

HENRIQUE PRETTI

**EFEITO DO VERNIZ DE CLOREXIDINA 40% SOBRE
MICROORGANISMOS PERIODONTOPATOGÊNICOS E NO
AUMENTO GENGIVAL EM PACIENTES ORTODÔNTICOS.
ESTUDO PROSPECTIVO "SPLIT MOUTH".**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2010

HENRIQUE PRETTI

**EFEITO DO VERNIZ DE CLOREXIDINA 40% SOBRE
MICROORGANISMOS PERIODONTOPATOGÊNICOS E NO
AUMENTO GENGIVAL EM PACIENTES ORTODÔNTICOS.
ESTUDO PROSPECTIVO "SPLIT MOUTH".**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-graduação
da Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Allyson Nogueira Moreira

Co-orientadora: Cláudia Silami de Magalhães

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Título: Efeito do verniz de clorexidina 40% sobre microorganismos periodontopatogênicos e no aumento gengival em pacientes ortodônticos. estudo prospectivo "split mouth", Faculdade de Odontologia, UFMG, 2010, P. 92.

Tese: Doutorado em Odontologia (Área de concentração: Clínica Odontológica)

- | | |
|--------------------------|---------------------|
| 1. Verniz de Clorexidina | 2. Aumento gengival |
| 3. Flora bacteriana | 4. Ortodontia |

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DEDICATÓRIA:

*“À memória de quem sempre acreditou e me apoiou durante
toda minha vida”*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Allyson Nogueira Moreira e à Professora Cláudia Silami de Magalhães pela disponibilidade, dedicação e empenho na orientação durante estes anos de convivência para a realização deste trabalho.

Ao Professor Ricardo Santiago Gomes pela acolhida no laboratório de Biologia Molecular da FO-UFMG e por estar sempre disponível para ajudar.

Aos colegas Alfonso Gala-García e João Brito pela grande ajuda e companheirismo em todas as etapas deste trabalho, sem a qual seria impossível concretizar esta pesquisa.

Aos meus colegas do Departamento de Ortodontia, professores Alexandre Drummond, Elizabeth Lages, Leonardo e José Ferreira Rocha pelo apoio e trabalho em equipe na orientação dos meus alunos, permitindo que eu dedicasse mais tempo no doutorado.

Às funcionárias do Departamento de Ortodontia, Sandra, Eloisa, Elaine e Maria Elena pela ajuda constante no andamento dos trabalhos no nosso departamento.

À minha amada família pela compreensão e eterno carinho incondicional durante estes anos.

AGRADECIMENTOS

A participação de todos no meu dia-a-dia foi fundamental para que eu pudesse desenvolver os meus estudos e realizasse este trabalho. A todos que participaram direta ou indiretamente, muito obrigado.

RESUMO

O aumento gengival generalizado é comumente causado por resposta inflamatória à placa bacteriana, muito comum em pacientes ortodônticos. O objetivo deste estudo é analisar os efeitos do verniz contendo clorexidina (40%) na flora bacteriana do sulco gengival e alterações no volume gengival em pacientes com aparelho ortodôntico e aumento do volume gengival. A amostra foi constituída de 30 pacientes provenientes da Clínica do Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais que apresentavam aumento de volume gengival. Para cada indivíduo foi coletado material do sulco gengival mesial e distal da vestibular dos segundos pré-molares do arco superior do lado direito e esquerdo. Após o primeiro exame e profilaxia, foi aplicado o verniz de clorexidina nos molares e pré-molares de um lado do arco superior, escolhido por sorteio, e do outro lado foi aplicado um verniz sem clorexidina, servindo como controle. A análise qualitativa e quantitativa das bactérias, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, antes da aplicação do verniz (T0), 14 dias (T14) e 56 dias após a aplicação do verniz (T56). Nestes três períodos, os pré-molares superiores foram fotografados e a área vestibular da coroa foi mensurada. Analisando as fotografias, as áreas médias do lado tratado foram maiores no T14 e T56 sendo que no T0 não houve diferença entre as médias dos lados tratados e controle. No lado controle, as médias de área permaneceram iguais no T0 e no T14, diminuindo no T56. No lado tratado, as médias de área aumentaram com o tempo, sendo a menor, medida no T0 e a maior no T56. Em relação ao resultado das alterações das bactérias analisadas, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tempos T0, T14 e T56 no lado de controle e no lado tratado.

Conclusão: O uso do verniz de clorexidina EC40 diminuiu a inflamação gengival de forma progressiva para 14 e 56 dias após sua aplicação e o número das bactérias estudadas não sofreram mudanças significativas, demonstrando que o

controle da placa bacteriana por agentes químicos é mais complexo e envolve outros fatores que devem ser estudados.

ABSTRACT

The increase in gingival volume is a large group of alterations, both from cell component and fibrous periodontal tissue. The etiology of the increase in gingival volume is diverse and ranges from acute or chronic inflammatory processes caused by local irritating factors, systemic disorders, heredity, anatomical or as a side effect of drug therapies. The widespread gingival overgrowth is commonly caused by inflammatory response to plaque, which is very common in orthodontic patients. The aim of this study is to analyze the effects of varnish containing chlorhexidine (40%) in the bacterial flora of the gingival sulcus and increase gingival volume changes in patients with braces. The sample consisted of 30 patients with gingival overgrowth from the Clinic of the Specialization Course in Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais. For each individual a sample from the buccal gingival sulcus of the right and left upper second premolars were collected. After the first clinical exam and prophylaxis, a chlorhexidine varnish was applied on molars and premolars at on one side of the upper jaw and the other side was applied a varnish without chlorhexidine, being used as controls. The qualitative and quantitative analysis of bacteria, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*, were performed by polymerase chain reaction (PCR) in real time before applying the varnish (T0), 14 days (T14) and 56 days after applying it (T56). In these three periods the premolars were photographed and the vestibular areas of the crown were measured. Analyzing the photographs, the mean areas of the treated side were higher at T14 and T56 while at T0 no difference among the means of treated and control sides were seen. In the control, the mean area remained the same at T0 and T14, decreasing at T56. On the treated side, the average area increased with time: the smallest measure at T0 and the highest at T56. Regarding the result of changes in the analyzed bacteria, no statistical differences were found between T0, T14 and T56 on the control and the treated side.

Conclusion: The use of the clorexidina varnish EC40 decreased the inflammation gengival in a progressive way to 14 and 56 days after the application and the number of the studied bacteria didn't suffer significant changes, demonstrating that the control of the bacterial plate for chemical agents is more complex and evolve other factors that should be studied.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C: Graus centígrados

CHX: Clorexidina

cT: Threshod cicly (limiar de detecção)

CV: Coeficiente de Variação

DNA: Ácido desoxiribonucleico

Ec: *Eikenella corrodens*

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

Fn: *Fusobacterium nucleatum*

g: Força gravitacional

H_0 : Hipótese nula

HCl: Ácido clorídrico

Kw: Teste de *Kappa*

m: Minuto

M: Molar

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mm² : Milímetro quadrado

NaCl: Cloreto de sódio

PCR - *Real time*: Reação em cadeia de Polimerase em tempo real

pH: Potencial hidrogeniônico

Pi: *Prevotella intermedia*

RNA: Ácido ribonucléico

rrn: Ribossomo RNA

rDNA: DNA ribossômico

RNase:enzima para degradar RNA

RPM: Rotação por minuto

s: Segundos

SDS: Dodecil sulfato de sódio poliacrilamida

T0: Tempo de zero

T14: Tempo de 14 dias

T56: Tempo de 56 dias

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µmol: Micromolar

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

1. **Figura 1.** Graus de aumento gengival: (A) Grau 0; (B) Grau 1; (C) Grau 2; (D) Grau 3 e (E) Grau 4.....27
2. **Figura 2.** Coleta subgengival por meio de cone de papel absorvente esterelizado.....29
3. **Figura 3.** Área da vestibular do segundo pré-molar superior demarcada e mensurada no programa Rapid Sketch® V.2.4 (Rapid Sketch®)31
4. **Gráfico 1.** Curvas padrão de PCR em tempo real das amostras Bacterianas de referência.....35

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract	VIII
Lista de abreviatura e siglas	IX
Lista de figuras e gráficos.....	XI
Sumário.....	XII
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	13
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Desenho do estudo	24
3.2 Participantes.....	24
3.2.1 Critérios de inclusão	25
3.2.2 Critérios de exclusão	25
3.3 Avaliação do grau do aumento gengival.....	26
3.4 Análise clínica do volume gengival	28
3.5 Obtenção das imagens	28
3.6 Coleta subgengival.....	29
3.7 Aplicação dos tratamentos	30
3.8 Análise das imagens	30
3.9 Análise microbiológica.....	31
3.9.1 Extração do DNA	31
3.9.2 PCR em tempo real	33
3.10 Análise estatística	38
4 RESULTADOS.....	39
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
6 ARTIGO 1.....	47
7 ARTIGO 2.....	66
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
9 ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A odontologia preventiva aplicada tanto pelo clínico geral quanto pelo especialista, tenta se antecipar aos problemas bucais. Eles dependem de diversos fatores diretamente relacionados com o profissional e o paciente. A motivação individual e a capacidade do cirurgião-dentista em manter a saúde bucal, prevenir doenças e divulgar promoção de saúde bucal tem se destacado na área da saúde. Os cuidados com a saúde bucal têm ido além de aspectos estéticos e no novo paradigma de saúde desperta uma maior consciência sobre a necessidade de se manter uma saúde bucal satisfatória que, conseqüentemente, contribui na saúde geral (HEINTZE, 1996; STEFANI & LIMA, 1996).

Durante o tratamento ortodôntico, a manutenção da saúde bucal e o controle do biofilme para a prevenção da cárie dentária e da doença periodontal são desafios comuns na prática. A utilização de aparelhos ortodônticos dificulta a adequada higienização bucal tornando mais susceptível à ocorrência de doenças periodontais. Esses aparelhos provocam acúmulo de biofilme adicional, aumento do fluxo salivar devido ao estímulo físico e inflamação do tecido gengival (LARA-CARRILLO *et al.*, 2010; RISTIC *et al.*, 2008; RISTIC *et al.*, 2007).

O acúmulo de biofilme significa maior número de microorganismos em torno dos fios adjacentes aos bráquetes e próximos das bandas ortodônticas alterando de alguma forma a composição da microbiota bucal (CHANG *et al.*,

1997; CHANG *et al.*, 1999; MANDALL *et al.*, 2002). Em razão disso, existe maior risco de causar alterações deletérias nos tecidos bucais tais como a desmineralização do esmalte, a cárie dentária e a doença periodontal (LOVROV *et al.*, 2007; RISTIC *et al.*, 2007). Assim, o surgimento destas alterações bucais do paciente durante o tratamento ortodôntico pode ser explicado pelo controle inadequado do biofilme e seu acúmulo ao redor dos dispositivos intra-orais específicos (SUKONTAPATIPARK *et al.*, 2001).

A maioria dos pacientes em tratamento ortodôntico precisam da implementação de um programa preventivo para manter uma higiene bucal aceitável e evitar maiores complicações (DERKS *et al.*, 2008; OPSAHL VITAL *et al.*, 2010), já que o controle do biofilme, usando métodos mecânicos é difícil de ser mantida, principalmente em adolescentes com aparelho fixo (COSTA *et al.*, 2010; GOH, 2007). Dessa forma, com a implementação e aplicação de programas de prevenção de saúde bucal em pacientes ortodônticos com aparelhos fixos, podemos motivá-los a melhorar a sua saúde bucal e, sob a supervisão clínica do profissional, obter melhores resultados na eliminação do biofilme, diminuir o risco de cárie e inflamação dos tecidos periodontais (AY *et al.*, 2007).

Pode-se observar nos pacientes que fazem uso de aparelhos ortodônticos fixos que o controle efetivo do biofilme por meio de métodos mecânicos sofre algumas limitações e ocasionalmente são observadas alterações do tecido periodontal durante o tratamento ortodôntico tanto em pacientes adultos quanto em adolescentes (DERKS *et al.*, 2008; OPSAHL VITAL *et al.*, 2010). Os métodos

mecânicos de higienização bucal através do uso de escova e fio dental são considerados eficazes, quando realizados corretamente, mas insuficientes, em certos casos (COSTA *et al.*, 2010; GOH, 2007).

O importante papel dos agentes químicos para melhorar a saúde bucal deve ser considerado um complemento útil, segundo a avaliação do caso e a necessidade do paciente. Seu uso reduz o acúmulo de biofilme na superfície dos tecidos bucais, retardando o seu acúmulo nos dentes. O uso de bochechos e dentifrícios contendo agentes antimicrobianos rompem o biofilme subgengival afetando a sua microbiota. O uso de dentifrícios contendo triclosan / copolímero previne a progressão da perda de inserção em adolescentes com alto risco de desenvolver a periodontite precoce e novas perdas de inserção em pacientes com história de periodontite, principalmente na ausência de uma terapia de suporte periodontal, que inclui debridamento subgengival (TELES & TELES, 2009).

A clorexidina, após 20 anos de uso, tem grande participação como agente preventivo e terapêutico na odontologia. O uso frequente de clorexidina pode prevenir o aparecimento de cárie e doença periodontal. A propriedade antimicrobiana prolongada da clorexidina sobre a superfície do dente tem um efeito bactericida e bacteriostático. A base da sua eficácia clínica e seu mecanismo de ação sobre microrganismos é explicada pela ligação dicatiônica à carga negativa da parede bacteriana, desestabilizando o equilíbrio osmótico, provocando uma precipitação ou coagulação do conteúdo citoplasmático que lisa as células. Comparado os produtos para bochechos, desenvolvidos para inibir a

formação do biofilme e o aumento do volume gengival, os que contêm clorexidina são considerados, na odontologia, como padrão ouro (JONES, 1997).

