntico fixo.

P. nigrescens foi a bactéria pigmentadora de negro detectada com maior frequência nos pacientes portadores de manchas negras com ou sem aparelho ortodôntico fixo.

6.2 Dentre as bactérias não pigmentadoras de negro *Actinomyces* spp e *S. mutans* não houve diferença significativa entre as frequências das duas bactérias nos pacientes portadores de manchas dentárias extrínsecas negras.

S. mutans apresentou uma frequência maior de aparecimento no grupo dos pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo.

REFERÊNCIAS

ANHOURY, P.; NATHANSON, D.; HUGHES, C.V.; SOCRANSKY, S.; FERES, M.; CHOU, L.L. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. **Angle Orthod**, v. 72, n. 338-343, 2002.

ARRUDA, G.S.; SOUSA, P.C.B.; DELMAN, F.T.; IMPARATO, J.C.P.; PINHEIRO, S.L. Manchas extrínsecas negras do esmalte. **Rev Cienc Med**, v.12, n.4, p. 375-380, 2003.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, p. 266-273, 1996.

BAELUM, V.; FEJERSKOV, O. Caries diagnosis: a mental resting place on the way to intervention? In: Ferjerskov, O. e Kidd, E. Dental caries: the disease and its clinical management. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 101-110.

BASTOS, V.A.S.; GALAN JR., J. Estudo das manchas negras e marrons e sua relação com as cáries dentárias. **Rev Bras Odontol**, v. 49, n. 5, p. 2-6, 1992.

BLOOM, R.H.; BROWN JR, L.R. A study of the effects of orthodontic appliances on the oral microbial flora. **Bacteriol**, v. 17, n. 5, p. 658-66, 1964.

CALDAS, C.T.; MIALHE, F.L.; SILVA, R.P. Prevalência de manchas dentais extrínsecas negras e sua relação com a cárie dentária em crianças do município de Santa Terezinha de Itaipu-PR. **RFO**, v.13, n.2, p. 22-23, 2008.

CAMPBELL, C.H.C.T. Alteração da microbiota bucal em pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo. **Ortodontia Gaúcha**, v.VII, n.2, p.98-109, 2003.

CORBY, P.M.; LYONS-WEILER, J.; BRETZ, W.A.; HART, T.C.; AAS, J.A. *et al.* Microbial Risk Indicators of Early Childhood Caries. **J Clin Microbiol**, v. 43, n.11, p. 5753-5759, 2005.

COSTA, S.C.; IMPARATO, J.C.P.; FRANCO, A.E.A.; CAMARGO, M.C.F. Estudo da ocorrência de manchas extrínsecas negras em crianças e sua relação ao baixo índice de cárie dental. **Rev Odontol Univ St Amaro**, v. 2. n. 4, p.36-38, 1997.

COSTA, M.T.; LENZA, M.A.; GOSCH, C.S.; COSTA, I.; RIBEIRO-DIAS, F. *In vitro* evaluation of corrosion and cytotoxicity of orthodontic brackets. **J Dent Res**, v.86, n. 5, p.441-445, 2007.

CORTELLI, J.R.; AQUINO, D.R.; CORTELLI, S.C.; FERNANDES, C.B.; CARVALHO-FILHO, J. *et al.* Etiological Analysis of Initial Colonization of Periodontal Pathogens in Oral Cavity. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 1322-1329, 2008.

DOUNGUDOMDACHA, S.; RAWLINSON, A.; DOUGLAS, C.W. Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method. **J Med Microbiol**, v. 49, p. 861-874, 2000.

DOUTHART, R.J.; BURNETT, J.P.; BEASLEY, F.W.; FRANK, B.H. Binding of Ethidium Bromide to Double-Stranded Ribonucleic Acid. **Biochemistry**, v.12, n. 2, p. 214-220, 1973.

DUERDEN, B.I. Pigment production of *Bacteroides* Species with reference to sub-classification. **J Med Microbiol**, v. 8, p.113-125, 1974.

ELIADES, T.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloys. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 125, p. 24-29, 2004.

FRANCO, K.D.; ISSAO, M. Manchas extrínsecas e sua correlação com prevalência de cárie. **Rev Paul Odont.** v. 12, p. 23-30, 1990.

FRANCO e FRANCO, T.C.C.; AMOROSO, P.; MARIN, J.M.; ÀVILA, F.A. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Dental Plaque Samples from Brazilian Preschool Children by Polymerase Chain Reaction. **Braz Dent J**, v. 18, n. 4, p. 329-333, 2007.