As vantagens da utilização da clorexidina são: o amplo espectro antibacteriano abrangendo bactérias gram-positivas e negativas, e em menor proporção, sobre fungos e leveduras. A substantividade que é a sua capacidade de se ligar aos grupos carboxila da mucina que cobre a mucosa bucal e ser constantemente liberada nessas áreas, de forma ativa. As desvantagens do uso da clorexidina são: não ser virucida nem eficaz contra os bacilos ácido resistentes e o seu uso prolongado apresenta sabor desagradável alterando o paladar e causar manchamento dos dentes, quando utilizado na forma de bochechos (GREENSTEIN *et al.*, 1986; FARDAL & TURNBULI, 1986 ; PUIG SILLA *et al.*, 2008). Entretanto, foi previamente demonstrado em pesquisa clínica que as reações indesejáveis do uso com bochechos diários a 0.12% de clorexidina, como mudanças no paladar, mancha nos dentes e irritação na boca, garganta e língua, desapareceram com o interrompido o tratamento (COSYN, *et al.*, 2005).

As formulações compostas por agentes antimicrobianos têm um papel importante para o controle do biofilme e tem sido extensamente estudadas dentro de normas rígidas e bem aceitas. O uso prolongado de agentes antimicrobianos para combater o biofilme, como a clorexidina e o triclosan, reduzem o biofilme supragengival e a gengivite e na maioria dos casos seu uso não tem reações adversas irreversíveis e também não apresenta resistência microbiana (SREENIVASAN, *et al.*, 2003). Vários produtos para bochechos com

clorexidina são produzidos comercialmente e testados. Estudo anterior comparou formulações de 0.1% com de 0.2% de clorexidina sobre seu efeito na recolonização do biofilme, no desenvolvimento de gengivite e do manchamento dos dentes. Foi observada que a formulação a 0.1% apresentou atividade reduzida e menos manchamento dentário quando comparada com a formulação a 0,2%. (ADDY *et. al.* 1989).

Atualmente as formas mais utilizadas para administrar a clorexidina são na forma de soluções para bochechos em concentrações de 0,12% e 0,2%, aerossóis em concentrações de 0,12% e 0,2%, géis a 0,12% e 1% e vernizes (PIZZO *et al.*, 2006; PUIG SILLA *et al.*, 2008).

Revisões sobre a clorexidina têm sido realizadas pelos pesquisadores, relatando que o verniz de clorexidina tem um efeito inibidor de cárie na dentição permanente de crianças, adolescentes e adultos jovens em relação à frequência e ao tempo de uso. O verniz tem um efeito moderado na inibição da cárie dentária quando aplicada a cada 3-4 meses. Contudo, não há nenhuma evidência do efeito inibitório de cárie dentária com intervalos mais longos entre as aplicações. (ZHANG *et al.*, 2006). Similarmente, outras revisões relataram os efeitos benéficos da aplicação do verniz de clorexidina em pacientes com gengivite crônica, reduzindo o acúmulo do biofilme e o sangramento. Os autores manifestaram que é possível manter esse efeito benéfico por longos períodos de tempo, embora isso requerem novas aplicações de verniz. Esta revisão mostrou a necessidade de novos estudos para avaliar o número e o intervalo de aplicações que oferecem os melhores resultados ao longo do tempo (PUIG

SILLA *et al.*, 2008). O uso de verniz de clorexidina tem sido usado como agente antimicrobiano por ser de fácil aplicação e de comprovada efetividade. Em estudo anterior, os três tipos de vernizes de clorexidina, Cervitec® (Vivadent. Schaan, Liechtenstein), Ec40® (Certichem. Nijmegen, The Netherlands) e Chlorzoin® (Imperial Chemical Industries. Macclesfield, England), apresentaram bons resultados antibacterianos, agindo na prevenção de cárie dentária e na doença periodontal. O Ec40® demonstrou ser superior quando comparado com os outros dois tipos de verniz, pois apresentou grande substantividade com apenas uma aplicação num período reduzido de tempo. Para pacientes com inflamação gengival crônica, as aplicações repetidas com muita frequência podem apresentar bons resultados, sendo indicado para pacientes com aparelho ortodôntico (MATTHIJS *et al.*, 2002).

O EC40® foi testado principalmente para a prevenção da cárie em populações de alto risco. Quando aplicado na superfície oclusal dos dentes de 332 crianças criou-se um reservatório de CHX, podendo suprimir os *Streptococcus mutans* do biofilme supragengival, diminuindo seu potencial cariogênico (COSYN *et al.*, 2005). Entretanto, quando avaliaram o efeito de um verniz de clorexidina com aplicação semestral não foi observado nenhum efeito sobre a redução de cárie oclusal em molares permanentes ou recentemente erupcionados em uma população com baixa prevalência de cárie (FENNIS-LE *et al.*, 1998).

Atualmente, três vernizes de clorexidina são fabricados: Clorzoin®, EC40® e Cervitec®. A baixa atividade bacteriana, a manutenção do equilíbrio da

flora bucal, a excelente absorção da superfície do esmalte e a boa tolerância pelos pacientes são esperados com a aplicação dos vernizes (MATTHIJS *et al.*, 2002; COSYN *et al.*, 2005).

A aplicação do verniz de clorexidina parece ter efeitos benéficos em pacientes com gengivite crônica, melhorando os níveis de acúmulo do biofilme e reduzindo o índice de sangramento. É possível manter estes benefícios por períodos prolongados, requerendo re-aplicações do verniz. Além disto, a aplicação subgengival do verniz com alta concentração de clorexidina apresenta um índice maior nas reduções da profundidade de bolsa quando comparado com tratamentos mecânicos isoladamente (PUIG SILLA *et al.*, 2008).

Para determinar os efeitos do aparelho ortodôntico fixo sobre o periodonto e a microbiota subgengival foi realizado um estudo longitudinal prospectivo (n=32). A gengivite e a profundidade de sondagem foram medidas, seguida da coleta de biofilme subgengival nos mesmos pontos e todos os valores de ambos os parâmetros clínicos e microbiológicos começaram a aumentar após a colocação de aparelhos fixos. Os autores concluíram que o tratamento ortodôntico com aparelho fixo em adolescentes pode transitoriamente aumentar os valores de todos os índices periodontais e estimular o crescimento de microorganismos periodontopatogênicos, mas sem efeitos destrutivos sobre a profundidade dos tecidos periodontais (RISTIC *et al.*, 2007).

A existência de várias formas clínicas da doença periodontal pode estar associada com a microflora subgengival, envolvendo freqüentemente espécies Gram-negativas, microaeróbicas ou anaeróbicas. A *Eikenella corrodens* (Ec) é

um bacilo Gram-negativo facultativo, habitante comum da cavidade bucal e é encontrada no biofilme supra e subgengival em indivíduos periodontalmente saudáveis. Entretanto, a Ec é reconhecida como uma bactéria patogênica humana capaz de causar infecções extra-orais locais ou generalizadas, apesar de que seu papel na etiologia da doença periodontal não é bem compreendido. Os estudos transversais e longitudinais sobre a Ec mostraram maior presença em amostras de biofilme subgengival de pacientes com doença periodontal do que em indivíduos periodontalmente saudáveis (CHEN *et al.*, 1992).

A Ec pode causar doenças com sua produção de endotoxinas e a sua cápsula polissacarídea externa inibe a fagocitose do macrófago (APOLÔNIO *et al.*, 2008). Há evidências de que a Ec está associada com a periodontite agressiva e crônica (CHEN & WILSON, 1992), além disso, este microrganismo foi isolado de biofilme em pacientes que não apresentavam doença periodontal. Estudos têm demonstrado que 10% das amostras coletadas do biofilme em programas de saúde foi positiva para Ec (SOCRANSKY *et al.*, 1988).

Com o intuito de entender melhor esses fenômenos microbiológicos, novos métodos, como a biologia molecular, tem sido usados pelos pesquisadores. Um método altamente sensível e específico para detecção e quantificação de bactérias envolvidas na doença periodontal, como a *Prevotella intermédia* (Pi) é a reação em cadeia de Polimerasa (PCR) em tempo real. Esse método é de grande importância para novos estudos microbiológicos da doença periodontal (KUBONIWA, *et al.*, 2004).

Essas novas técnicas de biologia molecular permitem identificar mais de 700 espécies que podem colonizar a cavidade bucal. (PEREA, 2004). O biofilme agrega uma ampla variedade de bactérias. Muitas espécies têm sido associadas com a etiologia do aumento gengival, bem como com a doença periodontal.

Os microorganismos mais freqüentemente associados à doença periodontal são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. No que diz respeito ao aumento gengival, o *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e a Ec são freqüentemente associados com esta alteração (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2005).

O Fn é um gênero de filamentosas, anaeróbias, Gram-negativas, semelhante aos bacteróides. Esta espécie é freqüentemente isolada do sulco gengival humano (HOLT *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2005). O Fn contribui para o desenvolvimento de doenças periodontais, que produzem endotoxinas que podem induzir um processo inflamatório ou causar danos diretos ao periodonto (SLOTS & RAMS, 1990; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; BOLSTAD *et al.*, 1996; KAUR & FALKER, 1992; SCHENKEIN *et al.*, 1993). No entanto, o dano potencial ao periodonto permanece controverso. É possível que a associação entre outras espécies pareça ser fundamental para a transição entre a saúde e a doença (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994).

Prevotella intermedia (Pi) e *Prevotella nigrescens* são patógenos gram-negativos anaeróbios envolvidos nas infecções periodontais, incluindo gengivite

e periodontite. A Pi está associada com a gengivite ulcerativa necrosante aguda (ANUG) e doença periodontal associada à infecção pelo HIV (JOUSIMIES-SOMER, 1995; MAEDA *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2006).

Estudos microbiológicos foram delineados para verificar as mudanças dos níveis de patógenos periodontais durante e após o tratamento ortodôntico em adolescentes. Os microorganismos quantificados foram 8 bactérias por meio de análise de DNA, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, and *Campylobacter rectus*. Verificou-se que, após 6 meses desde o início do tratamento ortodôntico, houve aumento contínuo da contagem do número de bactérias. Porém, após este período, houve uma estabilização e nenhuma bactéria apresentou aumento significativo. Os autores concluíram que o tratamento ortodôntico não causa risco para a saúde periodontal pelo aumento destas bactérias (THORNBERG *et al.*, 2009).

O presente estudo foi delineado para analisar os efeitos do verniz de clorexidina (40%), nos microorganismos periodontopatogênicos (*Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*) no sulco gengival e no aumento do volume gengival em pacientes sob tratamento ortodôntico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do verniz de clorexidina sobre o volume gengival aumentado e sobre microorganismos periodontopatogênicos presentes no sulco gengival de pacientes sob tratamento ortodôntico.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do uso do verniz de clorexidina a 40% no volume gengival aumento de pacientes em tratamento ortodôntico, no dia zero (T0) e após 14 (T14) e 56 (T56) dias.

2. Identificar e quantificar as bactérias *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* presentes no sulco gengival em pacientes sob tratamento ortodôntico, nos tempos T0, T14 e T56 e avaliar o efeito do verniz de clorexidina 40% sobre a contagem bacteriana comparado com o grupo controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo clínico prospectivo tipo "split-mouth", cego, desenhado para observar o efeito de um verniz contendo clorexidina a 40%, sobre a microbiota periodontopatogênica subgingival e na alteração do volume gengival em pacientes sob tratamento ortodôntico. Foram selecionados 30 pacientes da clínica de especialização em Ortodontia da Universidade Federal de Minas Gerais para participar do estudo.

As variáveis, volume gengival (mensurado indiretamente pela área (mm²) da face vestibular dos segundos pré-molares superiores) e contagem das bactérias *Eikenella corrodens* (Ec), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Prevotella intermedia* (Pi) (realizada por meio da técnica de *PCR - Real time*), foram medidas no exame inicial (T0), após 14 (T14) e 56 (T56) dias. Os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes de ANOVA, Turkey-Krammer e Friedman.

3.2. Participantes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, em 23 de junho de 2008 (Processo n.º. 114/8). Selecionou-se 30 pacientes para o estudo que pertenciam à clínica de ortodontia da universidade e receberam logo após a colocação do aparelho fixo, instruções de higiene oral com a técnica de Bass e uso do fio dental. Os

pacientes e seus respectivos responsáveis foram informados do objetivo e conteúdo do estudo autorizando-o através dos termos de consentimento livre e esclarecido para a participação na pesquisa (ANEXOS 1 e 2).

3.2.1. Critérios de inclusão

Como critérios de inclusão, definiu-se: ter entre 12 e 17 anos de idade; apresentar-se com o aparelho instalado há mais de 6 meses (HUSER *et al.*, 1990); presença de aumento gengival grau 2 (INGLÉS *et al.*, 1999) nos pré-molares e molares superiores.

3.2.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo aqueles pacientes que apresentavam qualquer outro fator que pudesse interferir no aumento do volume gengival provocado pela retenção de biofilme decorrente do uso de aparelho ortodôntico: antibiótico-terapia nos últimos três meses ou durante o período da pesquisa; uso de anticoagulantes, drogas bloqueadoras do canal de cálcio ou qualquer outro tipo de medicamento que provocasse aumento de volume gengival; grávidas e/ou lactantes; presença de doenças hepáticas, renais ou gastrointestinais; presença de qualquer sinal de candidíase; uso de clorexidina como bochecho ou dentifrício; relato de reações alérgicas a quaisquer componentes do verniz; cirurgia periodontal nos últimos 4 meses; tratamento restaurador, no dente estudado, nos últimos 4 meses; exodontia de dentes adjacentes àqueles a serem estudados nos últimos 4 meses e fumantes (SUTCLIFFE, 1972).

3.3. Avaliação do grau do aumento gengival

O método utilizado para determinar o grau de aumento gengival foi elaborado baseado na classificação de Inglés *et al.*, (1999):

Grau 0: Gengiva sem aumento e firmemente aderida ao osso alveolar, no limite amelo-dentinário. Sem aparência pontilhada ou granular (figura 1A).

Grau 1: Gengiva com pequeno aumento, sem invadir a coroa clínica. Aparência pontilhada e granular (figura 1B).

Grau 2: Gengiva com aumento moderado e incremento coronal e lateral, invadindo até 1/3 da coroa clínica. Aspecto globoso (figura 1C).

Grau 3: Gengiva com aumento marcante, invadindo até 2/3 da coroa clínica. Aspecto globoso irregular (figura 1D).

Grau 4: Gengiva com aumento grave, engrossada, cobrindo mais que 2/3 da coroa clínica. Aspecto irregular friável (figura 1E).



Figura 1. Graus de aumento gengival: (A) Grau 0; (B) Grau 1; (C) Grau 2; (D) Grau 3 e (E) Grau 4.

O pesquisador recebeu treinamento para o diagnóstico do aumento gengival com um especialista em periodontia. Após a discussão teórica dos códigos e critérios, foram avaliadas 60 fotografias digitais da região de pré-molares e molares, independente da amostra, ilustrando os diferentes graus de

aumento gengival. O pesquisador repetiu a avaliação com intervalo de uma semana. A concordância intra-examinador obtida foi ótima ($Kw=0,92$).

3.4. Análise clínica do aumento do volume gengival

Participaram deste estudo, somente pacientes apresentando grau 2 de aumento gengival. Os pacientes apresentando os graus 3 e 4 foram indicados para a remoção do aparelho para restabelecimento da normalidade gengival e os pacientes com grau 0 e 1 não apresentavam alterações gengivais significativas para justificar a inclusão.

3.5. Obtenção de imagens

Após a seleção clínica dos pacientes, realizaram-se fotografias intra-orais laterais direita e esquerda, para análise da área (mm^2) da face vestibular dos segundos pré-molares superiores em todos os tempos da pesquisa (T0, T14 e T56), com câmera fotográfica digital*. Todas as fotografias foram realizadas pelo pesquisador, com foco fixo em 1:1 e a largura méso-distal do dente avaliado foi mensurada para estabelecer um padrão na angulação da tomada fotográfica.

*Canon Rebel XT, **Canon U.S.A., Inc.**, One Canon Plaza, Lake Success, NY 11042, USA.

3.6. Coleta subgengival

A coleta do biofilme foi realizada no sulco vestibular mesial e distal dos segundos pré-molares superiores de ambos os lados, em decorrência da maior frequência de detecção de aumento gengival e menor possibilidade de contaminação por saliva. As amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 1.0 mL de água Milli-Q® estéril (figura 2).



Figura 2. Coleta subgengival por meio de cone de papel absorvente esterilizado.

Após isolamento relativo da área com rolo de algodão, cones de papel absorvente número 30, esterilizados, foram inseridos nos sítios periodontais estabelecidos, onde permaneceram por 60s. Em seguida, foram removidos e transferidos para tubos *Eppendorf* contendo 1.0 mL de água Milli-Q® estéril. O material foi transportado para o Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG no prazo máximo de 2h.

Uma segunda coleta foi realizada 14 dias e uma terceira coleta 56 dias após a primeira aplicação do verniz de clorexidina.

3.7. Aplicação dos tratamentos

Após a primeira coleta, foi realizado polimento coronário com pasta de pedra pomes e água com uso de escova de Robson, nas superfícies de todos os dentes. Em seguida, foi realizada a aplicação dos tratamentos. Os lados controle e tratamento foram definidos por meio de sorteio. No lado tratamento foi aplicado o verniz de clorexidina 40% e o lado controle foi aplicado verniz sem clorexidina. O paciente não sabia em qual lado era aplicado o verniz com clorexidina.

O verniz utilizado foi o EC40® (Biodent, Arnhem, Netherlands) que apresenta 40% CHX, 36% sandarac, e 24% etanol. O verniz aplicado no lado controle apresentava 60% de sandarac e 40% de etanol, fabricado pela farmácia de manipulação Fórmula & Ação (São Paulo, São Paulo, Brasil).

O exesso de verniz foi removido após 7 minutos da aplicação e os participantes foram instruídos a não comer e beber por 3 horas e não higienizar os dentes até o dia seguinte.

Foram passadas orientações verbais e por escrito para que os pacientes não alterassem seu padrão de higienização durante o experimento.

3.8. Análise das imagens

As fotografias digitais foram transferidas para o computador e usando o programa Rapid Sketch® V.2.4 (RODRIGUES *et al.*, 2010) as margens vestibulares dos segundos pré-molares superiores foram demarcadas. O programa calculou a área em mm² (figura 3).

Esta análise foi realizada e posteriormente comparada nos 3 tempos da pesquisa, T0, T14 e T56.

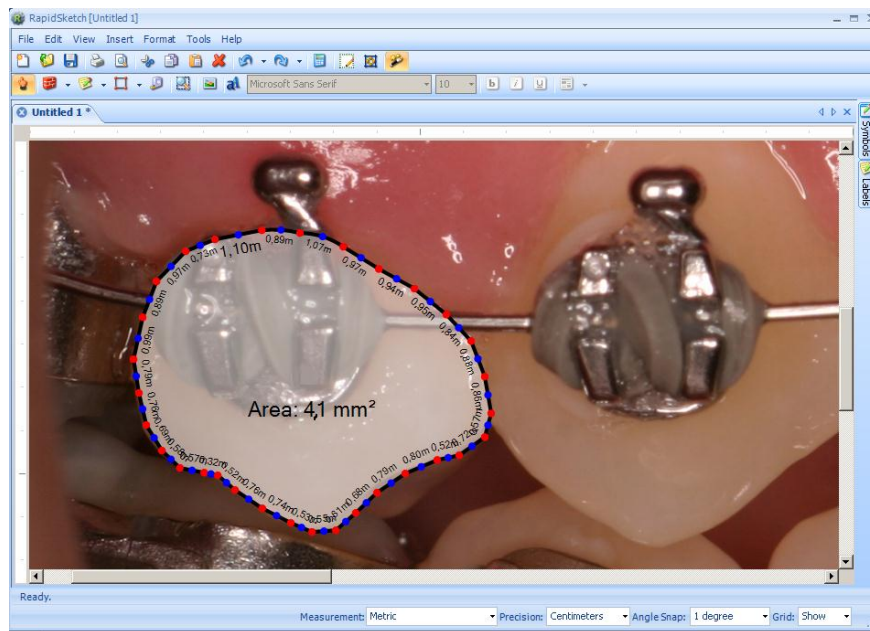


Figura 3. Área da vestibular do segundo pré-molar superior demarcada e mensurada no programa Rapid Sketch® V.2.4 (RapidSketch®).

3.9. Análise Microbiológica

Os microorganismos escolhidos foram o Ec, Pi e Fn, pela sua relação na doença periodontal em pacientes mais jovens e da possível prevalência no sulco gengival de pacientes em tratamento ortodôntico com risco de periodontite (ALBANDAR & RAMS, 2002; THORNBERG *et al.*, 2009)

3.9.1 Extração do DNA

O material coletado foi submetido à agitação em vortex e centrifugado a 12000 x g, a 4°C, por 30min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento

mantido em freezer -80°C até o momento de sua utilização para extração de DNA.

O DNA dos microorganismos periodontais selvagens foi extraído pelo método do fenolclorofórmio (FOX *et al.*, 1994). Ao sedimento, foram acrescentados tampão STET (sacarose 11 8%, Tris-HCl 50mM, EDTA 12 50mM, Triton X-100 13 0,1%; pH 8,0) e lisozima (concentração final $6\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A mistura foi incubada a 37°C , por 12min e, a seguir, foram adicionados SDS (concentração final 1,5%) e RNase (concentração final $0,02\mu\text{g}/\mu\text{L}$). O material foi homogeneizado e, após 1h de incubação a 37°C , foi adicionada proteinase K (concentração final $0,7\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 37°C , *overnight*. Após este período, foram adicionados NaCl (concentração final $0,7\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) e solução contendo partes iguais de CTAB 5% e NaCl 0,7M (concentração final 1:10), a suspensão agitada delicadamente e incubada por 10min, a 56°C . O DNA foi, então, extraído em igual volume de fenol e clorofórmio (1:1) e precipitado com acetato de sódio 0,3M (concentração final $2,6\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) e, aproximadamente, dois volumes de etanol absoluto, a -20°C , *overnight*. A suspensão foi centrifugada a $12000 \times g$, por 75min e, após evaporação do etanol residual, foram acrescentados dois volumes de etanol 70%. O material foi, novamente, centrifugado a $12000 \times g$, por 25min, e o sedimento de DNA foi diluído em água Milli-Q® esterilizada.

A extração de DNA das amostras bacterianas de referência, empregadas como controle foi feito através do método fenolclorofórmio descrito anteriormente.

Os sedimentos de culturas bacterianas das amostras isoladas foram homogeneizados em 500µL de água Milli-Q® e incubados a -80°C, por 5min. O sobrenadante foi transferido para tubo de microcentrífuga e diluído 50 vezes. A concentração de DNA e a relação DNA/proteína foram avaliadas em espectrofotômetro *Nanodrop* ND-100023 e o material foi acondicionado em freezer a -20°C.

3.9.2. PCR em tempo real

Protocolos previamente propostos foram selecionados para identificação e quantificação dos microrganismos de interesse para o estudo. Foram empregados iniciadores espécie-específicos, *Ec* (F: 5'-GGGAAGAAAAGGGAAGTGCT - 3' / R: 5'- TCTTCAGGTACCGTCAGCAAAA-3'), *Fn* (F: 5'- CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT-3' / R: 5'-TGGTCCTCACTGATTCACACAGA-3') e *Pi* (F: 5'-AATACCCGATGTTGTCCACA-3' / R: 5'- TTAGCCGGTCCTTATTCGAA-3'). Todas as reações foram realizadas em duplicata. A confirmação da ocorrência de hibridização entre iniciadores e DNA do microrganismo alvo e da inexistência de reação cruzada foi realizada por análise *in silico*, com o auxílio do programa *Blast*. Tamanho, peso molecular, conteúdo G + C e temperatura de dissociação dos *amplicons* também foram avaliados.

O desenvolvimento e a validação das análises por PCR em tempo real foram descritos em detalhe por Maeda *et al.*, (2003), Kato *et al.*, (2005) e Kozarov *et al.*, (2006). As reações foram realizadas em um volume total de 20µL,

contendo 0,25 μ M de cada iniciador. Foi utilizado o seguinte programa de reação para Pi: 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. Para Ec, a amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 15s e 60°C por 1min. Para Fn, foi empregado o seguinte protocolo: 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 10s, 65°C por 10s e 72°C por 20s.

As reações foram realizadas em termociclador *Step One Real Time PCR Systems*, empregando-se o kit *SYBR Green PCR Master Mix 2X*. Os resultados foram analisados com o auxílio do *software Step One 2.1*. Em cada lote de reações, foram incluídos o controle positivo e negativo interno (água Milli Q® estéril).

A análise dos perfis de amplificação foi baseada no ciclo no qual o Ct é atingido e os resultados obtidos foram corrigidos automaticamente pelo *software*, de acordo com o valor correspondente ao nível basal de fluorescência, medido nos primeiros ciclos da reação, antes da detecção de amplificação.

No que se refere à avaliação de especificidade, dois procedimentos foram executados. No primeiro procedimento, a análise das curvas de dissociação, foi realizado ao final de cada reação (Gráfico 1), para distinguir o sinal de fluorescência originado dos *amplicons* específicos daqueles relacionados com dimerização de iniciadores ou outros artefatos. A avaliação foi feita entre 60°C e 95°C, com coleta de dados em intervalos de 0,1°C. Com o mesmo objetivo, foram realizadas reações utilizando como molde um *mix* contendo DNA de todas

as amostras bacterianas de referência utilizadas no estudo, exceto a amostra alvo para o par de iniciadores em questão.

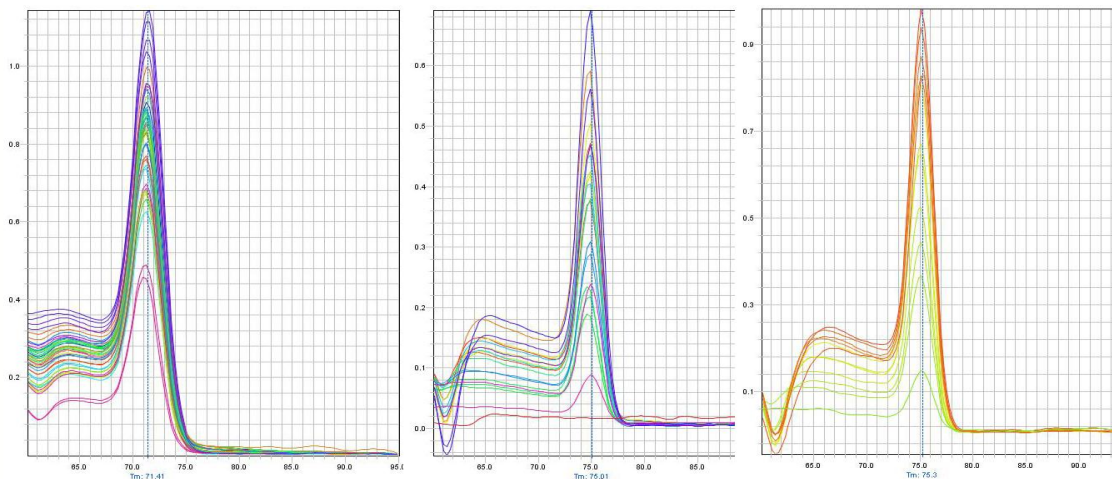


Gráfico 1. Curvas padrão de PCR em tempo real das amostras bacterianas de referência.