GALAVIZ, L.A.A.; MEDINA, M.D.C.A.; GARCIA, I.C.E. Detection of potentially cariogenic strains of *Streptococcus mutans* using the polimerase chain reaction. **J Clin Pediatric Dent**, v. 27, n.1, p.47-51, 2002.

GALLARDO, V.P.; CENCILLO, C.P. Tinción cromógena: un problema habitual en la clínica pediátrica. **An Pediatr (Barc)**, v. 62, n. 2, p. 258-260, 2005.

GASPARETTO, A.; CONRADO, C.C.; MACIEL, S.M.; MIYAMOTO, E.Y.; CHICARELLI, M. *et al.* Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian schoolchildren. **Braz Dent J**, v. 14, n. 3, p. 157-161, 2003.

GHARBIA, S.E.; HAAPASALO, M.; SHAH, H.; KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K. *et al.* Characterization of *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*

isolates from periodontic and endodontic infections. **J Periodontol**, v. 65, p. 56-61, 1994.

GORLIN, R.J.; GOLDMAN, H.M. Environmental pathology of the teeth. In: Thoma's oral pathology. 6th ed. St Louis: Mosby, 1970. p. 184-192.

GOMES, B.P.F.A.; JACINTO, R.C.; PINHEIRO, E.T.; SOUSA, E.L.R.; ZAIA, A.A. *et al.* *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture by PCR. **Oral Microbiology Immunology**, v. 20, p. 211-215, 2005.

GUAN, S.M.; NAGATA, H.; MAEDA, K.; KUBONIWA, M.; MINAMINO, N. *et al.* Purification and characterization of a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Prevotella intermedia*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 235, p. 333-339, 2004.

GUAN, S.M.; NAGATA, H.; SHIZUKUISHI, A.; WU, J.Z. Degradation of human hemoglobin by *Prevotella intermedia*. **Anaerobe**, v. 12, p. 279-282, 2006.

HARDIE, J.M. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. **Br Dent J**, v. 172, n. 11, p. 271-78, 1992.

HARDING, G.K.M.; SUTTER, V.L.; FINEGOLD, S.M.; BRICKNELL, K.S. Characterization of *Bacteroides melaninogenicus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 354-359, 1976.

HEINRICH-WELTZIEN, R.; MONSE, R.; van PALENSTEIN HELDERMAN, W. Black stain and dental caries in Filipino schoolchildren. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 37, p. 182-187, 2009.

HWANG, C.; SHIN, J.S.; CHA, J.Y. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 120, n. 4, p. 383-391, 2001.

JAKUBOVICS, N.S. Talk of the town: Interspecies communication in oral biofilms. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25, p. 4-14, 2010.

JORDAN, R.C.K.; DANIELS, T.E.; GREENSPAN, J.S.; REGEZI, J.A. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part I: molecular methods. **Oral Maxillofac Pathol**, v. 92, n. 6, p. 650-669, 2001.

KITADA, K.; TOLEDO, A.; OHO, T. Increase in detectable opportunistic bacteria in the oral cavity of orthodontic patients. **Int J Dent Hygiene**, p. 121-125, 2009.

KOCIJAN, A.; MILOSEV, I. The influence of complexing agent and proteins on the corrosion of stainless steels and their metal components. **J Mater Sci: Mater in Medic**, v. 14, p. 69-77, 2003.

KOCH, M.J.; BOVE, M.; SCHROFF, J.; PERLEA, P.; GARCIA-GODOY, F. *et al.* Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy. **J Dent Child**, v. 68, p. 353-355, 2001.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5nd ed., Medsi, Rio de Janeiro, 1465 pp. 2001.

LEUNG, S.W. Naturally occurring stains on the teeth of children. **J Am Dent Assoc**, v. 41, p. 191-197.

MELLANBY, M.; COUMOULUS, H.; KELLEY, M. Teeth of 5-year-old London schoolchildren (1955) with a comparison of results obtained from 1929 to 1955. **Br Med J**, v. 2, p. 318-322, 1957.

NATHOO, S.A. The chemistry and the mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. **JADA**, v.128, p. 6S-10S, 1997.

NARANJO, A.A.; TRIVINO, M.L.; JARAMILLO, A.; BETACOURTH, M.; BOTERO, J.E. Changes in subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 130, p. 275-277, 2006.

PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; OLSEN, I.; FRASER, G.J. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. **J Bacteriol**, v. 176, p. 725-732, 1994.

PINHEIRO, C.F.; PINHEIRO, C.E.; SILVA FILHO, O.G. Influência do uso de aparelho ortodôntico fixo sobre o índice de placa e de gengivite sobre o metabolismo da placa dentária *in vitro*. **Rev Soc Bras Ortod**, v. 1, p. 236-240, 1991.

REID, J.S.; BEELEY, J.A. Biochemical studies on the composition of gingival debris from children with black extrinsic tooth stain. **Caries Res**, v. 10, p. 363-369, 1976.

REID, J.S.; BEELEY, J.A.; MACFARLANE, T.W. A study of the pigment produced by *Bacteroides melaninogenicus*. **J Dent Res**, v. 55, n. 6, p. 1130, 1976.

REID, J.S.; BEELEY, J.A.; MACDONALD, D.G. Investigations into black extrinsic tooth stain. **J Dent Res**, v. 56, n. 8, p. 895-899, 1977.

RONAY, V.; ATTIN, T. Black stain- a review. **Oral Health Prev Dent**, v. 9, n. 1, p.37-45, 2011.

ROSA, E.A.R.; ROCHA, A.L.R.; SILVA, M.M.; ARGENTA, M. Presença de manchas extrínsecas e sua relação com prevalência de cárie em crianças de São Mateus-PR. **Arq odontol**, v. 38, n. 1, p. 53-60, 2002.

SABA, C.; SOLIDANI, M.; BERLUTTI, F.; VESTRI, A., OTTOLENGHI, L. *et al.* Black stains in the mixed dentition: A PCR microbiological study of the etiopathogenic bacteria. **J Clin Pediatr Dent** , v. 30, n. 3, p. 219-224, 2006.

SAKAI, V.T; CAMPOS, M. R.; MACHADO, M.A.A.M.; LAURIS, J.R.P.; GREENE, A.S. *et al.* Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.17, p. 192-199, 2007.

SATO, T.; MATSUYAMA, J.; TAKAHASHI, N.; MICHIKO, S.; JOHNSON, J. *et al.* Differentiation of oral *Actinomyces* species by 16S ribosomal DNA polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Archives of Oral Biology**, v. 43, p. 247-252, 1998.

SEOL, J. H.; CHO, B.H.; CHUNG.C.P.; BAE, K.S. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J Endod**, v. 32, n. 2, p. 110-114, 2006.

SMALLEY, J.W.; SILVER, J.; BIRSS, A.J.; WITHNALL, R.; TITLER, P.J. The haem pigment of oral anaerobes *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* is composed of iron (III) protoporphyrin IX in the monomeric form. **Microbiol**, v. 149, p. 1711-1718, 2003.

SLOTS, J. The microflora of black stain on human primary teeth. **Scand J Dent Res**, v. 82, p. 484-90, 1974.

SOUKOS, N.S.; SOM, S.; ABERNETHY, A.D.; RUGGIERO, K.; DUNHAM, J. *et al.* Phototargeting Oral Black-Pigmented Bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1391-96, 2005.

SULIEMAN, B.D.S. An overview of tooth discoloration: Extrinsic, intrinsic and internalized stains. **Dent Update**, v. 32, p. 463-471, 2005.

THEILADE, J.; SLOTS, J.; FEJERSKOV, O. The ultrastructure of black stain on human primary teeth. **Scand J Dent Res**, v. 81, p. 528-532, 1973.

THEILANDE, J.; PANG, K.M. Scanning electron microscopy of Black stain on human permanent teeth. **Scanning Microscopy**, v. 1, n. 4, p. 1983-1989, 1987.

TOMAZINHO, L.F.; ÀVILA-CAMPOS, M.J. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** , v. 103, p. 285-288, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Oral Health Surveys. Basic Methods. **WHO**, Geneva, 1997.

van WINKELHOFF, A.J.; van STEENBERGEN, T.J.; de GRAAFF, J. The role of blackpigmented *Bacteroides* in human oral infections. **J Clin Periodontol**, v.15, p.145-155, 1988.

YOSHIDA, A.; TACHIBANA, M.; ANSAI, T.; TAKEHARA, T. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of black-pigmented *Prevotella* species in oral specimens. **Oral Microbial Immunol**, v. 20, p. 43-46, 2005.