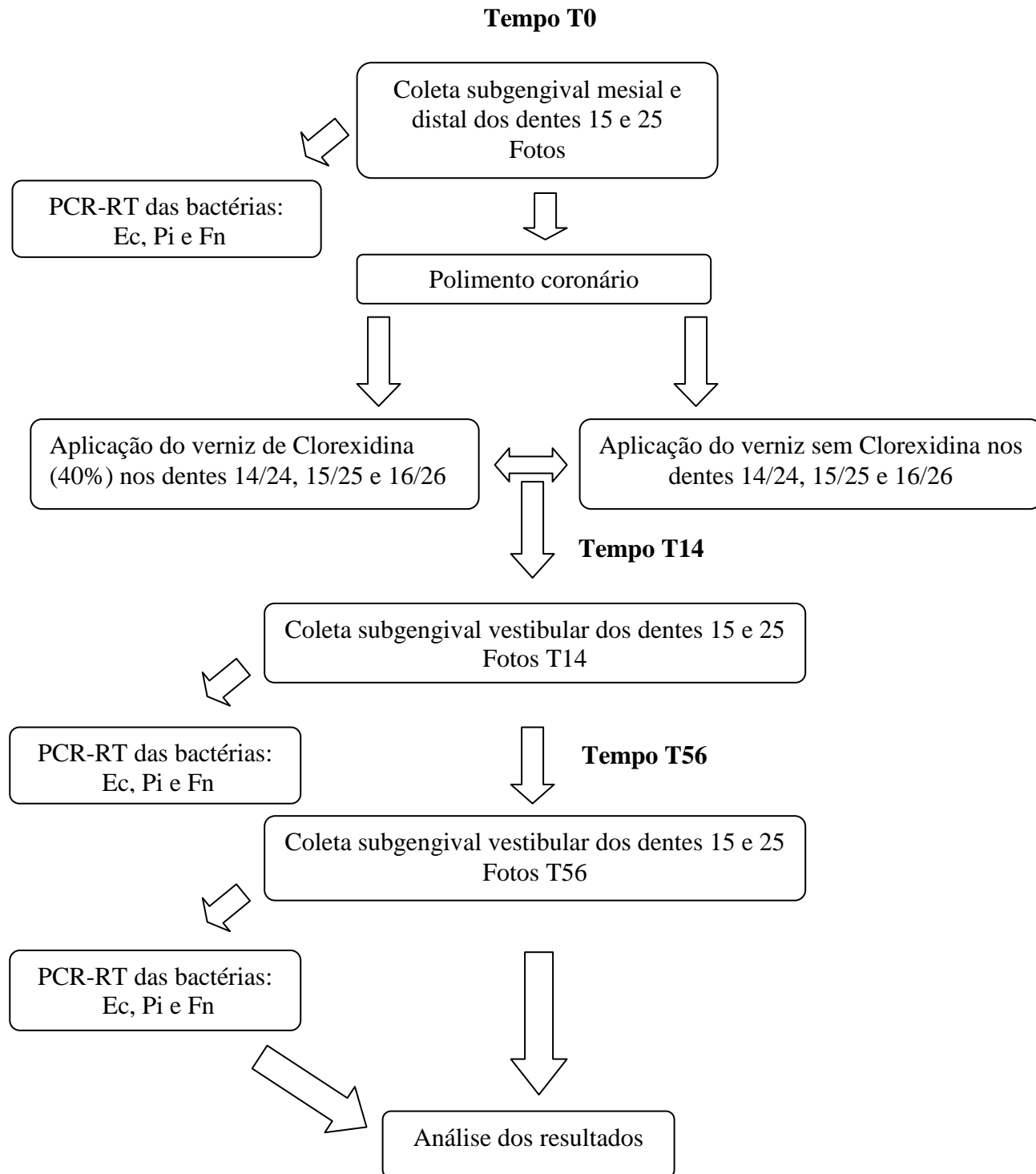
Os valores das concentrações dos produtos amplificados calculados em g/ μ L foram, então, convertidos para número de moléculas de DNA/ μ L da seguinte forma: os dados foram, inicialmente, expressos em g/ μ L e, em seguida, divididos pelo valor correspondente ao peso molecular do *amplicon*, obtido através de análise *in silico* dos iniciadores utilizados, e pelo número de cópias do *rrn* de cada grupo bacteriano utilizado na padronização da reação, quando possível. Posteriormente, os resultados foram multiplicados pela constante de Avogadro e, então, a concentração do produto amplificado foi expressa em número de moléculas de DNA/ μ L.

Os limites de detecção das reações de amplificação e a linearidade das curvas padrão foram verificados utilizando diluições decimais seriadas dos produtos de PCR gerados pela amplificação do rDNA 16S das amostras de

referência empregadas. Foram realizadas diluições decimais dos *amplicons* para obtenção de concentrações da ordem de 10^7 a 10^2 moléculas de DNA/ μ L. Alíquotas das diluições foram incluídas, em duplicata, em cada placa de reação. As análises de especificidade e eficiência das reações e o cálculo do R² foram realizados com auxílio do *software Step One Systems*.

No que se refere a PCR em tempo real, todas os ensaios foram positivos para as espécies alvo correspondentes, como confirmado pela utilização de amostras de referência. Não ocorreram reações cruzadas, como demonstrado pela análise das curvas de dissociação e pelos resultados das reações nas quais DNA de amostras bacterianas não alvo foi empregado. As reações foram reprodutíveis, conforme observado pela comparação dos resultados das duplicatas. Os controles negativo (mix de DNA de bactérias não alvo) e negativo interno (água quimicamente pura esterilizada) não exibiram sinal de fluorescência.

As curvas padrão obtidas para todos os microrganismos estudados mostraram-se lineares, com valores de R² superiores a 0,98. Estas observações demonstram que os ensaios de PCR em tempo real, empregados no estudo, apresentaram sensibilidade e especificidade adequadas aos objetivos da investigação (Gráfico 1).

Fluxograma da metodologia da pesquisa

3.10. Análise estatística

Foi utilizado o teste estatístico ANOVA (one-way com medidas repetidas), considerando que o delineamento utilizado foi de blocos casualizados em arranjo de parcelas subdivididas. Isto possibilitou avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo, bem como se houve interação entre os fatores em questão. As médias das áreas foram comparadas, por meio do teste de Tukey-Kramer, que sendo um teste *post hoc*, permitiu que os valores críticos para as diferenças fossem ponderados de acordo com os erros da parcela e da subparcela.

Para comparar os grupos teste e controle quanto a quantificação dos microorganismos, os grupos que apresentaram distribuição normal (*Ec* e *Fn*) foram analisadas por testes de ANOVA e Tukey-Kramer. O teste de Friedman foi empregado para comparar as medianas da bactéria *Pi*, que não apresentou distribuição normal.

Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos intitulados:

Artigo 1

Effect of chlorhexidine varnish on gingival growth in orthodontic patients - a prospective split-mouth study

Artigo 2

Effect of chlorhexidine varnish on bacterial quantification in orthodontic patients with gingival growth.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADDY M. et al. Comparison of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. Staining and antimicrobial effects in vitro. Clin Prev. Dent., Norwalk, v.11, p. 10-4, 1989.
2. ALBANDAR J, RAMS TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. Periodontol 2000. v.29, p. 207-22, 2002.
3. ALVES ACBA, et al. Increase in probing depth is correlated with a higher number of *Prevotella intermedia* genotypes. J Periodontol. v.77, p.61-6, 2006
4. APOLÔNIO AC, et al. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. J. Appl. Microbiol. v.104, p.508-14, 2008.
5. AY ZY, et al. Appropriate oral hygiene motivation method for patients with fixed appliances. Angle Orthod. v.77, n.6, p.1085-9, 2007.
6. BOLSTAD AL, JENSEN HB, BAKKEN V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clinical Microbiology Reviews v.9, p.55-7, 1996.
7. CHANG HS, WALSH LJ, FREER TJ. The effect of orthodontic treatment on salivary flow, pH, buffer capacity, and levels of mutans streptococci and lactobacilli. Aust Orthod J. v.15, n.4, p. 229-34, 1999.
8. CHANG HS, WALSH LJ, FREER TJ. Enamel demineralization during orthodontic treatment. Aetiology and prevention. Aust Dent J. v.42, n.5, p. 322-7, 1997.

9. CHEN CKC, WILSON ME. *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. J. Periodontol. v. 63: p. 941-53, 1992.
10. COSTA MR, et al. Effects of ultrasonic, electric, and manual toothbrushes on subgingival plaque composition in orthodontically banded molars. Am J Orthod Dentofacial Orthop. v. 137, n. 2, p. 229-35, 2010.
11. COSYN J, et al. chlorhexidine varnish implemented treatment strategy for chronic periodontitis. J Clin Periodontol. v. 32, p. 750–6, 2005.
12. DERKS A, et al. Effect of chlorhexidine varnish application on mutans streptococci counts in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop. v. 133, n. 3, p. 435-9, 2008.
13. FARDAL O, TURNBULL RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. JADA. v. 112, n. 6, p. 863-9, 1986.
14. FENNIS-LE YL, et al. Effect of 6-monthly applications of chlorhexidine varnish on incidence of occlusal caries in permanent molars: a 3-year study Journal of Dentistry. v. 26, n. 3, p. 233-8, 1998.
15. FOX C, WHYTE AS, MACDONALD M. Laboratory request forms. Br J Gen Pract. v. 44, n. 389, p. 590, 1994.
16. GOH HH. Interspace/interdental brushes for oral hygiene in orthodontic patients with fixed appliances. Cochrane Database Syst Rev. v. 18, n. 3, p. CD005410, 2007.
17. GREENSTEIN G, BERMAN C, JAFFIN R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol. v. 57, p. 364- 77, 1986.

18. HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000. v. 5, p. 78-111, 2000.
19. HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol* 2000. v. 38, p. 9-12, 2005.
20. HEINTZE SD. A profilaxia individual em pacientes com aparelhos fixos – recomendações para o consultório. *Ortodontia*. v. 29, n. 2, 4-15, 1996.
21. HEINTZE SD. Oral health for the orthodontic patient. Quintessence. Illinois. p. 66-77, 1998.
22. HOLT JG, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 9.ed. 1994. 787p.
23. HUSER MC, BAEHNI PC, LANG R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. v. 8, p. 97-213, 1990.
24. INGLÉS E, ROSSMANN JA, CAFFESSE RG. New clinical index for drug-induced gingival overgrowth *Quintessence int*. v. 30, 467-73, 1999.
25. JONES CG. Chlorhexidine: is it still the gold standart? *Periodontol* 2000. v. 15, p. 55-62, 1997.
26. JOUSIMIES-SOMER HR. Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristic of pigmented anaerobic Gram negative rod. *Clin. Infect. Dis*. v. 20, p. 187-91, 1995.

27. KATO Y, SAIGO K, WADA T. A novel method for the synthesis of DNA using 2'-deoxyribonucleoside 5'-phosphites as monomer units. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. v. 49, 129-30, 2005.
28. KAUR M, FALKER WA JR. Characterization of shared antigens of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum*. *Oral Microbiol. Immunol*. v. 7, p. 291-8, 1992.
29. KOZAROV E, et al. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.*; v. 8, n. 3, p. 687-93, 2006.
30. KUBONIWA M, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol. Immunol*. v. 19, p. 168-76, 2004.
31. LARA-CARRILLO E, et al. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 Apr. in press.
32. LOVROV S, HERTRICH K, HIRSCHFELDER U. Enamel Demineralization during Fixed Orthodontic Treatment - Incidence and Correlation to Various Oral-hygiene Parameters. *J Orofac Orthop*. v. 68, n. 5, p. 353-63, 2007.
33. MAEDA N, et al. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. *Microbiol. Immunol*. v. 42, p. 583-9, 1998.
34. MAEDA H, et al. Quantitative realtime PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas*

- gingivalis, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* v. 39, p. 81-6, 2003.
35. MANDALL NA, et al. Orthodontic adhesives: a systematic review *Journal of Orthodontics.* v. 29, p. 205–10, 2002.
36. MATTHIJS S, ADRIAENS PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol.* v. 29, n. 1, p. 1-8, 2002.
37. OPSAHL VITAL S, et al. Caries risk and orthodontic treatment. *Int Orthod.* v. 8, n. 1, p. 28-45, 2010.
38. PEREA EJ. Oral flora in the age of molecular biology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* v. 9, 6-10; 1-5, 2004.
39. PIZZO G, et al. The effects of antimicrobial sprays and mouthrinses on supragingival plaque regrowth: a comparative study. *J Periodontol.* v. 77, n. 2, p. 248-56, 2006.
40. PUIG SILLA M, MONTIEL COMPANY JM, ALMERICH SILLA JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* v. 13, n. 4, p. 257-60, 2008.
41. RISTIC M, et al. O.Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod Craniofac Res.* v. 10, n. 4, p. 187-95, 2007.
42. RISTIC M, et al. O.Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora. *Int J Dent Hyg.* v. 6, n. 2, p. 129-36, 2008.

43. RODRIGUES GG, et al. Gingival volume measure through the analysis of tooth crown area – A digital and computerized. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry. In press 2010.
44. SCHENKEL HA, et al. The influence of race and gender on periodontal microflora. J. Periodontol. v. 64, p. 292-6, 1993.
45. SILVA VL, et al. Enhanced pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum* adapted to oxidative stress. Microb. Pathog. v. 39, p. 131-8, 2005.
46. SLOTS J, RAMS TE. Antibiotics in periodontal therapy; advantages and disadvantages. J. Clin. Periodontol. v. 17, p. 479-93, 1990.
47. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, DZINK JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. J. Clin. Periodontol. v.15, p. 440-4, 1988.
48. SREENIVASAN PK, et al. A rapid procedure to ascertain the antimicrobial efficacy of oral care formulations. Oral Microbiol Immunol. v. 18, n. 6, p. 371-8, 2003.
49. SREENIVASAN P, GAFFAR A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. J Clin Periodontol. v. 29, n. 11, p. 965-74, 2002.
50. STEFANI CM, DE LIMA AFM. Avaliação dos efeitos clínicos da aplicação de gel de clorexidina em pacientes sob tratamento ortodôntico. Periodontia. v. 5, n. 3, p. 300-5, 1996.
51. SUKONTAPATIPARK W, et al. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. Eur J Orthod. v. 23, n. 5, p. 475-84, 2001.

52. SUTCLIFFE PA. longitudinal study of gingivitis and puberty. J. Periodontal Res. v.7, p. 52, 1972.
53. TAMBURUS VS, BAGATIN CR, SILVA NETTO CR. Higiene bucal no tratamento ortodôntico. Importância da motivação. Rev Fac Odontol Lins. v. 11, n. 1, p. 51-7, 1998.
54. TELES RP, TELES FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? Braz Oral Res. v. 23, p. 39-48, 2009.
55. THORNBERG MJ, et al. Periodontal pathogen levels in adolescents before, during, and after fixed orthodontic appliance therapy. Am J Orthod Dentofacial Orthop. v. 135, n. 1, p. 95-8, 2009.
56. ZHANG Q, et al. Effect of 40% chlorhexidine varnish on mutans streptococci counts in pits and fissures of permanent first molars. J Dent. 2007 v. 35, n. 7, p. 588-92, 2007.

Effect of chlorhexidine varnish on gingival growth in orthodontic patients - a prospective split-mouth study

SUMMARY: The aim of this prospective split-mouth blind study was to analyze the effect of a 40% chlorhexidine varnish on gingival growth of patients with orthodontic fixed appliances. Healthy teenage patients ($n=30$) with fixed orthodontic appliances and increased gingival volume were recruited. An application of varnishes occurred on the vestibular area of the upper superior premolars and first molar crowns, randomly on the control side (placebo varnish) or on the experimental side (EC40[®] Biodentic chlorhexidine varnish). In order to establish a baseline registration, digital photographs were taken by a trained photographer before varnish application at baseline (T0), as well as 14 days (T14) and 56 days (T56) after the application. The gingival volume was calculated indirectly using the vestibular areas (mm^2) of the upper second premolar's clinical crowns that were measured by the program Rapid Sketch[®] V.2.4 at all times. The scores were analyzed using ANOVA and the Turkey-Krammer test. At T0, the control and treatment groups were similar. At T14 and T56, a progressive reduction of the clinical crown area was seen in the control group, whereas an increase in the average area with time was detected in the experimental group. The use of 40% chlorhexidine varnish decreased the gingival overgrowth in patients undergoing orthodontic treatment. Further studies are necessary to set the action time and frequency of application.

KEY WORDS: Chlorhexidine varnish; gingival growth; orthodontic patients; split-mouth.

INTRODUCTION

During orthodontic therapy, patients undergoing fixed appliances have additional plaque build-up, as well as increased stimulated salivary flow rate and inflammatory reaction of gingival tissue (Lara-Carrillo *et al.*, 2010; Ristic *et al.*, 2008; Ristic *et al.*, 2007). Plaque increases around bands, orthodontic adhesives, and brackets; the composition of the oral flora changes; and cleaning becomes more difficult for the patient (Chang *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999; Mandall *et al.*, 2002). The brackets, bands, and other accessories hinder the cleaning, which can cause enamel demineralization, dental cavities, and gingival swelling (Lovrov *et al.*, 2007; Ristic *et al.*, 2007). The appearance of lesions during orthodontic treatment can be explained firstly by inadequate plaque control as a result of the congestion created by the intraoral devices (Sukontapatipark *et al.*, 2001).

Orthodontic patients need to implement an oral hygiene preventive program and pay closer attention to oral hygiene (Derks *et al.*, 2008; Opsahl Vital *et al.*, 2010), which is particularly difficult to maintain when bands, wires, and other accessories are present. The effective control of dental plaque by mechanical methods suffer some limitations in fixed orthodontic appliances patients (Costa *et al.*, 2010; Goh, 2007).

With the implementation and application of oral health preventive programs for patients with fixed appliances, we can motivate them to improve their oral health and, under clinical supervision, be more successful in the elimination of plaque and inflammatory symptoms in these patients (Ay *et al.*, 2007).

Thus, the important role of chemical agents for the improvement of oral health should be considered. The use of chemical agents (mouthrinses or dentifrices) might help reduce the accumulation of biofilms on soft tissue surfaces of the oral cavity, potentially delaying plaque accumulation on teeth. Antimicrobial agents, such as essential oil mouthrinses and dentifrices containing triclosan/copolymer, might affect the subgingival microbiota through the disruption of the contiguous supragingival plaque. Similarly, the use of a dentifrice containing triclosan/copolymer might prevent the progression of attachment loss in adolescents with a high risk of developing “early periodontitis” and might prevent further loss of attachment in patients with a history of periodontitis, particularly in the absence of a supportive periodontal therapy that includes subgingival debridement (Teles and Teles, 2009).

The use of chlorhexidine as a preventive agent for caries and gingival disease is common. The mechanism of action of chlorhexidine on microorganisms is explained by the cationic ligation to the negatively charged cell walls, destabilizing their osmotic balance, causing a precipitation or coagulation of the cytoplasmic content that kills the cells. Chlorhexidine is considered the gold standard of antimicrobial mouthrinses in dentistry (Jones, 1997).

Chlorhexidine use has its advantages. Its anti-bacterial spectrum covers gram-positive and gram-negative bacteria fungi and yeasts to a lesser extent. Its substantivity, the ability of an agent to be retained in particular surroundings, is due to its ability to bind to the carboxyl groups of the mucin that covers the oral mucus and to be steadily released from these areas in an active form, displaced by the calcium ions segregated by the salivary glands. The use of chlorhexidine also has its disadvantages. It is not a virucide, nor is it effective against acid-alcohol resistant bacilli. Its taste is unpleasant and staining of teeth occurs when used in the form of mouthwashes for a long term (Greenstein *et al.*, 1986; Fardal and Turnbull, 1986; Puig Silla *et al.*, 2008).

The vehicles most often used to administer chlorhexidine are mouthrinses (at concentrations of 0.12% and 0.2%), aerosols (0.12% and 0.2%), gels (0.12% and 1%), and varnishes (Pizzo *et al.*, 2006; Puig Silla *et al.*, 2008).

The varnishes have been developed over the past decade. They are the most effective form for professional application of chlorhexidine, as they are easy to apply, do not require collaboration by the patient, and although they have an unpleasant flavor, they do not cause discoloration (Matthijs *et al.*, 2002). Initially, the varnish with chlorhexidine was tested for the prevention of caries in high-risk populations and was implemented as a treatment strategy for chronic periodontitis (Fennis-le *et al.*, 1998; Cosyn *et al.*, 2005). Currently, 3 chlorhexidine varnishes are manufactured: Clorzoin®, EC40®, and Cervitec®. The composition and chlorhexidine concentration of EC40® varnish are 40% chlorhexidine, 36% sandarac, and 24% ethanol. Indeed, by numerous

applications of EC40® on the tooth surface, a reservoir of CHX is created, suppressing the microorganisms in the supragingival plaque, and thus, lowering their pathogenic potential.

The use of varnish avoids the undesirable effects of chlorhexidine such as altered taste, extrinsic staining of the enamel, and the need for patient cooperation. A low bacterial activity, maintenance of oral flora balance, excellent absorption by the enamel surface, and well-tolerance by patients are expected (Matthijs *et al.*, 2002; Cosyn *et al.*, 2005).

Therefore, treatment strategies using chlorhexidine varnish to prevent early microbial recolonization ultimately ensure the best chance for clinical improvements. EC40® is notably a highly concentrated, easy-to-use CHX varnish which can be injected into the periodontal pocket. To date, this varnish was mainly tested for the prevention of caries in high-risk populations (Cosyn *et al.*, 2005; Fennis-le *et al.*, 1998).

The aim of this prospective clinical split-mouth study was to analyze the effects of a 40% chlorhexidine varnish in gingival growth of patients undergoing orthodontic treatment.

SUBJECTS AND METHODS

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of Universidade Federal of Minas Gerais (N° 114/8). The participants and their caregivers were informed of the research purpose and, after consent was given,

were included in this study. They were assisted at the orthodontic university clinic. After placing the fixed orthodontic appliances, oral and written guidelines of adequate oral health over modified Bass brushing technique and floss were issued, requesting the participants to follow an oral hygiene standard during the whole experiment.

Thirty participants (14 males and 16 females) between 12 and 17 years old were included in the study. The inclusion criteria were being under orthodontic fixed appliances over 6 months and the presence of gingival overgrowth Grade 2 (Löe, 1967; Inglés *et al.*, 1999) in the upper premolars and molars, which was diagnosed by a previously trained examiner (Kappa=0.92).

This study excluded participants who had any of the following factors that could influence gingival growth: having an antibiotic therapy for the last three months or during the study period; making use of anticoagulants, immunosuppressants, calcium channel blockers, or other medications that cause gum swelling; pregnant and lactating women; signs of candidiasis; previous use of chlorhexidine as toothpaste or mouthwash for at least 30 days; report of allergic reactions to any component of the varnish; those who had undergone periodontal surgery or extraction of the adjacent studied teeth in the past 4 months; and smokers.

PROCEDURES The EC40[®] varnish (Biodent, Arnhem, Netherlands) consists of 40% CHX, 36% sandarac, and 24% ethanol, whereas the placebo varnish (Fórmula & Ação, São Paulo, Brazil) contained 60% sandarac and 40% ethanol. The application occurred on the vestibular face of the upper premolars and first molar crowns, randomly, on the right and left from the same patient. One maxillary side was randomly used as control with a placebo varnish. In the experimental side, a 40% chlorhexidine varnish was applied. The procedure was performed by the same dentist using dental equipment and following the manufacturer's instructions. Firstly, the teeth were cleaned with a toothbrush for 2-3 minutes, then, the teeth were isolated from saliva with cotton rolls and dried with compressed air, followed by the application of a thin coat of varnish to the vestibular surface, around orthodontic brackets and along the gingival margin using the cartridge syringe fitted with a blunt needle. The excess varnish was removed after 7 minutes, and the participants were instructed not to eat or drink for 3h and not to clean their teeth until the following day.

A trained photographer used a Canon Rebel camera with 100 macro ring flash to take intraoral photographs, from the right and left sides, before varnish application at the baseline (T0), 14 days after varnish application (T14), and 56 days after varnish application (T56).

The digital photographs were analyzed by the software Rapid Sketch[®] V.2.4. The vestibular areas (mm²) of the premolar clinical crowns were measured (Figure 1) and the gingival growth was calculated indirectly (Rodrigues *et al.*,

2010). This procedure was performed at all times (T0, T14, and T56), and the results were analyzed by ANOVA and the Tukey-Kramer test ($\alpha=5\%$).

RESULTS

Split-plot one-way analysis of variance revealed statistically significant effects of the factors patient, treatments, and time ($p<0.05$). The interaction of time *versus* treatments was statistically significant ($p<0.05$). The Tukey–Kramer test compared the effects of time and treatments (Table 1).

Table 1 – Means and standard deviations of vestibular areas (mm²) of the control and experimental groups (Tukey test) as a function of time (n=30).

Time	Group			
	Control		Treatment	
T0	4,540 (\pm .802)	a A	4,537 (\pm .799)	a A
T14	4,473 (\pm .831)	a A	4,717 (\pm .829)	b B
T56	4,367 (\pm .792)	a B	4,940 (\pm .865)	b C

Means followed by distinct letters (small letters in the lines and capital letters in the columns) differ for the Tukey test ($p<0.05$).

The increase in the measurement of the clinical crown represents indirectly the gingival volume decrease. At T0, there was no difference between the areas in the control and treatment groups. At T14 and T56, the means of areas in the treatment group were higher than in the control group (Table 1).

In the control group, the average area did not differ between T0 and T14 but was significantly smaller at T56. In the treatment group, there was a significant and progressive increase in area from T0 to T56 (Table 1).

Figures 2 and 3 illustrate the gingival volume in the control and treatment groups, respectively, toward the time of the study.

DISCUSSION

This is a prospective, clinical split-mouth study designed to observe the effect of a 40% chlorhexidine varnish (EC40® Biodentic) in the gingival growth of orthodontic patients. The split-mouth design has been used in different clinical areas, and is generally considered an adequate study design (Lesaffre *et al.*, 2007; Sköld-Larsson *et al.*, 2009) because each subject is its own control. To apply a split-mouth design, more than one site in the mouth must be affected by the disease. Thus, only patients with multiple affected sites are eligible, which often leads to recruitment problems. In this study, only patients with both left and right maxillary affected sides were chosen.