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é MARILIA TEIXEIRA COSTA. Juntamente com a PROFESSORA DRA. FABIANA CRISTINA PIMENTA, sou uma das pesquisadoras responsáveis deste trabalho e minha área de atuação é Odontologia. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis: Marília Teixeira Costa e Dra Fabiana Cristina Pimenta nos telefones: 3215 1439 – 3209 6108. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3269 8338 – 3269 8426.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO MICROBIANA DAS MANCHAS DENTÁRIAS EXTRÍNSECAS NEGRAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO ORTODÔNTICO

Objetivos da Pesquisa: Esta pesquisa tem como objetivo avaliar as bactérias produtoras de pigmentos (pequenos pontos) negros nos biofilmes dentários (placa bacteriana) dos dentes de pacientes com e sem aparelho ortodôntico metálico fixo.

Procedimentos: As amostras serão coletas das manchas negras localizadas nas superfícies externas (de fora) dos dentes de pacientes sem tratamento ortodôntico fixo e de pacientes que estão em tratamento ortodôntico fixo. Utilizando-se curetas autoclavadas (esterelizadas), as amostras serão coletadas das superfícies dos dentes de cada paciente. As coletas serão realizadas no período abril de 2009 a abril de 2010.

Riscos e Desconfortos: A coleta das amostras não apresenta riscos ou desconfortos ao paciente, uma vez que o material a ser coletado está na superfície externa (de fora) dos dentes.

Indenizações: Esta pesquisa não implicará em quaisquer custos ou gastos ao paciente. Do mesmo modo, o participante voluntário desta pesquisa não será beneficiado financeiramente ou receberá qualquer ajuda, prêmios ou bonificações. O paciente que sofrer qualquer dano previsto ou não neste termo de consentimento e/ou resultante de sua participação, além do direito a assistência integral, tem direito á indenização prevista em lei.

Benefícios decorrentes da participação na pesquisa: Os resultados desta pesquisa poderão contribuir para identificar as bactérias responsáveis pela pigmentação negra da superfície dentária.

Confidencialidade: Toda informação obtida nesta pesquisa será confidencial. Em nenhum momento o seu nome será divulgado, sendo tratado apenas por número. Apenas as pessoas envolvidas na pesquisa terão acesso a estas informações. Todos os resultados da pesquisa poderão ser apresentados através de publicações em periódicos (revistas) científicos nacionais ou internacionais, apresentados oralmente como palestras e conferências e sob forma de painéis em encontros científicos ou congressos na área tratada. Os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros.

Esclarecimento de Dúvidas: O paciente ou responsável tem a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento que desejar e deixar de participar da pesquisa. A sua participação é voluntária. A sua decisão ou de seu responsável não afetará qualquer atividade presente ou futura que vier a ter com a Universidade Federal de Goiás.

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA
PESQUISA**

Eu, _____, RG _____,

abaixo assinado, concordo em participar, como sujeito voluntário, da pesquisa:

**“AVALIAÇÃO MICROBIANA DAS MANCHAS DENTÁRIAS EXTRÍNSECAS
NEGRAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO ORTODÔNTICO”**

sob a responsabilidade de Marília Teixeira Costa e da orientadora Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação (ou da participação do menor _____). Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu tratamento, assistência ou acompanhamento.

Local e data: _____

Nome e assinatura do sujeito ou responsável:

Assinatura dactiloscópica:



Assinatura do Pesquisador responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas á equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

Observações complementares:

ANEXO

Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CEPMHA)

HC

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N° 033/2009 Goiânia, 26/03/2009

INVESTIGADOR RESPONSÁVEL: *Profª Dra. Fabiana Cristina Pimenta*
Pesquisadores Participantes: Profª Dra. Fátima Ribeiro Dias; Dra. Marília Teixeira Costa; Dra. Miriam Cristina Leandro Dorta; Profª Lara Sefânia Netto de Oliveira Leão; Dra. Ana Beatriz Mori Lima; Nathália Ferreira Lima.

TÍTULO: *“Avaliação microbiológica das manchas dentárias extrínsecas negras em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico – GO.”*

Área Temática: *Grupo III*
Local de Realização: *IPTSP/UFG*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise, **aprova** o projeto de Pesquisa, acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

⇒ Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

⇒ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, **relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, data do encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

⇒ O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13)


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 261 3006 - FAX: 261 29 91
GOLÂNIA - GOIÁS