When there is a leakage of the treatment effect from one site to another site, called a carry-over effect, the split-mouth design is seriously handicapped, leading to an unbiased estimate of the treatment effect. Therefore, a study tested the hypothesis that a carry-over effect did not exist. Comparing the mutans streptococci counts between the treatment and control sites indicates that a carry-over effect caused by EC40® had not occurred (Zhang *et al.*, 2007).

Based on the properties of the available substances and the clinically proven results, chlorhexidine, in comparison to other products, is considered the gold standard in inhibiting plaque formation and gingival overgrowth (Zhang *et al.*, 2007; Jones, 1997). However, some side effects may have resulted from its continuous use as a mouthwash and toothpaste. The possible adverse effects most common during chlorhexidine treatment are temporary palate disorders, tooth staining, or unpleasant taste (Guimaraes *et al.*, 2006).

In the present study, the proposed method allows the measurement of gingival volume alteration by the change of the clinical crown area of the teeth. Through a computer analysis, the provided area variation is numeric, which enables a more accurate statistical analysis (Rodrigues *et al.*, 2010). The measurement of volume using a photographic method has been studied and proven to be effective (Benson *et al.*, 2003a). However, photographs should be well taken to avoid focus and angle errors by the operator. Thus, a well-trained photographer is necessary for standardization of the pictures (Benson *et al.*, 2003b).

The similarity between the control and treatment groups at T0 shows that both groups were homogeneous at the beginning of the study. Thus, each subject adequately works as its own control. A progressive increase was observed in the clinical crown area of the second premolars using 40% chlorhexidine varnish at 14 and 56 days after application. This can be explained because chlorhexidine varnish acts as an agent that combats the microorganisms responsible for the gingival overgrowth in patients undergoing orthodontic treatment (Zhang *et al.*, 2007; Jones, 1997). Moreover, this antimicrobial agent provides an additional feature, in particular, the sustained-release and substantivity property, that decreases the level of microorganisms in patients with fixed appliances (Beyth *et al.* 2003; Tomás *et al.* 2010). Other studies report that EC40 performs better, decreasing the microorganisms in gingival plaque until six months (Schaeken *et al.* 1989; Attin *et al.* 2003). Periodontal complications arise during adolescent orthodontic therapy (Barack *et*

al., 1985), and the gingival inflammation is associated with the presence of periodontopathogens, both supragingivally and subgingivally (Sallum *et al.*, 2004).

On the other hand, in the control group, there was no significant increase in the gingival volume during the period of 2 weeks (T14), probably because coronary polishing was performed before data collection (T0). The significant increase in the gingival volume in T56 occurred because of an increase in the gingival inflammatory process.

Therefore, it is necessary to quantify the time of varnish application and its frequency. It is also important to determine the ability of a 40% chlorhexidine varnish to maintain the reduction of gingival hyperplasia by means of long-term longitudinal studies.

CONCLUSION

The use of a 40% chlorhexidine varnish promoted a progressive increase in the clinical crown area of the second premolars at 14 and 56 days after application. The chlorhexidine varnish is an agent that combats gingival overgrowth in patients undergoing orthodontic treatment. Further studies are necessary to set the action time and frequency of application.

Figures

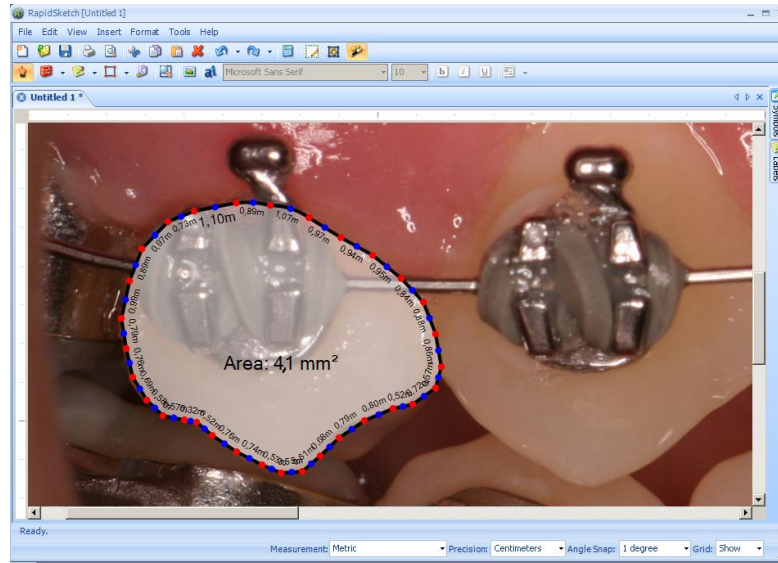


Figure 1 – Rapid Sketch® V.2.4 software used to measure the second premolar crown area.



Figure 2 – Control side: Intraoral photographs at T0, T14 and T56.



Figure 3 - Treatment side: Intraoral photographs at T0, T14 and T56.

REFERENCES

1. Attin R, Tuna A, Attin T, Brunner E, Noack MJ. Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing Mutans streptococci and lactobacilli counts. *Archives of Oral Biology* 2003; 48:503-509.
2. Ay ZY, Sayin MO, Ozat Y, Goster T, Atilla AO, Bozkurt FY. Appropriate oral hygiene motivation method for patients with fixed appliances. *Angle Orthod* 2007; 77(6):1085-9.
3. Barack D, Staffileno H, Sadowsky C. Periodontal complication during orthodontic therapy. A case report. *Am J Orthod* 1985; 88: 461-465.
4. Benson PE, Pender N, Higham SM. Quantifying enamel demineralization from teeth with orthodontic brackets--a comparison of two methods. Part 1: repeatability and agreement. *Eur J Orthod* 2003; 25(2):149-58. a
5. Benson PE, Pender N, Higham SM. Quantifying enamel demineralization from teeth with orthodontic brackets--a comparison of two methods. Part 2: validity. *Eur J Orthod* 2003; 25(2):159-65. b
6. Beyth N, Tedlich M, Harari D, Friedman M, Steinberg D. Effect of sustained-release chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 123:345-8.
7. Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. The effect of orthodontic treatment on salivary flow, pH, buffer capacity, and levels of mutans streptococci and lactobacilli. *Aust Orthod J* 1999; 15(4):229-34.

8. Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. Enamel demineralization during orthodontic treatment. Aetiology and prevention. *Aust Dent J* 1997; 42(5):322-7.
9. Costa MR, da Silva VC, Miqui MN, Colombo AP, Cirelli JA. Effects of ultrasonic, electric, and manual toothbrushes on subgingival plaque composition in orthodontically banded molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137(2):229-35.
10. Cosyn J, Wyn I, De Rouck T, Moradi Sabzevar M. A chlorhexidine varnish implemented treatment strategy for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 750–756.
11. Derks A, Frencken J, Bronkhorst E, Kuijpers-Jagtman AM, Katsaros C. Effect of chlorhexidine varnish application on mutans streptococci counts in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133(3):435-9.
12. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *JADA* 1986; 112(6):863-9.
13. Fennis-le YL, Verdonschot EH, Burgersdijk RC, König KG, van 't Hof MA. Effect of 6-monthly applications of chlorhexidine varnish on incidence of occlusal caries in permanent molars: a 3-year study *Journal of Dentistry* 1998; 26(3):233-238.
14. Goh HH. Interspace/interdental brushes for oral hygiene in orthodontic patients with fixed appliances. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; 18(3):CD005410.

15. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 1986; 57(6):370-7.
16. Guimaraes AR, Peres MA, Vieira Rde S, Ferreira RM, Ramos-Jorge ML, Apolinario S, Debom A. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine-fluoride-based preventive oral health program. *J Appl Oral Sci* 2006; 14(4):291-6.
17. Inglés E, Rossmann JA, Caffesse RG. New clinical index for drug-induced gingival overgrowth. *Quintessence Int* 1999; 30(7):467-73.
18. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000 1997; 15:55-62.
19. Lara-Carrillo E, Montiel-Bastida NM, 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*. In press 2010.
20. Lesaffre E, Garcia Zattera M-J, Redmond C, Huber H, Needleman I. Reported methodological quality of split-mouth studies. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 756–761.
21. Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967; 38(6):610-6.
22. Lovrov S, Hertrich K, Hirschfelder U. Enamel Demineralization during Fixed Orthodontic Treatment - Incidence and Correlation to Various Oral-hygiene Parameters. *J Orofac Orthop* 2007; 68(5):353-63.

23. Matthijs S, Adriaens PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol* 2002; 29(1):1-8.
24. Mandall N. A., Millett D. T., Mattick C. R., Hickman J., Worthington H. V., Macfarlane T. V. Orthodontic adhesives: a systematic review *Journal of Orthodontics* 2002; 29:205–210.
25. Opsahl Vital S, Haignere-Rubinstein C, Lasfargues JJ, Chaussain C. Caries risk and orthodontic treatment. *Int Orthod* 2010; 8(1):28-45.
26. Pizzo G, Guiglia R, Imburgia M, Pizzo I, D'Angelo M, Giuliana G. The effects of antimicrobial sprays and mouthrinses on supragingival plaque regrowth: a comparative study. *J Periodontol* 2006; 77(2):248-56.
27. Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13(4):E257-60.
28. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod Craniofac Res* 2007; 10(4):187-95.
29. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora. *Int J Dent Hyg* 2008;6 (2):129-36.
30. Rodrigues, G.G.; Madureira D.F.; Lages E.M.B.; Lages E.J.P.; Pretti, H. Gingival volume measure through the analysis of tooth crown area – A digital and computerized. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. In press 2010.

31. Sallum E.J.; Nouer D.F.; Klein M.I.; Gonçalves R.B.; Machion L.; Sallum A.W.; Sallum E.A. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126(3):363-6.
32. Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Hendriks JC. Effects of varnishes containing chlorhexidine on the human dental plaque flora. *J Dent Res*. 1989;68(12):1786-9.
33. Sköld-Larsson K, Sollenius O, Petersson LG, Twetman S. Effect of topical applications of a novel chlorhexidine-thymol varnish formula on mutans streptococci and caries development in occlusal fissures of permanent molars. *J Clin Dent*. 2009; 20(7):223-6.
34. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* 2002;29(11):965-74.
35. SUKONTAPATIPARK W, EL-AGROUDI MA, SELLISETH NJ, THUNOLD K, SELVIG KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001; 23(5):475-84.
36. Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res* 2009; 23:39-48.
37. Tomás I, Cousido MC, García-Caballero L, Rubido S, Limeres J, Diz P. Substantivity of a single chlorhexidine mouthwash on salivary flora: influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Dent* 2010; 38(7):541-6.

38. Zhang Q, Mulder J, Truin GJ, van Palenstein Helderma WH. Effect of 40% chlorhexidine varnish on mutans streptococci counts in pits and fissures of permanent first molars. *J Dent* 2007; 35(7):588-92.

Effect of chlorhexidine varnish on bacterial quantification in orthodontic patients with gingival growth

ABSTRACT

Objective: This study aimed to identify and quantify the bacteria *Eikenella corrodens* (Ec), *Prevotella intermedia* (Pi), and *Fusobacterium nucleatum* (Fn) present in the gingival sulcus of patients under orthodontic treatment and with increased gingival volume, before applying a varnish containing 40% chlorhexidine (T0), and to evaluate the effect of the varnish on the bacterial count at 14 (T14) and 56 days (T56) after application as compared with the side control.

Materials and Methods: In a prospective split-mouth study involving 30 patients, aged between 12 and 17 years, undergoing orthodontic treatment and experiencing an increase of gingival volume, chlorhexidine (CHX) varnish EC40® was applied to one side, particularly in the upper premolar and molars. Varnish without chlorhexidine was applied to the other side.

The biofilm was collected with sterile paper points, inserted within 60 seconds in the mesial and distal region of the second upper premolar at T0, T14, and T56. DNA was extracted from the collected material, and the microorganisms were identified and quantified using quantitative PCR.

Results: No significant difference was found in bacterial count at each time point when the control and the experimental groups were compared ($p>0.05$),

indicating that CHX 40% has an inefficient antibacterial activity against Ec, Pi, and Fn.

Conclusions: The application of a highly concentrated chlorhexidine varnish in patients with fixed orthodontic appliances and gingival growth does not result in a distinct reduction in the Ec, Pi, and Fn counts at 2 and 8 weeks after treatment. Further studies are necessary to set the action time and frequency of application.

KEY WORDS: Chlorhexidine varnish; gingival growth; orthodontic patients; split mouth; qPCR.

INTRODUCTION

The techniques of molecular genetics make possible the identification of more than 700 species that can colonize the oral cavity (Perea, 2004). The dental plate aggregates an ample variety of bacteria. Many species have been associated with the etiology of gingival increase and periodontal illness. The most frequently associated microorganisms are *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. *F. nucleatum* and *E. corrodens* are frequently associated with gingival increase (Socransky & Haffajee, 2005).

F. nucleatum (Fn) is a genus of filamentous, anaerobic, Gram-negative bacteria, similar to *Bacterioides*. This species is frequently isolated from human gingival sulcus (Holt et al., 1994; Silva et al., 2005). *Fusobacterium* contributes to

the development of periodontal diseases, producing endotoxin that can induce an inflammatory process or cause direct damage in the periodontium (Slots & Rams, 1990; Haffajee & Socransky, 1994; Bolstad et al., 1996; Kaur & Falker, 1992; Schenkein et al., 1993). However, the potential damage to the periodontium remains controversial. It is possible that the association between other species seems to be fundamental to health and disease transition (Haffajee & Socransky, 1994).

P. intermedia (Pi) and *P. nigrescens* are a Gram-negative anaerobic pathogens involved in periodontal infections, including gingivitis and periodontitis. Pi is associated with acute necrotizing ulcerative gingivitis (ANUG) and periodontal disease associated with HIV infection (Jousimies-Somer, 1995; Maeda et al., 1998; Alves et al., 2006).

E. corrodens (Ec) is a fastidious Gram-negative facultative anaerobic bacillus present in oral cavity. It can cause disease by endotoxin production, adhesins, and its external polysaccharide capsule that inhibit the phagocytosis by macrophage (Apolônio et al., 2008). There is evidence that Ec is associated with aggressive and chronic periodontitis (Chen & Wilson, 1992). Moreover, this microorganism has been isolated from dental plaques in patients who do not present with periodontal disease. Socransky et al. (1988) demonstrated that 10% of the samples collected from dental plaque in healthy subjects were positive for Ec. Other research studies confirmed the previous results isolating these microorganisms from healthy oral cavity (Chen & Wilson, 1992). There is

evidence, however, that Ec may be associated with periodontal disease (Tanner et al., 1979).

The etiology of periodontal illness has been investigated using bacterial culture, a classic microbiological method that presents numerous advantages because of the isolation of the microbiological agent. It allows the accomplishment of studies for characterization of the periodontal agents, especially for evaluation of excellent aspects of the microbiological physiology. Nowadays, methods in molecular genetics are considered more sensible and specific, improving the efficiency of diagnostic methods for infectious illnesses. The PCR techniques have been among the most used.

Patients submitted to fixed orthodontic treatment present retainer of dental plate that can cause enamel demineralization, dental caries, and gingival increase (Heintze, 1998; Glans et al., 2003; Derks et al., 2004). Because of this, patients under orthodontic treatment need to be attentive regarding oral hygiene because of the devices used in orthodontic treatment (bands, wires, and ties) (Derks et al., 2004; Opsahl Vital et al., 2010). Patients using these devices have some limitations in controlling the dental plate through mechanical methods. In this context, the use of antiseptics is strongly recommended for patients under orthodontic treatment. Therefore, the important role of chemical agents in the improvement of oral health must be considered (Heintze, 1998).

Chlorhexidine (CHX) has been used and tested for many years. The efficiency of CHX in preventing plaque formation and the development of gingivitis has been demonstrated in many publications (Addy et al., 1989; Addy et

al., 1991). Moreover, CHX prevents the development of gingival growth. Nowadays, it presents as the gold standard among anti-plaque agents (Jones, 1997). On the other hand, the side effects arising from the use of CHX, such as staining of dental enamel and change in taste perception, have also been documented (Dolles, 1979; Greenstein, 1986; Santos, 2003).

The 0.12% and 0.2% CHX solutions are the most used mouth rinses. Other preparations, such as gels, varnish, toothpaste, chips, and sprays, have also been used (Iacono, 2002; Santos, 2003). The CHX varnish has great advantages because it reduces bacterial activity and does not cause staining of dental enamel. It is also well tolerated by the patient. Initially, this varnish was tested for the prevention of caries in high-risk populations and was implemented as a treatment strategy for chronic periodontitis (Matthijs et al., 2002).

At present, most CHX varnishes are manufactured on 40% chlorhexidine, sandarac, and ethanol. Indeed, multiple applications of these varnishes on the tooth surface lead to suppression of the microorganisms in the supragingival plaque and to lowering of the pathogenic potential.

Although the association of microorganisms present in the dental biofilm with periodontal disease has been well established, it is uncertain how the bacteria that colonize the dental biofilm can influence gingival growth. Therefore, the purpose of this study was to quantify bacteria species related to gingival growth and the antibacterial efficacy of sustained-release chlorhexidine varnish 40%.

This investigation was delineated based on the use of chlorhexidine varnish as an adjuvant in oral hygiene in patients under orthodontic treatment presenting with gingival growth.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Thirty subjects, aged 12 to 17 years, under orthodontic treatment and presenting with gingival growth, were recruited in the orthodontic clinic. The protocols regarding the periodontal examination and the collection of gingival crevicular fluid were approved by the Ethics Committee in Clinical Research of this University. Each subject read and signed an informed consent before entering the study. The periodontal disease evaluation was performed based on parameters proposed by Armitage (2004). Subjects were excluded if they had any systemic or medical conditions that would have required antibiotic prophylaxis in the previous three months. Subjects presenting gingival growth associated with a cause other than orthodontic treatment were excluded.

Procedures

This study used the EC40® varnish (Biodent, Arnhem, Netherlands), consisting of 40% chlorhexidine, 36% sandarc, and 24% ethanol, and the placebo varnish (Fórmula & Ação, São Paulo, Brazil), consisting of 60% sandarc and 40% ethanol. These compounds were applied to the vestibular face of the upper premolars and first molar crowns, randomly to the right and the left of the same patient. One maxillary side was randomly used as control with a placebo varnish, the other being the experimental side with a 40% chlorhexidine varnish. The same dentist, using dental equipment and following the manufacturer's

instructions, performed the procedure. First, the teeth were cleaned with a toothbrush for 2-3 minutes, then the teeth were isolated from saliva with cotton rolls and dried with compressed air. A thin coat of varnish was then applied to the vestibular surface, around the orthodontic brackets, and along the gingival margin using the cartridge syringe fitted with a blunt needle. The excess varnish was removed after 7 minutes, and the participants were instructed not to eat or drink for 3 hours and not to clean their teeth until the following day.

The upper premolars were selected as the region of collection because they are the teeth more associated with gingival growth. Moreover, it is easier to avoid saliva contamination in the maxillary region. Specimens were collected using sterile paper points. The upper premolars were dried and isolated with cotton rolls, and the sterile paper points were gently placed inside the gingival sulcus for 60 seconds. Crevicular fluid was collected from the buccal, distal, and mesial regions. The first collection was performed before the application of chlorhexidine varnish (T0). After 14 (T14) and 56 (T56) days, the crevicular fluid was recollected in the same areas. Another collection was performed on the contralateral side that did not receive the chlorhexidine varnish treatment; this represented the control group. Samples were immediately placed in Eppendorf tubes with Milli-Q sterilized water on ice and transported to the laboratory. These tubes were vortexed and centrifuged at 1200x *g*, 4°C, for 30 min. The supernatant was discarded, and the pellet was kept at -80°C until DNA extraction.

Sample DNA extraction

The DNA of Fn, Pi, and Ec was extracted using the phenol-chloroform method as described by Fox et al. (1994). The gingival fluid was centrifuged, and the supernatant was discarded. STET buffer (saccharosis 11.8%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 12.5 mM, and Triton X-100 0.1%; pH 8.0) and lysozyme were added to a final concentration of 0.02 µg/mL. The mixture was then incubated at 37°C for 1 h and digested by proteinase K (0.7 µmol/µL). The suspension was homogenized and incubated overnight at 37°C, after which the CTAB 5% and NaCl 0.7 M were added and gently mixed for 10 min at 56°C. The DNA was extracted using phenol-chloroform solution and precipitated using sodium acetate 0.3 M and ethanol. The DNA was resuspended in Milli-Q sterilized water. The same method was used to extract the reference bacterial DNA.

Real-time PCR

The real-time PCR method detects the bacterial DNA of the Ec, Pi, and Fn periopathogens. In addition, the total bacterial load in the samples was assessed. Real-time quantitative PCR (qPCR) was carried out using 2 µl of the extracted DNA as the template in a reaction mixture containing the appropriate primers (Table 1) and the SybrGreen® Universal PCR Master Mix. qPCR was performed using an ABI Step-One (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The standard curve was plotted using the known concentrations of the reference bacterial DNA, diluted serially. The quantity of all curve points was analyzed using NanoDrop. The Syber-Green® system detection kit (Applied Biosystems)

was used to assay amplification. StepOne Software version 2.1 (Applied Biosystems) was used to analyze data after amplification.

Table 1: Primers designed for bacterial DNA detection

<i>Eikenella corrodens</i>	F: 5'-GGGAAGAAAAGGGAAGTGCT-3' R: 5'-TCTTCAGGTACCGTCAGCAAAA-3'
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	F: 5'-CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT-3' R: 5'-TGGTCCTCACTGATTACACAGA-3'
<i>Prevotella intermedia</i>	F: 5'-AATACCCGATGTTGTCCACA-3' R: 5'-TTAGCCGGTCCTTATTCGAA-3'

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using one-way repeated measures ANOVA, whereas the experimental design was randomized block in split plot arrangement so that comparisons were made using the total sample to gain the power of the test and the existence of a possible interaction between the studied factors was evaluated. The average values were obtained using the Tukey test, which is more conservative than the T test and requires major differences between the means, considering the statistically significant differences.

To compare the control and the treated groups in terms of quantification of microorganisms, ANOVA and the Tukey-Kramer test were used to compare the groups that presented normal distribution, namely, Ec and Fn. The Friedman test was used to compare the medium of the bacterium Pi because it did not present normal distribution. For all the tests, a level of significance of 5% was adopted.

RESULTS

E. corrodens quantification

Ec was detected in the control and the treated groups. The *Ec* population in the control group decreased at T56 when compared with T0 and T14 ($p < 0.05$). Similar results were obtained when comparing each time point in the CHX-treated group. The bacterial count was reduced in T56 compared with T14 ($p < 0.05$). There was no significant difference, however, when each time point between the control and the experimental groups were compared ($p > 0.05$), indicating that CHX 40% has an inefficient antibacterial activity against *Ec*.

Table 2. Averages of the control and the treated groups after T0, T14, and T56 for the bacterium *Ec*. Tukey test ($p < 0.05$).

Time	Group (<i>Ec</i>)			
	Control		Treatment	
T0	3.8570 (± 0.725)	a, A	3.8238 (± 0.575)	a, A
T14	4.0106 (± 0.799)	a, A	4.1609 (± 0.894)	a, A
T56	3.1200 (± 1.416)	a, B	3.2714 (± 1.359)	a, B

Means followed by distinct letters (small letters in the lines and capital letters in the columns) differ for the Tukey test ($p < 0.05$).

***P. intermedia* quantification**

The Pi count was very low in some samples, and in most samples this microorganism was not detected. There was no difference between the studied groups.

Table 3. Averages of the control and the treated groups after T0, T14, and T56 for the bacterium Pi. Friedman test ($p = 0.8666$).

Time	Group (Pi)			
	Control		Treatment	
T0	1.0440 (± 1.666)	a, A	0.8256 (± 1.698)	a, A
T14	0.4808 (± 1.341)	a, A	0.6536 (± 1.832)	a, A
T56	0.4962 (± 1.614)	a, A	0.6073 (± 1.802)	a, A

Means followed by distinct letters (small letters in the lines and capital letters in the columns) differ for the Friedman test ($p=0.8666$).

***F. nucleatum* quantification**

F_n was detected in the control and the treated groups. There was no significant difference when each time point was compared between the control and the experimental groups ($p>0.05$), indicating that CHX 40% has no antibacterial activity against F_n.

Table 4. Averages of the control and the treated groups after T0, T14, and T56 for the bacterium Fn. Tukey test ($p < 0.05$).

Time	Group (Fn)			
	Control		Treatment	
T0	3.6106 (± 1.823)	a, A	3.6426 (± 2.027)	a, A
T14	3.4437 (± 1.581)	a, A	3.4010 (± 1.475)	a, A
T56	3.3682 (± 1.682)	a, A	3.5568 (± 1.889)	a, A

Means followed by distinct letters (small letters in the lines and capital letters in the columns) differ for the Tukey test ($p < 0.05$).

DISCUSSION

In the present study we investigated three microorganisms that normally colonize the human oral cavity and are associated with periodontal disease. The methods used for this purpose were independent of bacterial culture.

Different methodologies can be used to evaluate the microorganism present in periodontal sulcus; they include biochemistry, immune assay tests, and molecular biology (e.g., PCR). The method must be chosen based on the objective of the study because each methodology has advantages and disadvantages. Some tests require the isolation of the microorganism. Bacterial culture is not easy because it requires time and experience, and especially because oral microorganisms are strict anaerobics (Maeda et al., 2003; Sixou, 2003).

The development of new techniques in molecular biology, especially in genetics, has made methodologies that do not depend of bacterial cultural available for microbiologic diagnostics. These new methods are fast, sensible, and specific. Such techniques are useful for the evaluation of complex flora that colonize different parts of the body such as the oral cavity (Maeda et al., 2003; Kuboniwa et al., 2004).

The PCR technique is important because it evaluates DNA or RNA independent of the viability of the microorganism. Moreover, the PCR procedure is simple, and results can be quickly obtained. Obtaining knowledge of the microorganism's involvement in infectious diseases is possible through the PCR technique (Boutaga, 2006).

One of the variations of the PCR technique is qPCR, which presents a benefit comparable with the conventional PCR because the former is a quantitative method. Thus, qPCR has been used to identify and quantify microorganisms associated with different infectious diseases (Boutaga, 2006).

Although the results show that chlorhexidine varnish 40% has no efficient antibacterial properties against the microorganism studied, this paper has fundamental importance to demonstrate that the qPCR technique is useful and efficient in quantifying bacterial species from gingival tissues, and such technique can be used in place of bacteria culture. In line with this, all experiments detected the microorganism studied, as confirmed by the reference samples. It is important to highlight that the qPCR reaction is species specific because, as demonstrated by the dissociation curves, there is no cross-reaction with DNA

samples from other bacterial species. The experiments were reproducible as demonstrated by the duplicates.

Considering the properties of the available substances and the clinically proven results, CHX is considered the gold standard in comparison with other products designed to inhibit plaque formation (Zhang et al., 2007; Jones, 1997). However, some side effects have resulted from its use as a mouthwash and toothpaste.

According to the literature, the application of chlorhexidine varnish has positive effects on gingival health (Yucel-Lindberg, 1999; Olympio, 2006). The results of this study show that chlorhexidine varnish did not significantly affect the number of bacteria in the gingival tissue as demonstrated by the bacterial quantification. Such results are interesting because they suggest that the positive effect related to the use of chlorhexidine is not just related to its antibacterial action.

Therefore, based on our investigation, the use of CHX was not efficient against the bacteria studied. Thus, an increase in the number of applications is essential because, at least after two follow-ups, another increase of the evaluated parameters took place. This is in agreement with studies showing that recolonization with pathogenic bacteria occurs quickly (Attin et al., 2006). In addition, some discrepancies with respect to the effectiveness of CHX varnish in the literature might be due to its less frequent application in comparison with daily rinsing (Ogaard et al., 2001). However, this might be partly compensated by the higher concentration of CHX in the varnish.

CONCLUSION

The application of a highly concentrated chlorhexidine varnish in patients with fixed orthodontic appliances and gingival growth does not result in a distinct reduction of Ec, Pi, and Fn counts at 2 and 8 weeks after treatment. Further studies are necessary to set the action time and frequency of application.

REFERENCES

1. Perea, EJ. Oral flora in the age of molecular biology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9:6-10, 1-5.
2. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*. 2005; 38: 9-12.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135-87.
4. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 9.ed. 1994; 787p.
5. Silva VL, Diniz CG, Cara DC, Santos SG, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM. Enhanced pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum* adapted to oxidative stress. *Microb. Pathog.* 2005; 39: 131-8.
6. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy; advantages and disadvantages. *J. Clin. Periodontol.* 1990; 17: 479-493.

7. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 1994; 5: 78-111.
8. Bolstad AL, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; 9: 55-71.
9. Kaur M, Falker WA. Characterization of shared antigens of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum*. *OralMicrobiol. Immunol.* 1992; 7: 291-298.
10. Schenkein HA, Burmeister JA, Koertge TE, Brooks CN, Best AM, Moore LV, Moore WE. The influence of race and gender on periodontal microflora. *J. Periodontol.* 1993; 64: 292-296.
11. Jousimies-Somer HR. Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristic of pigmented anaerobic Gram negative rod. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20: 187-191.
12. Maeda N, Okamoto M, Kondo K, Ishikawa H, Osada R, Tsurumoto A, Fujita H. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. *Microbiol. Immunol.* 1998; 42: 583-589.
13. Alves ACBA, Napimoga MH, Klein MI, Hofling J, Goncalves RB. Increase in probing depth is correlated with a higher number of *Prevotella intermedia* genotypes. *J Periodontol.* 2006; 77: 61-66.
14. Apolônio AC, Carvalho MA, Bemquerer MP, Santoro MM, Pinto SQ, Oliveira JS, Santos KV, Farias LM. Purification and partial characterization

- of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. J. Appl. Microbiol. 2008; 104: 508-14.
15. Chen CKC, Wilson ME. *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. J. Periodontol. 1992; 63: 941-953.
16. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. J. Clin Periodontol. 1988; 15: 440-444.
17. Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J. Clin. Periodontol. 1979; 6: 278-307.
18. Heintze SD. Oral health for the orthodontic patient. Quintessence. Illinois. 1998; p.66-77.
19. Glans R, Larsson E, Ogaard B. Longitudinal changes in gingival condition in crowded and noncrowded dentitions subjected to fixed orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2003; 124 (6): 679-82.
20. Derks A, Katsaros C, Frencken JE, van't Hof MA, Kuijpers-Jagtman AM. Caries-inhibiting effect of preventive measures during orthodontic treatment with fixed appliances. Caries Res. 2004; 38 (5): 413-20.
21. Opsahl Vital S, Haignere-Rubinstein C, Lasfargues JJ, Chaussain C. Caries risk and orthodontic treatment. Int Orthod. 2010; (1): 28-45.
22. Addy M, Wade WG, Jenkins S, Goodfield S. Comparison of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. Staining and antimicrobial effects in vitro. Clin Prev. Dent. 1989; 11: 10-14.

23. Addy M, Wade W, Goodfield S. Staining and antimicrobial properties in vitro of some chlorhexidine formulations. *Clin Prev Dent*. 1991; 13(1):13-7.
24. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000. 1997; 15: 55-62.
25. Dolles OK, Eriksen HM, Gjermo P. Tooth stain during 2 years use of chlorhexidine and fluoride containing dentifrices. *Scand J Dent Res*. 1979; 87(4): 268-74.
26. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol*. 1986; 57: 364-77.
27. Santos A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(5): 13-16.
28. Iacono VJ, Aldredge WA, Lucks H, Schwartzstein S. Modern supragingival plaque control. *Int Dent J*. 1998; 48 (1): 290-97.
29. Matthijs S, Adriens PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol*. 2002; 29 (1): 1-8.
30. Armitage, GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2004; 34: 9-21.
31. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Koikeguchi S, Petelin Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. Quantitative realtime PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2003; 39: 81-86.

32. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis.* 2003; 9: 54-62.
33. Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Lida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004; 19: 168-176.
34. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 427-33.
35. Zhang Q, Mulder J, Truin GJ, Van Palenstein WH. Effect of 40% chlorhexidine varnish on mutans streptococci counts in pits and fissures of permanent first molars. *Journal of Dentistry.* 2007; 35: 588-92.
36. Yucel-Linderg T, Twetman S, Sköld-Larsson K, Modéer T. Effect of an antibacterial dental varnish on the levels of prostanoids, leukotriene B₄, and interleukin-1 beta in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand.* 1999; 57: 23-27.
37. Olympio KP, Bardal PA, de M Bastos JR, Buzalaf MA. Effectiveness of a chlorhexidine dentifrice in orthodontic patients: a randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 421-426.
38. Attin R, Ilse A, Werner C, Wiegand A, Attin T. Antimicrobial effectiveness of a highly concentrated chlorhexidine varnish treatment in teenagers with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 2006; 76: 1022-27.

39. Ogaard B, Larsson E, Glans R, Henriksson T, Birkhed D. Antimicrobial effect of a chlorhexidine-thymol varnish (Cervitec) in orthodontic patients: a prospective, randomized clinical trial. *J Orofac Orthop.* 1997; 58: 206-13.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de um dos grandes problemas enfrentado pelos ortodontistas, que é o aumento do volume gengival em adolescentes, com o uso de aparelho ortodôntico fixo, pensou-se em realizar este trabalho. O principal objetivo foi de verificar o efeito da aplicação do verniz de clorexidina a 40% nos adolescentes com aumento de volume gengival observando o resultado. O verniz foi o veículo usado por ser de fácil aplicação, comprovada efetividade, grande substantividade e necessitar apenas uma aplicação num período reduzido de tempo. O EC40® foi o verniz de escolha por ser o mais utilizado e referendado na literatura e ter demonstrado ser superior quando comparado aos demais vernizes comercializados. Deve-se ressaltar que a maioria dos autores é unânime em afirmar que os métodos mecânicos, escovação e fio dental, são os mais eficientes meios de se evitar o problema.

Todos os pacientes da clínica de ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, após a colocação do aparelho fixo, eram instruídos, seguindo o protocolo da universidade, com os cuidados com a correta higienização oral. Trinta pacientes com idade entre 12 e 17 anos, que após 6 meses do início do tratamento, apresentaram aumento do volume gengival foram selecionados.

Estabeleceu-se como protocolo, fotografia intrabucal do lado direito e esquerdo e coleta do biofilme com cone de papel esterelizado de todos os pacientes e depois polimento coronário com escova de Hobson. Aplicou-se o verniz de clorexidina nos pré-molares e molares de um dos lados, escolhido por

sorteio, e um verniz sem clorexidina do outro lado como controle. O paciente não foi informado de qual lado era aplicado o verniz com clorexidina e qual era o controle. Fotografias e coleta do biofilme foram repetidas 14 e 56 dias após a aplicação do verniz.

Com as fotografias transferidas para o programa Rapid Sketch® V.2.4, foi mensurada a área da face vestibular da coroa dos segundos pré-molares e analisadas estatisticamente para avaliar o efeito do verniz contendo clorexidina.

Já os cones de papel com o biofilme coletado foram levados para o laboratório de genética da FO-UFMG para extração do DNA e quantificação de três bactérias envolvidas na formação do biofilme. Várias bactérias participam e estão presentes no biofilme oral e por fatores econômicos e de praticidade optou-se por três bactérias. A *Eikenella corrodens*, a *Prevotella intermedia* e a *Fusobacterium nucleatum* foram escolhidas, pois a bactéria Fn está presente no biofilme, a Pi aparece com a presença da doença periodontal e a Ec por não estar esclarecido a sua função no biofilme.

Após o tratamento estatístico de todos os dados, pode-se concluir com este trabalho que para evitar-se a gengivite em pacientes ortodônticos recomenda-se métodos mecânicos como escova e utilização do fio dental aplicados de forma eficiente, para promover um correto controle de biofilme, além de um programa contínuo de motivação do paciente.

O uso do verniz de clorexidina Ec40 deve ser usado como coadjuvante em pacientes que não conseguiram realizar o controle do biofilme pelos métodos mecânicos.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Modelo da carta de informação entregue aos participantes da pesquisa.

CARTA DE INFORMAÇÃO

Esta pesquisa tem o objetivo de analisar a ação de um verniz na saúde bucal de pacientes em tratamento ortodôntico. Este verniz tem em sua composição 40% de clorexidina, que é um produto muito utilizado na Odontologia. Esta pesquisa será realizada durante o acompanhamento mensal em suas consultas normais ao ortodontista. Durante este período, os participantes não poderão utilizar outros produtos químicos para sua higiene bucal. Os pacientes terão sua identidade mantida em segredo. Informamos que os produtos utilizados nesta pesquisa são eficazes para melhorar a saúde bucal. Em qualquer momento o participante pode se recusar a continuar na pesquisa sem sofrer algum dano ou discriminação e, caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FO-UFMG, Av. Antônio Carlos, nº 6627. Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 ou pelo telefone (31) 3409-4592.

ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezada mãe ou responsável,

Estamos realizando uma pesquisa que procura avaliar o tipo de bactéria que causa o aumento do volume da gengiva, durante o tratamento ortodôntico e um possível medicamento para diminuir este problema. Para tal, aplicaremos uma única vez um verniz contendo um bactericida (clorexidina). Este verniz já é muito utilizado na odontologia, principalmente em crianças até 5 anos, na prevenção da cárie dentária. É um produto totalmente inofensivo, sem nenhum tipo de efeito nocivo à saúde do seu filho. Esta pesquisa é um trabalho de conclusão do Curso de Doutorado da Faculdade de Odontologia da UFMG. Necessitamos do seu consentimento para que seu filho(a) passe pela aplicação do verniz e coleta de material do sulco gengival. Esta coleta será realizada durante as consultas ortodônticas com um cone de papel absorvente que é colocado entre os dentes durante 1 minuto. Com isto iremos verificar a presença ou não de bactérias nocivas à gengiva. O exame será realizado com equipamento de proteção (luvas, óculos, máscara, gorro e avental) e com os cones de papel esterilizados. Estes exames não oferecem riscos para seu filho(a).

Asseguramos o anonimato da criança e do responsável, de modo que seus nomes não serão citados em nenhum trabalho científico, e confirmamos que todas as informações prestadas serão confidenciais. Informamos também que a desistência de participar na pesquisa poderá ser feita a qualquer momento, sem prejuízo para o atendimento ortodôntico realizado na FO-UFMG. Ressaltamos a extrema importância de sua participação para que futuramente, novas informações estejam disponíveis para os dentistas, ajudando-os a melhorar cada vez mais o serviço de atendimento.

Colocamo-nos a disposição para resolver qualquer dúvida.

Assinaturas

Dr. Henrique Pretti (pesquisador principal e professor do Curso de Especialização da FO-UFMG)

De acordo com os esclarecidos acima sobre a pesquisa eu, _____ autorizo a participação do(a) meu(minha) filho(a) _____ nascido em __/__/__, pelo qual sou responsável. Fui informado(a) que será aplicado um verniz contendo 40% de clorexidina em alguns dentes e será coletado material entre estes dentes com cone de papel esterilizado durante as consultas ortodônticas e dou permissão para que os dados obtidos deste trabalho sejam utilizados para fins de pesquisa e ensino.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Assinatura da mãe ou responsável.

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa
 Av. Antônio Carlos, nº 6627. Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005.
 CEP: 31.270-901
 Belo Horizonte – MG
 e-mail: prpq@coep.ufmg.br (WWW.ufmg.br/bioética)

ANEXO 3. Ficha Clínica

Nº _____

Nome: _____ Idade: _____ Gênero: _____

Endereço: _____

História médica:

Alterações sistêmicas: _____

Alergias: _____

Uso de medicamento: _____

Uso de antibiótico: _____ Há qto tempo _____

Fumante: _____ Há qto tempo _____

Tratamento periodontal anterior: _____

Tabela da coleta das amostras

Dia de coleta	Data	Dente (M/D) trat.	Dente (M/D) cont.
T0			
T14			
T56			

Local: Clínica de Ortodontia da FO-UFMG

Obs.:
