



JOSÉ ALEXANDRE DE ANDRADE

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTE BANA E *CHECKERBOARD*  
*DNA-DNA HYBRIDIZATION* NO DIAGNÓSTICO  
PERIODONTAL INICIAL E NO MONITORAMENTO  
TERAPÊUTICO**

Guarulhos

2005

F



JOSÉ ALEXANDRE DE ANDRADE

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTE BANA E *CHECKERBOARD*  
*DNA-DNA HYBRIDIZATION* NO DIAGNÓSTICO  
PERIODONTAL INICIAL E NO MONITORAMENTO  
TERAPÊUTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Periodontia.

1° Orientador: Profa.Dra. Sheila Cavalca Cortelli

2° Orientador: Profa.Dra. Magda Feres

Guarulhos

2005



*Dedico esse trabalho a Deus, pois  
somente por meio Dele tive  
a oportunidade de superar os  
obstáculos, e sempre sair vencedor.*

*“Não fiquem com medo,  
pois estou com vocês;  
não se apavorem, pois eu sou o seu Deus.  
Eu lhes dou forças e os ajudo;  
Eu os protejo com minha forte mão.  
Todos os seus inimigos  
Serão derrotados e humilhados;  
Todos os que lutam contra vocês  
Serão destruídos e morrerão.  
Se vocês procurarem os seus inimigos,  
Não os acharão, pois todos eles terão desaparecido.  
Eu sou o Eterno, o Deus de vocês;  
Eu os seguro pela mão e lhes digo:  
Não fiquem com medo, pois eu os ajudo “.*

*Isaías 41: 10 -13*

## **AGRADECIMENTOS**

Um agradecimento especial a minha esposa, Adriana, que abdicou do seu tempo para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos meus pais e irmão pela confiança que sempre depositaram em meu trabalho.

À Professora Dra. Sheila Cavalca Cortelli, pela dedicação, orientação do caminho a ser tomado, onde muito mais que minha orientadora, tornou-se uma amiga.

À Professora Dra. Magda Feres, por sempre saber discernir os momentos de cobrança, não medindo esforços para o meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Marcelo W. Barata Araujo, pela sinceridade, gentileza de seus atos.

À Professora Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, pela contribuição em meu crescimento.

Aos professores do Mestrado, pela paciência em transmitir os seus conhecimentos.

Ao Professor Dr. Camillo Anauate Neto, pela dedicação durante minha trajetória acadêmica e, hoje, como amigo.

À Izilvânia Malory Quinderé Barreto, pela colaboração laboratorial.

À Fernanda Roberta Rapucci, pelo pronto auxílio, sempre.

Aos colegas de mestrado, em especial ao Ricardo Atuí, por sempre levantar o ânimo nas viagens pela rodovia Presidente Dutra.

A todos os indivíduos que aceitaram participar deste estudo.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo comparar os resultados do Teste BANA em relação a presença e a concentração de microrganismos do “complexo vermelho”, estabelecida pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, no diagnóstico inicial e no monitoramento terapêutico de indivíduos com periodontite. Foram selecionados 54 indivíduos com periodontite crônica e no mínimo 15 dentes. As amostras subgingivais foram coletadas com curetas Gracey de 6 sítios periodontais/indivíduo com profundidade de sondagem entre 5-7mm e nível clínico de inserção entre 5-10mm, em quatro tempos experimentais: diagnóstico inicial (T0), imediatamente (T1), 45 (T2) e 60 (T3) dias após o término da raspagem e alisamento radicular. A identificação de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* foi determinada pelo Teste BANA e pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Para ambos os testes em T0 as maiores frequências foram de resultados positivos, e em T3 de resultados negativos (Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Nos quatro tempos experimentais, a atividade enzimática acentuada (escore 2) foi acompanhada por proporções elevadas ( $\geq 10^5$  células) de *P. gingivalis* e *T. forsythensis* (Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Para o “complexo vermelho” os resultados das 2 técnicas microbiológicas mostraram associação apenas no exame inicial ( $\chi^2 = 10,79$  e  $p = 0,001$ ). A sensibilidade do Teste BANA para a identificação do “complexo vermelho” foi de 84,13% (T0), 42,54% (T1), 40,76% (T2) e 28,57% (T3); e a especificidade foi de 39,53% (T0), 67,93% (T1), 68,66% (T2) e 80,42% (T3). O Teste BANA mostrou ser um método sensível para a detecção dos patógenos periodontais do “complexo vermelho” no diagnóstico inicial. A presença e os níveis subgingivais de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* não mostraram uma relação direta com os diferentes níveis de atividade enzimática.

**Palavras-Chaves:** diagnóstico; periodontite; bactérias; hibridização de ácido nucléico; enzimas.



## ABSTRACT

The aim of this study was to compare the results of the BANA with the presence of the "red complex" microorganisms established by the *Checkerboard DNA-DNA hybridization* in the initial diagnosis and in the therapeutic maintenance of subjects with periodontitis. 54 subjects with chronic periodontitis with at least 15 teeth were selected. Subgingival plaque samples were collected with Gracey curettes from 6 periodontal sites per subject with periodontal probing depths between 5-7mm and clinical attachment level between 5-10mm, in four experimental times: initial diagnosis (T0), immediately (T1), 45 (T2) and 60 (T3) days after scaling and root planing. The identification of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and/or *Treponema denticola* was determined by the BANA Test and by *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. For both tests in T0 the highest frequencies were of positive results, and in T3 of negative results (Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). In the four experimental times, a strong enzymatic activity (score 2) was accompanied by high proportions ( $\geq 10^5$  cels) of *P. gingivalis* and *T. forsythensis* (Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). There was an association between the BANA Test and the *Checkerboard DNA-DNA hybridization* for the "red complex", only in the initial exam ( $X^2=10,79$  and  $p=0,001$ ). The sensitivity of the BANA Test for the identification of the "red complex" was as follows 84,13% (T0), 42,54% (T1), 40,76% (T2) and 28,57% (T3); and the specificity was 39,53% (T0), 67,93% (T1), 68,66% (T2) and 80,42% (T3). The BANA Test showed to be a sensitive method for the detection of the periodontal pathogens of the "red complex" in the initial diagnosis. The presence and subgingival levels of *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythensis* did not show a direct association with the different levels of the enzymatic activity.

**Key-words:** diagnosis; periodontitis; bacteria; nucleic acid hybridization; enzymes.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.E JUSTIFICATIVA .....	01
1.1 BANA .....	02
1.2 <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i> .....	05
2. PROPOSIÇÃO .....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
3.1. População alvo e procedimentos periodontais .....	11
3.2. Análise microbiológica.....	12
3.2.1. BANA .....	12
3.2.2. <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i> .....	15
3.2.2.1. Condições de crescimento, isolamento do DNA e preparo das sondas genômicas	15
3.2.2.2. Hibridização DNA – DNA	16
3.2.2.3. Detecção das espécies bacterianas	18
3.3. Análise estatística .....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. População Estudada.....	21
4.2. Resultados microbiológicos .....	21
5. DISCUSSÃO .....	32
6. CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
ANEXOS.....	50

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A saúde periodontal pode ser considerada um equilíbrio entre a população microbiana e o hospedeiro. Quando da ocorrência de determinadas alterações, quer seja no biofilme, quer seja na resposta imunológica do hospedeiro, este equilíbrio pode ser rompido, podendo resultar na destruição do periodonto de proteção e/ou sustentação. Assim, na dependência direta de eventos histopatológicos, clinicamente podem se tornar evidentes características como sangramento, além das alterações de cor, forma e textura superficial do tecido gengival (Schmit *et al.* 1988).

Em Periodontia, tem-se como meta, identificar indivíduos com risco elevado para o desenvolvimento ou recorrência de doença. Atualmente, existem vários métodos disponíveis, os quais, em geral, são empregados de forma conjunta com o intuito de se estabelecer a condição periodontal. O diagnóstico periodontal, estabelecido por métodos convencionais, baseia-se em dados provenientes da sondagem periodontal, associado ou não a técnicas radiográficas. Todavia, este tipo de exame, que avalia clinicamente o nível de inserção periodontal, profundidade de sondagem e reabsorção óssea alveolar, não é capaz de prever uma futura destruição periodontal. Os métodos convencionais só revelam resultados de eventos biológicos anteriores, mesmo que em um passado recente (Jeffcoat *et al.* 1995; Armitage 1996; Grisi *et al.* 2001).

Antigamente, acreditava-se que todas as bactérias eram igualmente patogênicas para os tecidos periodontais (Løe, 1965). Entretanto, as descobertas científicas das últimas décadas, relacionadas à etiologia e composição do biofilme têm determinado novos conceitos no que se refere a métodos diagnósticos e terapia periodontal. Com o estabelecimento da “hipótese da placa específica” ficou evidenciado que certos microrganismos apresentam relação com quadros característicos de doença periodontal (Loesche *et al.* 1976). E posteriormente, foi sugerido que estes microrganismos não atuam isoladamente, sendo importante que haja um equilíbrio entre espécies bacterianas patogênicas e espécies bacterianas benéficas (Socransky *et al.* 1998). Mais recentemente foi aceito que este depósito bacteriano ocorre na forma de biofilme, o qual consiste de uma ou mais comunidades de microrganismos, aderidos a uma superfície sólida, em um ambiente

físico-químico apropriado, possibilitando, assim, em determinadas áreas a completa redução de oxigênio (Socransky & Haffajee, 2002).

Além dos métodos tradicionais de diagnóstico, a caracterização da microbiota periodontopatogênica permite a realização de intervenções preventivas, evitando-se a ocorrência de perda de inserção clínica. Inúmeras técnicas podem e são utilizadas com este objetivo, destacando-se a cultura bacteriana, ensaios imunológicos e enzimáticos, além de técnicas que analisam o DNA bacteriano (Cortelli *et al.*, 2000). Especificamente, a caracterização da microbiota periodontal pode ser indicada como auxiliar no diagnóstico inicial e plano de tratamento, monitoramento da eficácia do tratamento, seleção de intervalos apropriados entre as consultas de manutenção, determinação da atividade da doença e definição de indivíduos de risco (Zambon & Haraszthy, 1995).

### **1.1 – BANA (Benzoyl-DL-Arginine-2-Naphthylamide)**

Socransky *et al.* (1998) descreveram a ocorrência no biofilme dental de 5 complexos bacterianos principais. Dos 5 complexos, o denominado complexo vermelho, é constituído por 3 espécies periodontopatogênicas, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* e mostra correlação com indicadores clínicos de doença. Embora, a formação de um complexo específico tenha sido descrita apenas em 1998, já havia sido identificada uma característica comum entre estas espécies bacterianas. *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola* têm a capacidade de produzir arginina hidrolase, uma enzima semelhante à tripsina que age na destruição das moléculas de colágeno (Bretz & Loesche; 1987, Loesche *et al.*, 1987). Com base neste perfil enzimático, foi idealizada uma reação laboratorial (Loesche *et al.*, 1990) denominada BANA, utilizando como substrato um peptídeo sintético (Benzoyl-DL-Arginine-Naphthylamide) ligado a um cromóforo. No primeiro ensaio laboratorial deste teste diagnóstico, a reação ocorria em meio líquido.

O BANA sólido (cartão) foi desenvolvido posteriormente ao ensaio líquido, a fim de oferecer um resultado rápido, obtido após 15 minutos de incubação a 55°C, trazendo ainda a possibilidade de uso na clínica diária. Neste teste, a presença em número elevado ( $10^4$  células) de *T. denticola*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* resultam numa coloração azul no cartão. Todavia esta reação independe da ocorrência

subgengival de apenas uma ou mais destas espécies bacterianas. Em casos de doença periodontal, não são esperadas respostas negativas, mas, se eventualmente elas forem encontradas provavelmente decorrem da ausência de bactérias em número suficiente levando a não marcação do cartão (Hemmings *et al.*,1997; Loesche *et al.*,1990; Watson *et al.*, 1991).

Loesche *et al.* (1990) compararam o resultado do teste BANA líquido com o resultado do cartão BANA. A sensibilidade e a especificidade com os dados clínicos foram para o BANA líquido de 74 e 76%, respectivamente; no BANA cartão foi de 81 e 78%, respectivamente. Os resultados apresentaram alta sensibilidade e baixa especificidade em relação aos parâmetros clínicos. Adicionalmente, ficou estabelecido que, somente *T. denticola*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* geraram reações positivas, enquanto outras 51 espécies bacterianas geraram, apenas, resultados negativos. Os 2 métodos mostraram ser semelhantes e os autores sugeriram a utilização do cartão, devido a maior facilidade.

Watson *et al.* (1991), compararam os resultados positivos do teste BANA e reação ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) em 620 amostras de biofilme dental obtidas de 157 indivíduos. Foram submetidas à reação ELISA as amostras de biofilme subgengival já dispostas sobre a superfície do cartão BANA, com o objetivo de se pesquisar isoladamente *T. denticola* e *P. gingivalis*. Dos indivíduos incluídos, 56% exibiram resultados positivos para o teste BANA, enquanto 86% dos indivíduos apresentaram *T. denticola* ou *P. gingivalis* pela reação ELISA. Isoladamente, *T. denticola* esteve presente em 79% dos indivíduos e *P. gingivalis* em 80% dos indivíduos. O teste BANA teve uma especificidade de 92% e uma sensibilidade de apenas 25% em relação ao teste ELISA. O teste BANA exibiu habilidade em detectar bactérias patogênicas, todavia, a reação ELISA apresentou resultados superiores.

Bretz *et al.* (1993), determinaram a sensibilidade, especificidade e precisão do teste BANA com a reação ELISA em 301 indivíduos dos quais foram analisados 1204 sítios periodontais. No total, o teste BANA teve 66% de sítios com resultados positivos, enquanto pela reação ELISA foram detectados individualmente 52% de *T. denticola*, 60% de *P. gingivalis* e 50% de *T. forsythensis*. A sensibilidade do BANA, comparado com os resultados obtidos com o sistema ELISA, na presença de uma ou mais das espécies bacterianas, variou entre 91% e 97%, a especificidade variou entre 67% e 89% e a precisão ficou entre 80% e 90%. Ao relacionar o teste BANA com a mensuração clínica observou-se sensibilidade entre 93% e 95%. A

especificidade do teste BANA de acordo com a condição clínica do indivíduo foi baixa (47%), tendo sido sugerida a colonização bacteriana da superfície radicular, sem evidência clínica de doença periodontal. A precisão do teste BANA com os dados clínicos variou entre 61% e 62%. Entre si, o teste BANA e o sistema ELISA apresentaram precisão de 90%, indicando que ambos detectaram a presença da doença periodontal, podendo, deste modo, o teste BANA ser usado em estudos de doença periodontal.

Hemmings *et al.* (1997), avaliaram a associação entre dois kits comerciais de diagnóstico microbiológico com a condição periodontal. Foram utilizados no estudo o Periocheck, que se baseia na atividade da enzima protease, e o BANA (Perioscan). Durante este estudo, os autores avaliaram 19 indivíduos com periodontite moderada e, de cada indivíduo, foram avaliados 5 sítios com doença periodontal e 2 sítios saudáveis, totalizando 125 sítios. No exame inicial, o Periocheck teve sensibilidade de 88% e especificidade de 61%, enquanto o BANA obteve uma sensibilidade de 99% e uma especificidade de 55% em relação aos dados clínicos. Após o tratamento, foram calculadas as probabilidades de associação entre os resultados do Periocheck e o exame clínico, e o valor encontrado foi 50,4%. Para o teste BANA, a probabilidade de associação encontrada foi de 52%. Os dois métodos não demonstraram refletir adequadamente a condição clínica periodontal.

Além de produzirem arginina hidrolase, *T. denticola*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis*, têm, ainda em comum, a capacidade de produzir e liberar sulfeto de hidrogênio e metil mercaptana. Morita *et al.* (2001) avaliaram o nível sulcular de sulfeto de hidrogênio e sua associação com a gravidade da doença periodontal e o resultados do teste BANA. O trabalho demonstrou que o nível de sulfeto de hidrogênio aumenta com a gravidade da doença periodontal, apresentando relação com a profundidade de sondagem e o sangramento à sondagem. Os resultados do teste BANA, também, exibiram associação com os níveis de sulfeto de hidrogênio observados e, por consequência, com os parâmetros clínicos periodontais.

Figueiredo *et al.* (2002) pesquisaram a relação entre reação BANA, halitose e a presença de doença periodontal estabelecida por diferentes critérios clínicos. Foram incluídos 21 indivíduos apresentando bolsas periodontais acima de 3mm de profundidade e 20 indivíduos controles saudáveis. A frequência de sítios periodontais com no mínimo 3mm, foi maior no grupo com resultados positivos para o teste BANA. Houve correlação entre halitose e hidrólise do substrato BANA,

confirmando, assim, que as bactérias subgengivais contribuem para o mau odor bucal.

Barbosa e Silva *et al.* (2003) verificaram a associação entre os níveis da enzima aspartato aminotransferase no fluido gengival com parâmetros clínicos, bem como com a hidrólise do substrato BANA em 22 indivíduos com bolsas periodontais. Não foi observada associação entre as duas enzimas, nem entre o perfil enzimático e os parâmetros clínicos.

Vergani *et al.* (2004) avaliaram diferentes modalidades terapêuticas, utilizando parâmetros clínicos e, como parâmetro microbiológico, o teste BANA. Os indivíduos incluídos no estudo tinham média de idade de 46 anos e receberam diagnóstico de periodontite crônica. Considerando-se as diferentes terapias, os resultados positivos iniciais do Teste BANA variaram entre 68,2% a 90,3%. No período de 90 dias de observação, após o término da terapia periodontal o número positivo de reações BANA, apresentou marcada redução e variou de 0,0 a 9,1%.

Figueiredo *et al.* (2005) investigaram a relação entre halitose, reações BANA positivas e condição periodontal de 17 indivíduos com Síndrome de Down, 17 indivíduos com retardo mental e 17 controles mentalmente saudáveis. Não foram observadas diferenças significativas para o número o positivo de reações BANA entre os grupos experimentais, tanto para as amostras subgengivais como para o dorso da língua. O grupo de indivíduos mentalmente saudáveis exibiu 10,8% de amostras linguais positivas e 84,3% de amostras subgengivais positivas. Entre os 3 grupos o padrão microbiológico determinado pelo teste BANA foi similar.

## **1.2 Checkerboard DNA-DNA hybridization**

Em 1994, Socransky *et al.* descreveram a técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para detecção de microrganismos bucais em indivíduos saudáveis ou com diferentes formas de doença periodontal. Esta técnica preconiza o uso de sondas de DNA e permite a identificação e a quantificação simultânea de até 45 espécies bacterianas em um número máximo de 28 amostras clínicas. A hibridização dá-se no formato de tabuleiro de xadrez, pois, após fixação do DNA na membrana em linhas separadas, o dispositivo sofre rotação em 90° para posterior deposição das sondas de DNA genômico.

Ali *et al.* (1997) avaliaram a microbiota de 42 indivíduos, 12 mulheres e 9 homens com saúde periodontal, e 12 mulheres e 9 homens com doença periodontal. Utilizou-se para a análise microbiológica as técnicas de cultura bacteriana, *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e o Affirm DP teste (hibridização com sondas de DNA). O teste comercial foi usado para detecção de *T. forsythensis*, *P. gingivalis* ( $10^5$  células) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ( $10^6$  células). O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* revelou presença mais acentuada de *T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, em indivíduos com doença periodontal e presença de *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* e *Capnocytophaga ochracea* mais acentuada em indivíduos saudáveis. O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* detectou *T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em 52% dos indivíduos, enquanto o Affirm DP não detectou *T. forsythensis* nas amostras. A técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* demonstrou resultados superiores à cultura bacteriana e ao kit comercial.

Socransky *et al.* (1998) avaliaram a ocorrência no sulco gengival de grupos bacterianos, processando pelo método *Checkerboard DNA-DNA hybridization* um total de 13.321 amostras de biofilme dental, provenientes de 185 indivíduos com periodontite crônica. Os resultados demonstraram a ocorrência de 5 complexos bacterianos principais: verde, amarelo, roxo, laranja e vermelho (Figura 1). Os autores observaram que as bactérias do “complexo vermelho” (*T. denticola*, *T. forsythensis* e *P. gingivalis*) necessitam da presença do “complexo laranja” (*Fusobacterium nucleatum* sp, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* e *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*), para colonizarem. As bactérias do “complexo vermelho” foram as mais relacionadas com a presença de bolsas periodontais profundas e sangramento à sondagem. Neste estudo, *P. gingivalis* não foi encontrada na ausência de *T. forsythensis*. As bactérias do “complexo laranja” demonstraram ter relação com o “complexo vermelho”, não apresentando esta mesma interação com os demais complexos. Já as bactérias do “complexo verde”, o qual inclui *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* sp., *Campylobacter concisus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo a; “complexo amarelo” *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. Intermedius* e “complexo roxo” constituído de *Veillonella parvula* e *Actinomyces*



*odontolyticus*, estão relacionadas com a saúde periodontal. Posteriormente, Socransky & Haffajee (2002) adicionaram um sexto grupo bacteriano, “complexo azul”, também associado a saúde periodontal e composto por 5 espécies de *Actinomyces*.

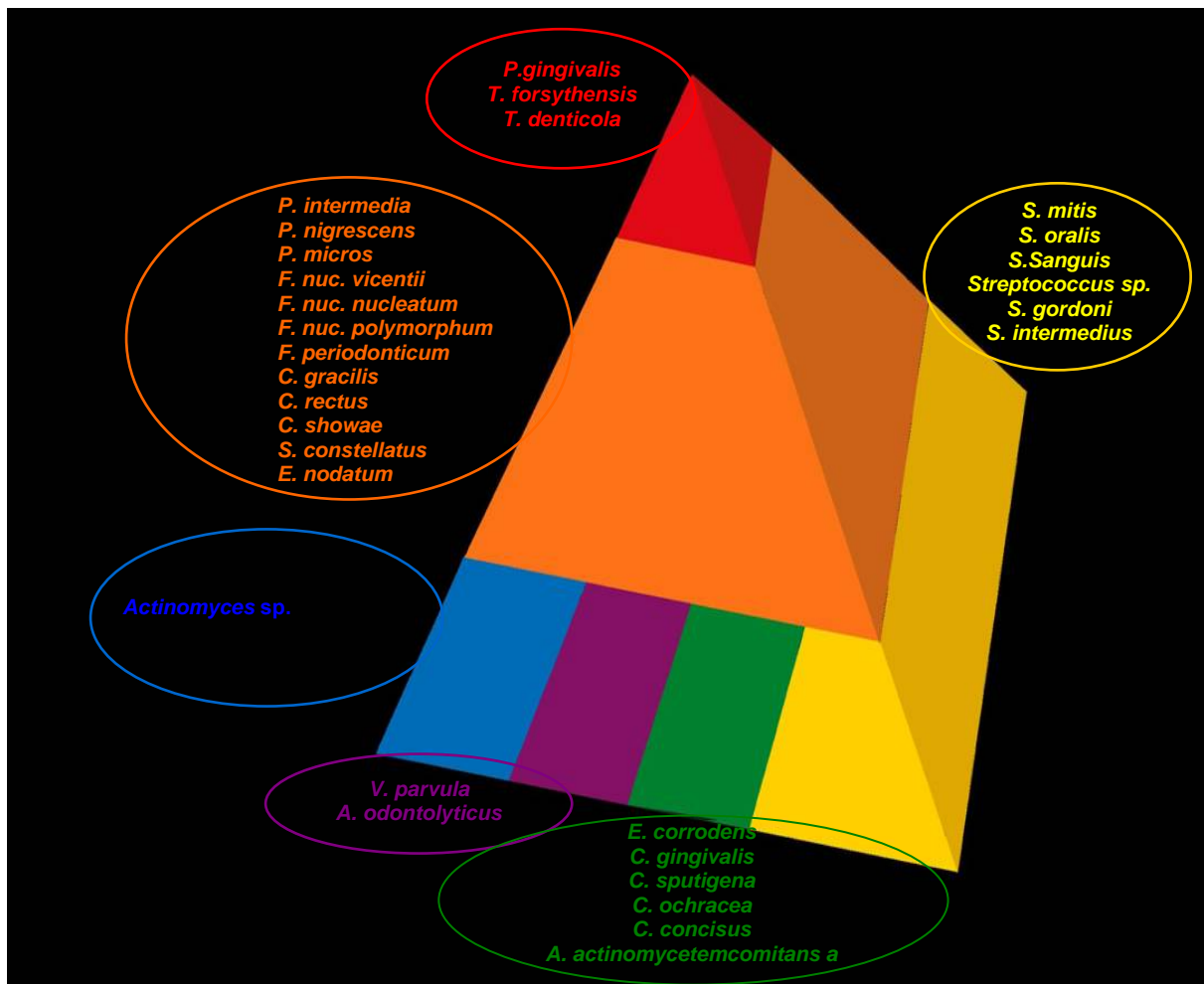


Figura 1: Descrição dos complexos bacterianos encontrados no sulco gengival humano. Adaptado de Socransky & Haffajee (2002).

Ximénez-Fyvie *et al.* (2000a), investigaram, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, o efeito do controle profissional do biofilme supragengival na composição da microbiota supragengival e subgengival. Foram avaliados 18 indivíduos com periodontite crônica. Após o exame inicial, os indivíduos receberam raspagem dental e alisamento radicular, e profilaxia semanal supragengival por 3

meses. Após o período de 3 meses, houve redução significativa no número de bactérias, nas amostras de biofilme dental tanto supra como subgingival. Nas amostras de biofilme supragengival, das 40 espécies analisadas, 22 foram significativamente reduzidas; nas amostras de biofilme subgingival, das 40 espécies bacterianas analisadas 34 tiveram uma redução significativa. O controle de biofilme dental, realizado pelo profissional, teve um efeito surpreendente sobre a ocorrência de espécies e de grupos bacterianos. O maior efeito da remoção de biofilme supragengival foi a redução no número total de microrganismos no biofilme supragengival e, também, uma redução no biofilme subgingival.

Ximénez-Fyvie *et al.* (2000b), compararam a composição da microbiota supra e subgingival de 22 indivíduos com saúde periodontal e 23 indivíduos com periodontite. As 1170 amostras de biofilme dental foram analisadas pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. A diferença mais notável entre a saúde e a doença periodontal foi observada na microbiota subgingival. As bactérias do “complexo vermelho” tiveram uma proporção pequena em indivíduos com saúde periodontal. Os níveis de *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *Selenomonas noxia* foram elevados em indivíduos com periodontite, onde as bactérias patogênicas também puderam ser detectadas na microbiota supragengival. As proporções de espécies dos “complexos vermelho e laranja” estavam significativamente aumentadas, tanto no ambiente supra como no subgingival, quando da presença de bolsas periodontais profundas.

Haffajee *et al.* (2001), utilizaram *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, para verificar o efeito da escova manual e da escova elétrica na composição da microbiota supra e subgingival. Foram incluídos 47 indivíduos, dos quais 25 usaram escova manual e 22 usaram escova elétrica. Amostras do biofilme dental foram coletadas inicialmente, no 3º e no 6º meses. Em cada exame foram avaliadas 1183 amostras de biofilme supragengival e 1183 amostras de biofilme subgingival. Verificou-se que ambas as técnicas de escovação reduzem a contagem total de bactérias, tanto para o biofilme supragengival como para o subgingival. O maior achado deste trabalho foi, que a remoção do biofilme supragengival acarretou a diminuição da principal fonte de colonização do biofilme subgingival.

Colombo *et al.* (2002), avaliaram a composição do biofilme subgingival de indivíduos brasileiros com periodontite crônica não tratada, utilizando o *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Foram incluídos 25 indivíduos com

periodontite crônica e 14 indivíduos saudáveis. As amostras foram coletadas de 4 sítios por dente, totalizando 4032 amostras. Verificou-se que as espécies que apareceram com mais frequência foram: *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *Eubacterium nodatum* e *Fusobacterium nucleatum ss vincentii*. Os autores concluíram que indivíduos brasileiros, com periodontite crônica não tratada, possuem as mesmas espécies periodontopatogênicas observadas em outras populações.

Mager *et al.* (2003), examinaram amostras de saliva e 8 superfícies de tecido mole intra-bucais e compararam com amostras de biofilme supra e subgingival. Amostras de 225 indivíduos foram analisadas, sendo que destes, 45 foram selecionados para a coleta das amostras supra e subgingivais. As amostras foram analisadas com *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Verificou-se que na saliva e na superfície lateral e dorsal da língua ocorreu uma maior proporção de *Veillonella parvula* e *Prevotella melaninogenica*, enquanto que *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* foram, proporcionalmente, menores na saliva e no dorso da língua. Conclui-se que a proporção das espécies bacterianas foi diferente nas superfícies intra-bucais. A microbiota dental diferiu daquela observada nos demais tecidos moles intra-bucais.

Haffajee *et al.* (2004), estudaram a composição do biofilme subgingival de 300 indivíduos de 4 países (Brasil, Chile, Suécia e Estados Unidos da América). A análise microbiológica estabelecida por *Checkerboard DNA-DNA hybridization* demonstrou maiores proporções de *P. gingivalis* no Chile, enquanto *T. denticola* foi a espécie mais prevalente no Brasil. *T. forsythensis* não exibiu diferenças estatísticas significativas nas diversas regiões geográficas. A composição microbiana subgingival variou entre os indivíduos dos 4 países.

Haffajee *et al.* (2005), verificaram a ocorrência de diferença entre o biofilme subgingival de indivíduos periodontalmente saudáveis da Suécia e dos Estados Unidos da América. Do total de 158 indivíduos, 79 eram da Suécia e 79 dos Estados Unidos da América. A análise microbiológica foi realizada utilizando-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. O perfil do biofilme subgingival dos indivíduos dos 2 países foi diferente. Ocorreu uma maior heterogeneidade do biofilme subgingival nos indivíduos americanos, sendo este fato atribuído pelos autores à maior diversidade genética e microbiológica.

## 2. PROPOSIÇÃO

Comparar os resultados do Teste BANA, adotando-se como técnica padrão o *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, no diagnóstico inicial e no monitoramento terapêutico de indivíduos com periodontite crônica moderada.

E, avaliar a ocorrência e as diferentes concentrações das bactérias do “complexo vermelho”, relacionadas com cada nível de atividade enzimática.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. População alvo e procedimentos periodontais**

Foram selecionados 60 indivíduos com periodontite crônica moderada (Armitage, 2002) que procuraram atendimento na clínica do Curso de Odontologia da Universidade Guarulhos, atendendo aos seguintes critérios de inclusão: possuir no mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares; idade acima de 30 anos; não ser fumante; não estar grávida ou amamentando; história negativa de tratamento periodontal, antibioticoterapia ou uso de anti-sépticos bucais nos últimos seis meses; história negativa de doença sistêmica, que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento periodontal. Além disso, possuísem no mínimo 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal, apresentando profundidade de sondagem entre 5 e 7mm e nível clínico de inserção entre 5 e 10mm. Estes 6 sítios deveriam estar dispostos em superfícies interproximais não contíguas e distribuídos em quadrantes distintos. Os indivíduos, que atenderam aos critérios de inclusão, participaram do estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (ANEXO1).

A avaliação clínica inicial foi realizada por 2 examinadores calibrados ( $\kappa = 92\%$ ), utilizando-se sondas periodontais manuais (PC15-BR – HU-FRIEDY) e, observando-se os seguintes parâmetros clínicos: Índice de placa Visível – IPV (0,1); Índice de Sangramento Gengival – IG (0,1); Profundidade de Sondagem – PS (mm); Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Sangramento à Sondagem – SS (0,1) e Supuração – SUP (0,1). Os parâmetros clínicos foram avaliados em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual).

A terapia periodontal também foi realizada por 2 examinadores treinados, utilizando-se como padrão de qualidade da raspagem dental e alisamento radicular (RAR) a verificação realizada por um docente especialista. Os procedimentos de raspagem e alisamento radicular foram realizados em 6 sessões de 1 hora cada, em um período máximo de 21 dias. Para o autocontrole mecânico de biofilme foram fornecidos escova dental multitufo e dentifrício. Escovas unitufo e interproximais foram indicadas e fornecidas de acordo com as necessidades individuais.

### 3.2. Análise microbiológica

Os sítios avaliados microbiologicamente, em um total de 6 por indivíduo, estavam localizados em faces dentárias interproximais não-contíguas, com profundidade de sondagem entre 5-7mm e nível clínico de inserção entre 5-10mm. Diante de valores idênticos de PS, selecionou-se o sítio mais comprometido, ou seja, com maior perda de inserção clínica e com maiores escores dos índices periodontais avaliados. As amostras de biofilme subgengival foram coletadas com curetas Gracey mini-five 5/6, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy), previamente esterilizadas, da porção mais apical da bolsa periodontal. Uma única amostra de biofilme subgengival, foi dividida atendendo às necessidades de ambas as técnicas microbiológicas.

As análises microbiológicas foram realizadas em 4 tempos experimentais:

- ❖ Tempo 0 - momento inicial, determinação do diagnóstico periodontal;
- ❖ Tempo 1 - imediatamente após o término da RAR;
- ❖ Tempo 2 - monitoramento terapêutico, 45 dias após o término da terapia periodontal, que além de RAR incluiu o autocontrole mecânico de biofilme, e
- ❖ Tempo 3 - monitoramento terapêutico, 60 dias também após o término da terapia periodontal.

#### 3.2.1. BANA (Benzoyl-DL-Arginine-2-Naphthylamide)

O teste BANA foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Loesche *et al.* (1990). O conjunto é composto de uma incubadora e cartões (Knowell™) (Figura 2), nos quais o nome de cada indivíduo e a data do exame foram anotados na parte superior. A parte inferior do cartão contém o substrato N-Benzoyl-DL-Arginina-2-Naftilamida e corresponde à região onde foram depositadas as amostras de biofilme subgengival. Desta forma, para cada indivíduo foram utilizados dois cartões. Para a obtenção das amostras as curetas foram posicionadas na porção mais apical da bolsa periodontal.



Figura 2: Foto ilustrativa dos componentes do teste BANA; 1-Incubadora; 2- cartão reativo; 3-Frasco para armazenamento de cartões.

Após a coleta e deposição das amostras subgengivais na parte inferior do cartão BANA, que contém o corante negro de Evans (Figura 3), a sua parte superior, foi umedecida com água destilada, com auxílio de uma gaze estéril. O cartão foi dobrado na marca da linha pontilhada e incubado por 15 minutos, sob temperatura de 55°C (Amalfitano *et al.*, 1993; Feitosa *et al.*, 1993). Após a incubação, o cartão foi cuidadosamente removido e a atividade enzimática observada:

- ❖ *Reação negativa* (Escore 0): a coloração do cartão manteve-se inalterada o que indicou ausência de atividade enzimática e, conseqüentemente, concentrações bacterianas ( $\leq 10^4$  células) abaixo do limite de detecção do teste (Figura 4A).
- ❖ *Reação fracamente positiva* (Escore 1): representada pela presença de coloração azul pouco definida, a qual indicou atividade enzimática moderada e, conseqüentemente, uma concentração bacteriana entre  $10^4$  -  $10^5$  células (Figura 4B).

- ❖ *Reação fortemente positiva* (Escore 2): presença de coloração azul bem definida, a qual indicou atividade enzimática acentuada e, conseqüentemente, uma concentração bacteriana superior a  $10^5$  células (Figura 4C).



Figura 3: Destaque para a parte superior do cartão BANA que contém o corante negro de Evans.

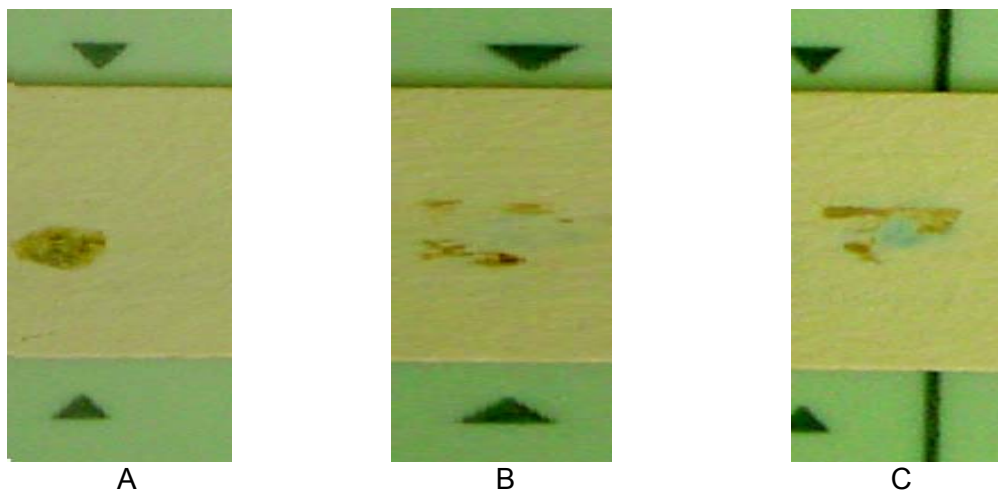


Figura 4: Diferentes padrões de atividade enzimática associadas à reação BANA. A = escore 0 (atividade enzimática ausente); B = escore 1 (atividade enzimática moderada) e C = escore 2 (atividade enzimática acentuada).

A leitura dos resultados do Teste BANA foi feita por dois indivíduos calibrados (Kappa= 91%), tendo sido os escores confirmados pelo examinador padrão.



### 3.2.2. *Checkerboard DNA-DNA hybridization*

Após a deposição no cartão BANA, o restante da amostra foi imediatamente depositado em tubos plásticos individuais contendo 150µl de solução TE (pH 7,6), ao qual foram adicionados 100µl de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. Estes tubos foram então identificados e armazenados até serem analisados por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para as 3 cepas bacterianas, no laboratório de microbiologia da Universidade Guarulhos.

#### 3.2.2.1. Condições de crescimento, isolamento do DNA bacteriano e preparo das sondas genômicas

As cepas bacterianas do “complexo vermelho” (*P. gingivalis*\*, *T. denticola*\*\* e *T. forsythensis*\*\*\*)<sup>1</sup> foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). O conteúdo liofilizado de *P. gingivalis* e *T. forsythensis* foi inicialmente re-hidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e posteriormente cultivado em meios de cultura sólidos enriquecidos. O cultivo de *T. forsythensis* foi realizado em placas de Petri contendo ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); enquanto *P. gingivalis* foi semeado em um meio similar, também suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, e adicionado de 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *T. denticola* foi cultivado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino. Os meios de cultura foram incubados a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>) por um período de 3 a 7 dias.

Após este período de incubação, as colônias foram raspadas, depositadas em tubos de microcentrífuga contendo 1ml de solução-tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6) e lavadas 2 vezes por centrifugação em TE a 3.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células destas cepas Gram-negativas foram novamente

---

\* cepa ATCC 33277; \*\* cepa ATCC B1; \*\*\* cepa ATCC 43037

suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). O DNA bacteriano foi isolado e purificado como descrito por Smith *et al.* (1989). As sondas multi-genômicas (*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 3 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983).

### 3.2.2.2. Hibridização DNA-DNA

As suspensões contidas nos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de placa bacteriana contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immuntics, Cambridge, MA, USA) (Figura 5) ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x 15cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do *Minislot* (Immuntics) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky *et al.*, 1994; Haffajee *et al.*, 1997a, b). A membrana foi então removida do *Minislot* (Immuntics) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a 120° C por 20 minutos.

A membrana foi pré-hibridizada a 42° C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x *standard saline citrate* - SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim).

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* (Immuntics) (Figura 6) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* (Immuntics) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42° C.

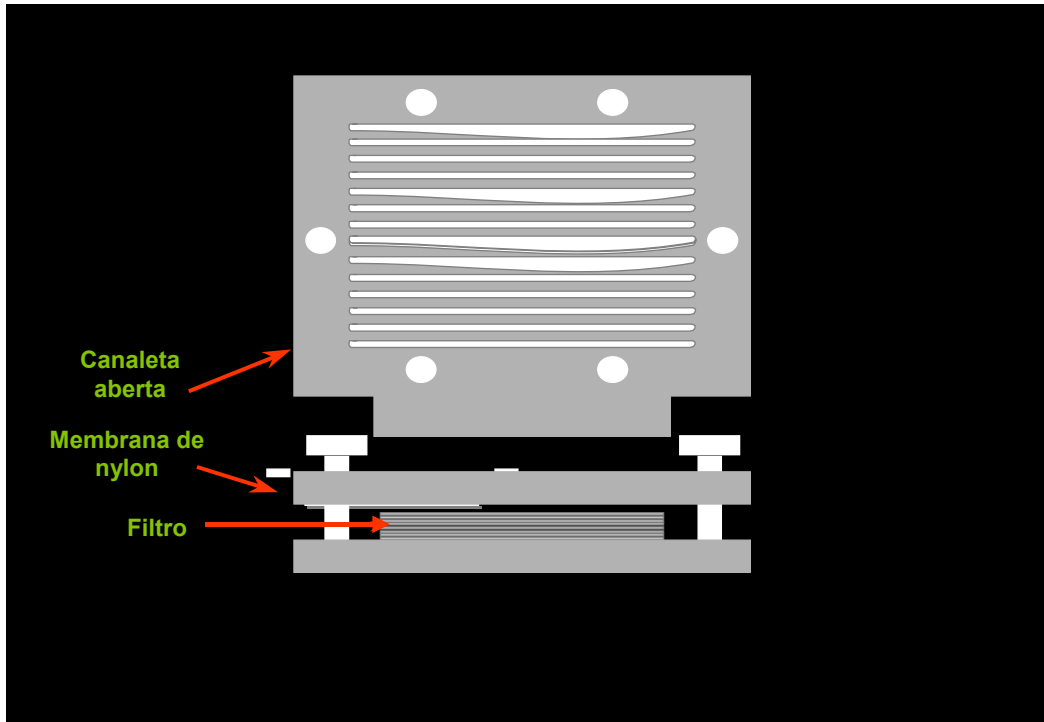


Figura 5: Ilustração esquemática do aparato denominado MiniSlot 30™

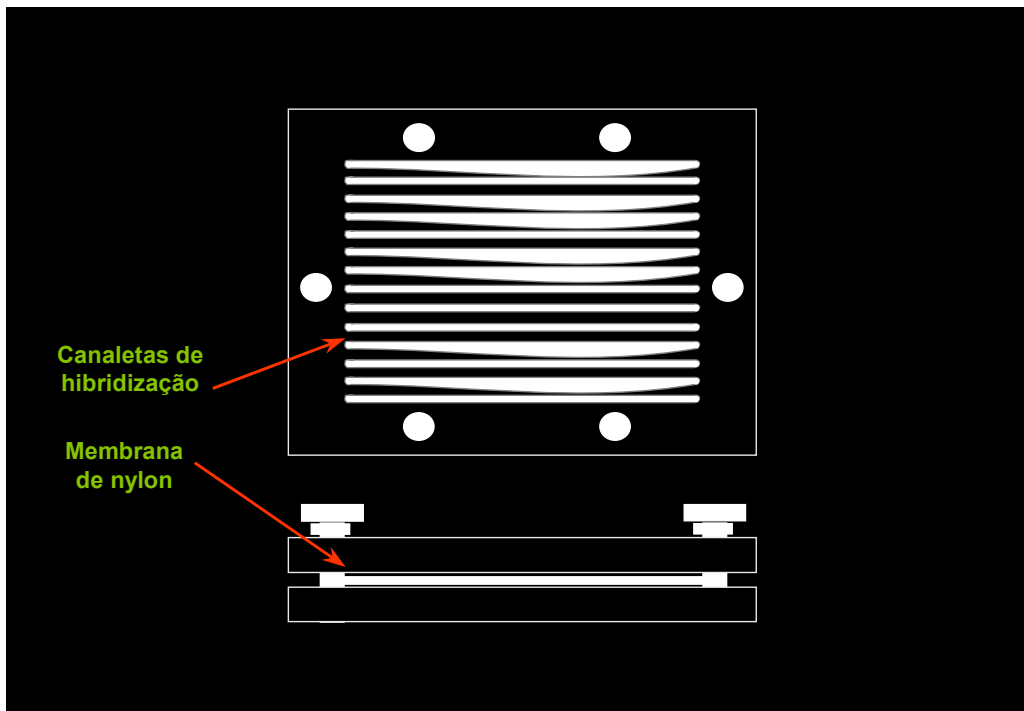


Figura 6: Ilustração esquemática do Miniblotter 45™

### 3.2.2.3. Detecção das espécies bacterianas

Após o período de hibridização (Figura 7), a membrana foi removida do *Miniblotter* (Immunetics) lavada por 40 minutos, a 65°C numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi depois lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England,UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Haffajee *et al.* 2001) manualmente pelo método convencional tempo-temperatura, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20°C. A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra clínica foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10<sup>5</sup> células; 2 equivaleu a aproximadamente 10<sup>5</sup> células; 3, entre 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células; 4 aproximadamente 10<sup>6</sup> células e 5, mais de 10<sup>6</sup> células. A partir desta escala original os escores foram posteriormente reclassificados (Quadro 1).

A descrição completa das soluções e tampões utilizados se encontra no Anexo 2.

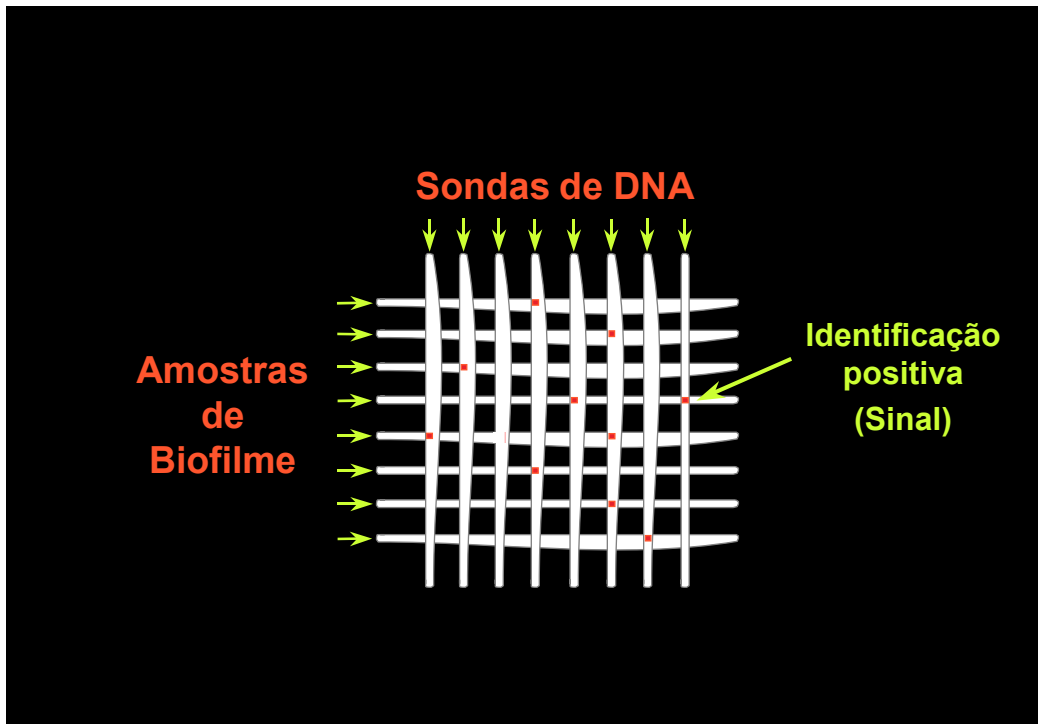


Figura 7: Ilustração esquemática de detecção decorrente da hibridização das sondas de DNA genômico com as amostras subgingivais

### 3.3. Análise estatística

Os valores dos erros intra e inter-examinadores relativos aos dados clínicos e microbiológicos foram analisados, utilizando-se o teste estatístico Kappa.

No presente estudo, a partir dos escores originais do *Checkerboard DNA - DNA hybridization* foram estabelecidas duas reclassificações (Quadro 1). A primeira foi adotada para a interpretação da atividade enzimática (ausente, moderada ou acentuada) pela concentração bacteriana, aplicando-se os testes Análise de Variância – ANOVA e Wilcoxon. E, a segunda reclassificação foi utilizada para análise pelo teste Qui-quadrado e cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Os valores de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo do Teste BANA, em relação ao *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram determinados nos 4 tempos experimentais tanto para o “complexo vermelho” como para as 3 espécies bacterianas isoladamente. O teste

Qui-Quadrado foi utilizado, para associar os resultados do teste BANA com os do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

O valor de  $p$  considerado foi de 0,05 para a existência de associação entre os resultados obtidos. Os dados foram tabulados em planilhas Excel (Microsoft®) e analisados estatisticamente, utilizando-se os *softwares* Bioestat® 5.0 e SPSS® 11.5.

Quadro 1: Reclassificação dos resultados do *Checkerboard DNA - DNA hybridization* a partir dos escores originais.

<b>Escores originais</b>	<b>Escores: 1<sup>a</sup> reclassificação</b>	<b>Escores: 2<sup>a</sup> reclassificação</b>
<b>0: <math>\leq 10^4</math> bactérias</b>	<b>0: <math>\leq 10^4</math> bactérias</b>	<b>0: <math>\leq 10^4</math> bactérias</b>
<b>1: <math>&lt; 10^5</math> bactérias</b>	<b>1: <math>10^4 - 10^5</math> bactérias</b>	<b>1: <math>&gt; 10^4</math></b>
<b>2: <math>10^5</math> bactérias</b>		
<b>3: <math>10^5 - 10^6</math> bactérias</b>	<b>2: <math>&gt; 10^5</math></b>	
<b>4: <math>10^6</math> bactérias</b>		
<b>5: <math>&gt; 10^6</math> bactérias</b>		

## 4. RESULTADOS

### 4.1. População estudada

Sessenta indivíduos atenderam aos critérios de inclusão e, inicialmente, aceitaram participar do estudo. Dos 60 indivíduos selecionados, 53 (88,33%) finalizaram o estudo. Assim, 7 indivíduos não completaram o tempo experimental de 60 dias. Destes, um indivíduo faleceu e 6 tiveram seus dados excluídos, 2 por terem apresentado problemas na reação do teste BANA e 4 por terem exibido problemas na leitura dos filmes radiográficos.

Os participantes que completaram o estudo tinham entre 30 e 61 ( $42 \pm 7,58$ ) anos de idade, 34 eram do gênero feminino e 19 eram do gênero masculino. O Quadro 2 caracteriza a população estudada de acordo com os parâmetros clínicos avaliados. Os valores médios de PS e NCI foram compatíveis com a gravidade da doença, enquanto a média das freqüências de SS, IG e IPV foram compatíveis com o tipo de patologia periodontal.

Quadro 2: Valores médios das variáveis contínuas (PS e NCI, em mm) e a freqüência das variáveis categóricas (SS, IPV, IG em porcentagem) observados no exame inicial.

<b>Parâmetro clínico</b>	<b>Valores mínimo e máximo</b>	<b>Média e Desvio Padrão</b>
Profundidade de sondagem em mm – PS	1 - 15	3,66 ± 1,77
Nível clínico de inserção em mm – NCI	0 - 15	4,15 ± 2,17
Sangramento à Sondagem em % - SS	20 – 96	59,20 ± 19,80
Índice de Placa Visível em % – IPV	44 – 100	82,30 ± 12,40
Índice de Sangramento Gengival em % - IG	7 - 89	35,20 ± 19,40

## 4.2 Resultados microbiológicos

Foram obtidas amostras subgingivais de 6 sítios periodontais, para cada indivíduo (n=53), de modo que foram analisados em cada tempo experimental o total de 318 amostras microbiológicas, totalizando ao final do estudo 1.272 amostras microbiológicas.

A distribuição das freqüências de escores do Teste BANA e *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, após a primeira reclassificação, nos 4 tempos experimentais, estão apresentados no Quadro 3. As figuras 8 e 9 exibem a porcentagem dos escores para o teste BANA e *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, respectivamente. Em relação às proporções observadas nos 4 tempos experimentais, para os diferentes escores, os padrões observados foram similares para as duas técnicas microbiológicas. Exceto pelos resultados observados aos 45 dias (T2), houve uma tendência de alteração dos escores de 2 para 0 ao longo do período de observação.

Quadro 3: Freqüências de escores do teste BANA e *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, após recodificação, nos diferentes tempos experimentais

Freqüências	Escore 0		Escore 1		Escore 2	
	BANA	Ck	BANA	Ck	BANA	Ck
T0 (Inicial)	18	49	44	40	256	229
T1 (Imediato)	152	186	74	84	92	48
T2 (45 dias)	126	134	75	90	117	94
T3 (60 dias)	163	128	77	100	78	90

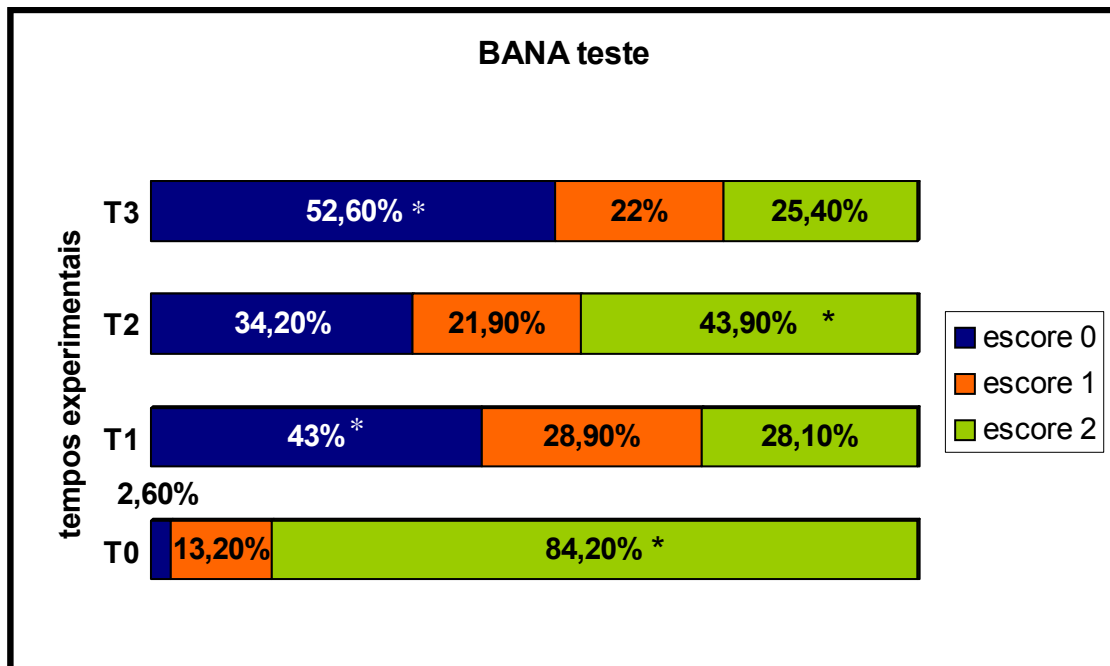
Ck – *Checkerboard DNA – DNA hybridization*; BANA - Benzoyl-DL-Arginine-2-Naphthylamide

BANA escores: 0 = atividade enzimática ausente; escore 1 = atividade enzimática moderada; escore 2 = atividade enzimática acentuada

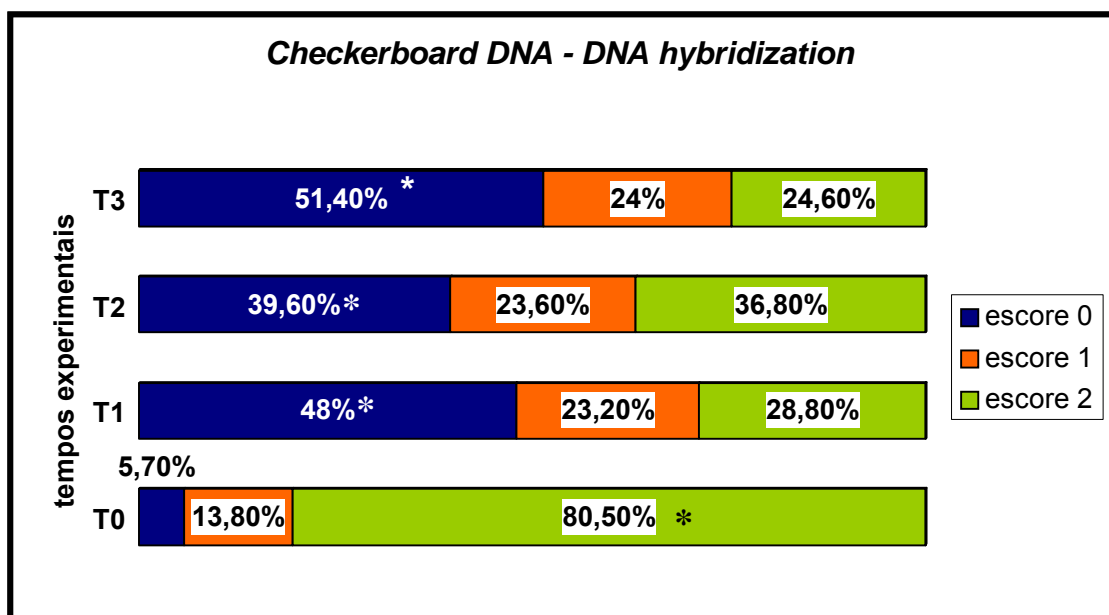
Ck Escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $10^4 - 10^5$  células, 2 =  $\geq 10^5$  células



Figura 8: Porcentagem dos escores do Teste BANA nos 4 tempos experimentais



BANA escores: 0 = atividade enzimática ausente; escore 1 = atividade enzimática moderada; escore 2 = atividade enzimática acentuada, \* diferença estatisticamente significativa entre os diferentes escores para cada tempo experimental (ANOVA e Wilcoxon  $p < 0,05$ ); T0 – inicial, T1 – imediato, T2 – 45 dias, T3 – 60 dias

Figura 9: Porcentagem dos escores do *Checkerboard DNA – DNA hybridization* nos 4 tempos experimentais

*Checkerboard DNA – DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $10^4 - 10^5$  células, 2 =  $\geq 10^5$  células; \* diferença estatisticamente significativa entre os diferentes escores para cada tempo experimental (ANOVA e Wilcoxon  $p < 0,05$ ); T0 – inicial, T1 – imediato, T2 – 45 dias, T3 – 60 dias

As possíveis combinações entre as três espécies bacterianas, que compõem o “complexo vermelho”, relacionadas a cada um dos três possíveis padrões de atividade enzimática estabelecida pelo teste BANA, estão apresentadas nos Quadros 4 – 7 de acordo com os tempos experimentais. Nestes quadros, foi adotada a primeira reclassificação de escores do *Checkerboard DNA – DNA hybridization*. No exame inicial, a ausência de atividade enzimática não foi acompanhada de ausência bacteriana (Quadro 4). Em T1, o escore 0 de *T. denticola* foi o resultado que mais contribuiu para o escore 0 do BANA (Quadro 5). Os Quadros 6 e 7 mostram respectivamente que tanto em T2 como em T3 para o escore 1 do BANA as maiores freqüências foram dos escores 2 do *Checkerboard DNA – DNA hybridization* para *P. gingivalis* e *T. forsythensis*. Freqüências mais elevadas de escore 2 (*Checkerboard DNA – DNA hybridization*) para *P. gingivalis* e *T. forsythensis*, também, foram observadas, quando da ocorrência de atividade enzimática acentuada em todos os tempos experimentais.

Quadro 4: Interpretação dos resultados do teste BANA, de acordo com a freqüência das diferentes concentrações bacterianas estabelecidas pelo *Checkerboard DNA – DNA hybridization*, após reclassificação dos escores. Dados observados no exame inicial (T0).

		<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>								
		<i>P. gingivalis</i>			<i>T. denticola</i>			<i>T. forsythensis</i>		
		Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2
<b>B A N A</b>	Escore 0 Atividade enzimática Ausente	04	03	11*	04	02	12*	02	01	15*
	Escore 1 Atividade enzimática Moderada	07	07	30*	12	07	25	06	03	35*
	Escore 2 Atividade enzimática Acentuada	13	10	233*	30	29	197	13	05	238*

*Checkerboard DNA – DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $10^4 - 10^5$  células, 2 =  $\geq 10^5$  células; \*diferença estatística significativa entre os escores 0, 1 e 2 do *Checkerboard DNA – DNA hybridization* para cada microrganismo (ANOVA e Wilcoxon,  $p < 0,05$ )

Quadro 5: Interpretação dos resultados do teste BANA, de acordo com a frequência das diferentes concentrações bacterianas estabelecidas pelo *Checkerboard DNA - DNA hybridization*, após reclassificação dos escores. Dados observados imediatamente após o término da raspagem e alisamento radicular (T1).

			<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>								
			<i>P. gingivalis</i>			<i>T. denticola</i>			<i>T. forsythensis</i>		
			Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	47	61	44	92*	38	22	75	31	46
	Escore 1	Atividade enzimática Moderada	12	38*	24	37*	30*	07	24	20	30*
	Escore 2	Atividade enzimática Acentuada	15	24	53*	37	28	27	20	24	48*

*Checkerboard DNA - DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $10^4 - 10^5$  células, 2 =  $\geq 10^5$  células; \*diferença estatística significativa entre os escores 0, 1 e 2 do *Checkerboard DNA - DNA hybridization* para cada microrganismo (ANOVA e Wilcoxon,  $p < 0,05$ )

Quadro 6: Interpretação dos resultados do teste BANA, de acordo com a frequência das diferentes concentrações bacterianas estabelecidas pelo *Checkerboard DNA - DNA hybridization*, após reclassificação dos escores. Dados observados 45 dias após o término da terapia periodontal (T2).

			<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>								
			<i>P. gingivalis</i>			<i>T. denticola</i>			<i>T. forsythensis</i>		
			Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	35	50	41	58*	37	31	43	32	51
	Escore 1	Atividade enzimática Moderada	19	20	36*	25	21	29	22	14	39*
	Escore 2	Atividade enzimática Acentuada	09	39	69*	39	32	46	21	22	74*

*Checkerboard DNA - DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $10^4 - 10^5$  células, 2 =  $\geq 10^5$  células; \*diferença estatística significativa entre os escores 0, 1 e 2 do *Checkerboard DNA - DNA hybridization* para cada microrganismo (ANOVA e Wilcoxon,  $p < 0,05$ )

Quadro 7: Interpretação dos resultados do teste BANA, de acordo com a frequência das diferentes concentrações bacterianas estabelecidas pelo *Checkerboard DNA - DNA hybridization*, após reclassificação dos escores. Dados observados 60 dias após o término da terapia periodontal (T3).

		<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>									
		<i>P. gingivalis</i>			<i>T. denticola</i>			<i>T. forsythensis</i>			
		Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 0	Escore 1	Escore 2	
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	30	61	72*	65	49	49	39	39	85*
	Escore 1	Atividade enzimática Moderada	11	26	40*	28	26	23	14	20	43*
	Escore 2	Atividade enzimática Acentuada	02	23	53*	28	13	37	07	15	56*

*Checkerboard DNA - DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $10^4 - 10^5$  células, 2 =  $\geq 10^5$  células; \*diferença estatística significativa entre os escores 0, 1 e 2 do *Checkerboard DNA - DNA hybridization* para cada microrganismo (ANOVA e Wilcoxon,  $p < 0,05$ )

Os resultados da análise do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) bem como os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), considerando-se de forma isolada as três espécies bacterianas, que compõem o “complexo vermelho”, estão expressos nos quadros 8 a 11 de acordo com os tempos experimentais. Para estas análises foram considerados os escores decorrentes da segunda reclassificação.

Não foram observadas associações entre os resultados do teste BANA e presença de *T. denticola* no exame inicial e 60 dias após o término da terapia periodontal. Os resultados das duas técnicas microbiológicas, também, não exibiram associação para *T. forsythensis* em T0.

No exame inicial, a sensibilidade do teste BANA foi alta para as 3 bactérias. Nos demais exames não foi satisfatória. Os valores de especificidade mostraram-se abaixo dos limites aceitáveis (80%).

Quadro 8: Associação entre os resultados das 2 técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se isoladamente as 3 espécies bacterianas. Dados observados no exame inicial (T0).

			<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>					
			<i>P. gingivalis</i>		<i>T. denticola</i>		<i>T. forsythensis</i>	
			Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	04	14	04	14	02	16
	Escore 1	Atividade enzimática presente	20	280	42	258	19	281
$\chi^2$ e p			5,89 0,015		NS		NS	
S			95,24%		94,85%		94,61%	
E			16,67%		8,7%		9,52%	
VPP			93,33%		86%		93,67%	
VPN			22,22%		22,22%		11,11%	

Checkerboard DNA – DNA hybridization escores: 0 = < 10<sup>5</sup> células, 1 = ≥ 10<sup>5</sup> células; NS = não-significativo (p < 0,05);  $\chi^2$  = Qui-Quadrado; S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo.

Quadro 9: Associação entre os resultados das 2 técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se isoladamente as 3 espécies bacterianas. Dados observados, imediatamente, após o término da raspagem e alisamento radicular (T1).

			<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>					
			<i>P. gingivalis</i>		<i>T. denticola</i>		<i>T. forsythensis</i>	
			Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	47	105	92	60	02	16
	Escore 1	Atividade enzimática presente	27	139	74	92	19	281
$\chi^2$ e p			9,55 e 0,002		8,09 e 0,004		17,67 e 0,000	
S			56,97%		60,53%		61,31%	
E			63,51%		55,42%		63,03%	
VPP			83,73%		55,42%		73,49%	
VPN			30,92%		60,53%		49,34%	

Checkerboard DNA – DNA hybridization escores: 0 = < 10<sup>5</sup> células, 1 = ≥ 10<sup>5</sup> células; NS = não-significativo (p < 0,05);  $\chi^2$  = Qui-Quadrado; S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo.

Quadro 10: Associação entre os resultados das 2 técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se isoladamente as 3 espécies bacterianas. Dados observados 45 dias após o término da terapia periodontal (T2).

			<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>					
			<i>P. gingivalis</i>		<i>T. denticola</i>		<i>T. forsythensis</i>	
			Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	35	91	58	68	43	83
	Escore 1	Atividade enzimática presente	28	164	64	128	43	149
$\chi^2$ e p			8,337 e 0,004		5,188 e 0,023		5,306 e 0,021	
S			64,31%		65,31%		64,22%	
E			55,56%		47,54%		50%	
VPP			85,42%		66,67%		77,60%	
VPN			27,78%		46,03%		34,13%	

Checkerboard DNA – DNA hybridization escores: 0 = < 10<sup>5</sup> células, 1 = ≥ 10<sup>5</sup> células; NS = não-significativo (p < 0,05);  $\chi^2$  = Qui-Quadrado; S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo.

Quadro 11: Associação entre os resultados das 2 técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se isoladamente as 3 espécies bacterianas. Dados observados 60 dias após o término da terapia periodontal (T3).

			<b>Checkerboard DNA-DNA hybridization</b>					
			<i>P. gingivalis</i>		<i>T. denticola</i>		<i>T. forsythensis</i>	
			Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1	Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	30	133	65	98	39	124
	Escore 1	Atividade enzimática presente	13	142	56	99	21	134
$\chi^2$ e p			6,819 e 0,009		NS		5,590 e 0,018	
S			51,64%		50,25%		51,94%	
E			69,77%		53,72%		65%	
VPP			91,61%		63,87%		86,45%	
VPN			18,40%		39,88%		23,93%	

Checkerboard DNA – DNA hybridization escores: 0 = < 10<sup>5</sup> células, 1 = ≥ 10<sup>5</sup> células; NS = não-significativo (p < 0,05);  $\chi^2$  = Qui-Quadrado; S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo.

Os quadros 12 a 15 apresentam os resultados referentes à análise do “complexo vermelho”, ou seja, da presença ou ausência simultânea de *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*. Os resultados do teste BANA demonstraram associação com a identificação do “complexo vermelho”, apenas no exame inicial.

Para o “complexo vermelho”, os valores de sensibilidade também foram adequados, apenas, no exame inicial. E, os valores de especificidade foram sempre baixos (Figura 10).

Quadro 12: Associação entre os resultados das duas técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se o “complexo vermelho”. Dados observados no exame inicial (T0).

			<i>Checkerboard DNA – DNA hybridization</i>	
			complexo vermelho	
			Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	17	43
	Escore 1	Atividade enzimática Presente	30	228
$\chi^2$ e p			10,79 e 0,001	
S			84,13%	
E			39,53%	
VPP			88,37%	
VPN			28,33%	

*Checkerboard DNA – DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $> 10^4$  células; NS = não-significativo ( $p < 0,05$ ); S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo;  $\chi^2$  = Qui-Quadrado.

Quadro 13: Associação entre os resultados das duas técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se o “complexo vermelho”. Dados observados imediatamente após o término da raspagem e alisamento radicular (T1).

			<i>Checkerboard DNA – DNA hybridization</i>	
			complexo vermelho	
			Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	125	77
	Escore 1	Atividade enzimática presente	59	57
$\chi^2$ e p			NS	
S			42,54%	
E			67,93%	
VPP			45,24%	
VPN			61,88%	

*Checkerboard DNA – DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $> 10^4$  células; NS = não-significativo ( $p < 0,05$ ); S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo;  $\chi^2$  = Qui-Quadrado.

Quadro 14: Associação entre os resultados das duas técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se o “complexo vermelho”. Dados observados 45 dias após o término da raspagem e alisamento radicular (T2).

			<i>Checkerboard DNA – DNA hybridization</i>	
			complexo vermelho	
			Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	92	109
	Escore 1	Atividade enzimática presente	42	75
$\chi^2$ e p			NS	
S			40,76%	
E			68,66%	
VPP			64,10%	
VPN			45,77%	

*Checkerboard DNA – DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $> 10^4$  células; NS = não-significativo ( $p < 0,05$ ); S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo;  $\chi^2$  = Qui-Quadrado.



Quadro 15: Associação entre os resultados das duas técnicas microbiológicas, após reclassificação dos escores, considerando-se o “complexo vermelho”. Dados observados 60 dias após o término da raspagem e alisamento radicular (T3).

			<i>Checkerboard DNA – DNA hybridization</i>	
			complexo vermelho	
			Escore 0	Escore 1
<b>B A N A</b>	Escore 0	Atividade enzimática Ausente	115	125
	Escore 1	Atividade enzimática presente	28	50
$\chi^2$ e p			NS	
S			28,57%	
E			80,42%	
VPP			64,10%	
VPN			47,92%	

*Checkerboard DNA – DNA hybridization* escores: 0 =  $\leq 10^4$  células, 1 =  $> 10^4$  células; NS = não-significativo ( $p < 0,05$ ); S= Sensibilidade; E= Especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo;  $\chi^2$  = Qui-Quadrado.

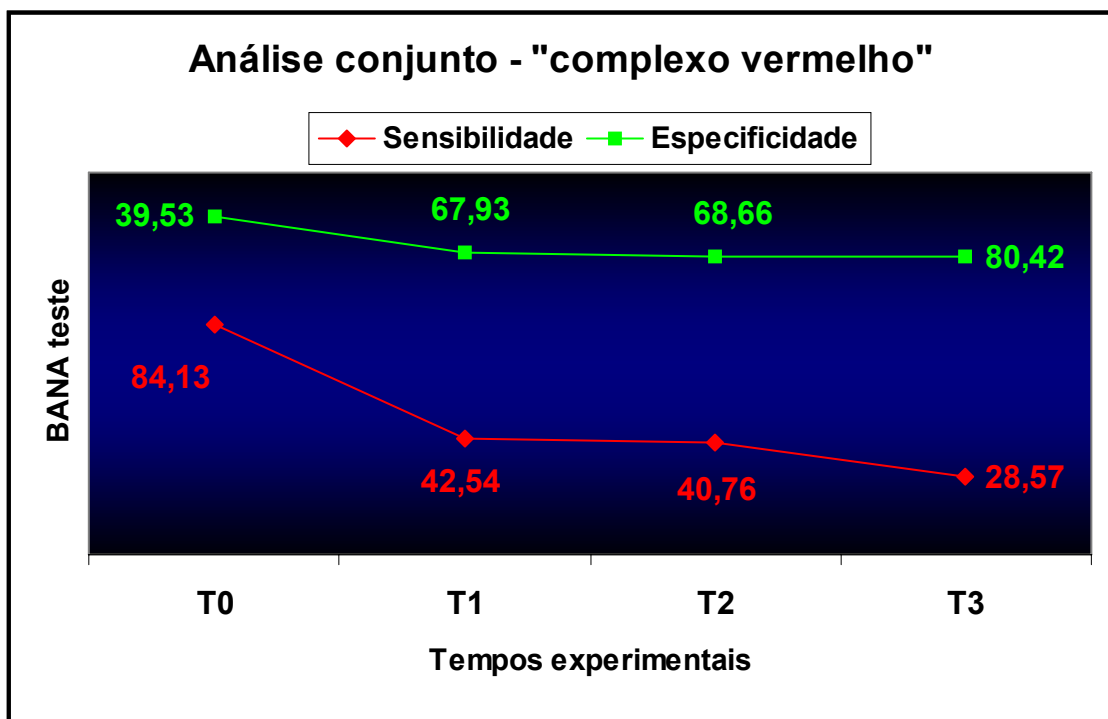


Figura 10: Valores de sensibilidade e especificidade, para a detecção do “complexo vermelho”, pelo teste BANA, nos 4 tempos experimentais, utilizando-se o *Checkerboard DNA – DNA hybridization* como técnica padrão.

## 5. DISCUSSÃO

Métodos como o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e o N-Benzoil-DL-Arginina-2-Naftilamida (BANA) têm a capacidade de revelar direta ou indiretamente, a presença de bactérias, envolvidas na etiologia da doença periodontal. O teste BANA pode ser utilizado como indicador de doença periodontal (Grisi *et al.*, 2001), já que algumas bactérias periodontopatogênicas, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e/ou *T. denticola* têm a capacidade de produzir arginina hidrolase, uma enzima semelhante à tripsina, que age na destruição das moléculas de colágeno. Assim, na presença dessas bactérias e, após, incubação adequada, a hidrólise do substrato BANA gera, em poucos minutos, uma reação colorimétrica de fácil visualização (Tanner *et al.*, 1998; Feitosa *et al.*, 1993; Loesche *et al.*, 1990). Por sua vez, o *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, desenvolvido por Socransky *et al.* (1994), possibilita a análise de 28 amostras de biofilme, pesquisando simultaneamente uma grande variedade de espécies bacterianas. A hibridização das amostras do biofilme com sondas de DNA genômico, marcadas com digoxigenina, permite a detecção de múltiplas reações em uma única membrana, com economia de tempo e identificação de espécies de difícil cultivo em laboratório.

O *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, como descrito anteriormente, tem sido aplicado em vários estudos clínicos com diferentes propósitos (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000c; Feres *et al.*, 2001; Colombo *et al.* 2002; Mager *et al.*, 2003; Socransky *et al.*, 2004; Haffajee *et al.*, 2005). O seu limite de detecção, provavelmente, atribui a esta técnica molecular uma associação estreita com sinais clínicos de doença, em especial, quando se considera a pesquisa do “complexo vermelho” (Haffajee *et al.*, 1997). Por isso, esta técnica pode ser utilizada para verificar os padrões microbiológicos resultantes da terapia periodontal (Haffajee *et al.*, 2005).

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi comparar duas técnicas microbiológicas, com características bem distintas, a fim de tentar validar os resultados do teste BANA, adotando-se como padrão o *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, que, por sua vez, possibilita a identificação isolada das espécies que compõem o “complexo vermelho”. Além disso, tentar elucidar o exato comportamento microbiológico que acarreta ausência, ou presença em níveis variados de atividade enzimática.

A associação entre o teste BANA com indicadores clínicos de doença periodontal parece estar bem estabelecida (Loesche *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1993; Bretz *et al.*, 1993; Pomes *et al.*, 2000; Grisi *et al.*, 2001). Embora exiba relação com bolsas periodontais profundas (Takaishi *et al.*, 2003; Yucekali-Tuncer *et al.*, 2003), sangramento gengival (Schmidt *et al.*, 1988; Greenstein, 1984) e sangramento à sondagem (Greenstein, 1984; Armitage 1996), é difícil indicar o teste BANA como substituto de parâmetros clínicos, podendo este teste, oferecer informações complementares dentro da caracterização periodontal.

Poucos autores, como Amalfitano *et al.* (1993) relataram, que, embora o resultado positivo do teste BANA possa refletir a colonização bacteriana, raramente, apresenta associação com evidência clínica de doença periodontal. Como a maior parte dos autores (Bretz *et al.*, 1993; Loesche *et al.*, 1990; Hemmings *et al.*, 1997), Figueiredo *et al.* (2000) apontaram baixa especificidade do teste BANA em relação aos parâmetros clínicos, isto é, mesmo na presença de doença, o teste exibiu resultados negativos. Devido a este fato, sua utilização como indicador de doença pode originar resultados contraditórios, principalmente, na terapia de manutenção, onde as evidências clínicas tendem a ser mais discretas. Hemmings *et al.* (1997), Loesche *et al.* (1990) e Watson *et al.* (1991) já haviam relatado, que, mesmo em casos de doença periodontal, pode haver uma eventual resposta negativa, a qual decorre da ausência de bactérias em número suficiente para gerar marcação no cartão.

Devido à relação definida com parâmetros clínicos periodontais, para o presente estudo foram selecionados apenas indivíduos previamente, diagnosticados como portadores de periodontite crônica moderada (Armitage, 2002). Para obtenção do diagnóstico periodontal foi necessário o exame completo de toda a cavidade bucal, avaliando-se 6 sítios/dente. Os valores médios de PS e NCI foram compatíveis com a gravidade da doença, isto é, periodontite moderada; enquanto as frequências elevadas de SS, IG e IPV foram compatíveis com o tipo de patologia periodontal, isto é, periodontite crônica (Armitage, 2002). A inclusão de indivíduos com doença periodontal bem caracterizada, teve por objetivo, aumentar a tendência de ocorrência de reações BANA positivas e, por conseqüência, estabelecer, de forma mais precisa, o comportamento das três espécies bacterianas associado à positividade ou negatividade da reação BANA.

No presente estudo, no exame inicial (T0) a frequência de reações BANA positivas foi 94,33%, considerando-se ambos os perfis de atividade enzimática, moderado e acentuado. Vergani *et al.* (2004) avaliaram diferentes modalidades terapêuticas, utilizando como parâmetro microbiológico o teste BANA. Os resultados positivos iniciais do referido teste variaram entre 68,2% a 90,3%. No período de 90 dias de observação, após o término da terapia periodontal o número de reações BANA positivas apresentou marcada redução variando de 0,0 a 9,1%. Adicionalmente, no presente estudo 60 dias após a terapia de raspagem e alisamento radicular (T3) o número de reações BANA positivas passou para 155 (47,16%), também, considerando os escores 1 e 2.

Embora haja um número elevado de estudos, que compararam os resultados do Teste BANA com parâmetros clínicos, a comparação entre o teste BANA com outras técnicas microbiológicas é bastante escassa.

Em relação às proporções observadas, nos 4 tempos experimentais, para os diferentes escores, os padrões encontrados foram similares para as duas técnicas microbiológicas. Exceto pelos resultados observados aos 45 dias (T2) onde houve uma tendência de alteração dos escores de 2 para 0 no teste BANA. Em termos gerais, inicialmente (T0), foram observadas atividade enzimática acentuada e presença bacteriana em proporções elevadas para os 2 testes (Figuras 8 e 9). No teste BANA, a reversão do quadro alcançada em T1 não foi mantida em T2, onde se observou níveis estatisticamente maiores de escore 2. Os resultados do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* também mostraram um ligeiro aumento do escore 2 no tempo T2. Este fato pode sugerir uma recolonização bacteriana (determinada pelo *Checkerboard DNA – DNA hybridization*) e atividade metabólica do biofilme mais acentuada (determina pelo teste BANA) neste tempo. Mas, é interessante salientar, que aos 60 dias (T3) os escores 0 de ambas as técnicas voltaram a predominar, por isso essas alterações foram apenas transitórias. De acordo com Petersilka (2002), devido à seqüência de colonização bacteriana, que ocorre após o debridamento mecânico, patógenos periodontais como *T. denticola* e *P. gingivalis* podem se manter em proporções reduzidas por inúmeros meses. E, segundo Ramberg *et al.* (2003) procedimentos mecânicos de higiene bucal, instituída pelos participantes e pelos profissionais, estabelecem níveis de biofilme dental próximos a zero. Estes autores, em quatro dias de observação, praticamente, não detectaram espécies do “complexo vermelho”, empregando-se *Checkerboard*

*DNA – DNA hybridization*. Querido *et al.* (2004), em indivíduos com periodontite crônica, observaram 33,4% dos sítios periodontais positivos para *P. gingivalis* e 26,0% para *T. forsythensis*, 30 dias após o término da terapia periodontal mecânica. Beikler *et al.* (2004), utilizando a técnica de PCR, avaliaram inicialmente, em 6 semanas, 3 e 6 meses as alterações microbiológicas associadas à terapia periodontal mecânica. Ao longo do período experimental *P. gingivalis* exibiu redução transitória e *T. forsythensis* aumento transitório, enquanto *T. denticola* manteve-se praticamente inalterado, na área subgengival. Adicionalmente, Quirynen *et al.* (2005) concluíram que, mesmo o ambiente supragengival sendo a única fonte de colonização microbiana, uma complexa microbiota subgengival pode estar reestabelecida em 1 semana.

Por esta análise preliminar, o teste BANA pareceu acompanhar os dados do *Checkerboard DNA – DNA hybridization*, apresentando apenas oscilações compatíveis com as variações microbiológicas. Mas, a análise isolada das três espécies bacterianas, bem como a análise do próprio “complexo vermelho”, parece não confirmar esta suposta concordância de resultados.

No Teste BANA, a presença de  $10^4$  células de *T. denticola*, *P. gingivalis* e/ou *T. forsythensis* tende a resultar em atividade enzimática suficiente para gerar uma coloração azul no cartão após 15 minutos de incubação a 55°C. Porém, por resultar da ação da enzima arginina hidrolase, a reação BANA positiva independe da ocorrência subgengival de apenas uma ou mais espécies bacterianas. Nos resultados aqui obtidos, no exame inicial (T0), a ausência de atividade enzimática não foi acompanhada de ausência bacteriana. Pelo contrário, o escore 0 do BANA teve como valores mais freqüentemente associados (Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) os escores 2 do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, para as 3 bactérias (Quadro 4).

Adicionalmente, não está claro na literatura se *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* contribuem, de modo mais, ou menos significativo, para a positividade da reação BANA. Entretanto, sabe-se que há variação na expressão gênica, relacionada à produção enzimática dentro de cada espécie bacteriana e, que esta variação apresenta relação com a virulência bacteriana (Lamont & Jenkinson, 2000; Fenno *et al.*, 2001; Sela 2001; Ally *et al.*, 2003; Lee & Fenno, 2004). Diferentes genótipos de *P. gingivalis*, além de influenciar a atividade proteolítica, parecem, também, influenciar a coexistência com outras espécies bacterianas incluindo *T. forsythensis* (Miura *et al.*, 2005). Além disso, a análise de seqüências ribossômicas

tem encontrado novas espécies bacterianas possivelmente associadas à periodontite crônica (Kumar *et al.*, 2003), cujo perfil enzimático ainda não foi determinado. No presente estudo em T1, o escore 0 de *T. denticola* foi o resultado de maior frequência associado ao escore 0 do teste BANA (Quadro 5). Ao passo que nos demais tempos experimentais, o escore 0 do BANA foi acompanhado por presença bacteriana em proporções elevadas, (*Checkerboard DNA – DNA hybridization* - escore 2), especialmente, de *P. gingivalis* e *T. forsythensis*. Smith *et al.* (1995) não encontraram correlação entre níveis subgingivais elevados de *P. gingivalis* e atividade enzimática (teste BANA). Os Quadros 6 e 7 mostram, respectivamente, que tanto em T2 como em T3 para o escore 1 do BANA contribuíram igualmente os escores 2 do *Checkerboard DNA – DNA hybridization* para *P. gingivalis* e *T. forsythensis*. Frequências mais elevadas de escore 2 (*Checkerboard DNA – DNA hybridization*), para *P. gingivalis* e *T. forsythensis*, também foram observadas, quando da ocorrência de atividade enzimática acentuada (BANA escore 2) em todos os tempos experimentais. Como escores 2 para *P. gingivalis* e *T. forsythensis* foram encontradas em associação com escores 0 e 2 do BANA, sugere-se uma maior investigação do perfil enzimático de *T. denticola*. Este fato pode ganhar relevância ao lembrarmos que Haffajee *et al.*, (2004) ao compararem a composição do biofilme subgingival de 300 indivíduos de 4 países encontraram *T. denticola* como a espécie mais prevalente no Brasil comparativamente ao Chile, Suécia e Estados Unidos da América.

A maior parte dos estudos na literatura parece comparar o teste BANA com a reação ELISA. Utilizando esta técnica como padrão, o teste BANA parece ter sensibilidade adequada e especificidade reduzida (Bretz *et al.* 1993). Contudo, no estudo de Watson *et al.* (1991) o teste BANA originou resultados diferentes, apresentando especificidade de 92% e sensibilidade de apenas 25% em relação ao teste ELISA, no exame inicial. Já Wilson *et al.* (1993) demonstraram forte correlação entre teste BANA e a reação ELISA em amostras subgingivais de indivíduos com periodontite, o que não ocorreu nas amostras coletadas de indivíduos periodontalmente saudáveis.

No presente estudo, no exame inicial a sensibilidade do teste BANA foi alta, variando de 94,61% a 95,24% para as 3 bactérias. Nos demais exames, não foi satisfatória, permanecendo sempre abaixo do limite de aceitação de 80%. Já os

valores de especificidade se mostraram abaixo dos limites aceitáveis, em todos os tempos experimentais (Quadros 8 - 11).

Para as 3 espécies bacterianas, isoladamente, no estudo de Wetzel *et al.* (1991) o teste BANA exibiu sensibilidade adequada apenas no grupo pré-tratamento periodontal. Por outro lado, no estudo de Watson *et al.* (1991), a reação BANA foi negativa quando *T. denticola* e/ou *P. gingivalis* não foram detectados pelos reagentes imunológicos. Contudo, neste mesmo estudo, quando a reação ELISA detectou *T. denticola* e/ou *P. gingivalis*, a reação BANA foi freqüentemente negativa. Em 2003, Takaishi *et al.*, comparam o Teste BANA com a técnica PCR e, a despeito de resultados superiores da última, concluíram que ambos os métodos podem ser úteis para detectar patógenos associados com a destruição tecidual.

Os resultados do teste BANA demonstraram associação (Qui-quadrado,  $p < 0,05$ ) com a identificação do “complexo vermelho”, apenas no exame inicial (Quadro 12). Em T0, esta associação também foi observada para as 3 espécies bacterianas isoladamente. Porém, nos demais tempos experimentais os resultados foram discrepantes (Quadros 13 - 15). Assim, se a atividade enzimática difere da identificação isolada das bactérias, os resultados do teste BANA parecem atuar melhor como preditores da destruição tecidual (Luterbacher *et al.* 2000), pelo potencial lítico da enzima arginina hidrolase, do que propriamente como indicadores microbiológicos.

Para o “complexo vermelho”, houve uma tendência de declínio dos valores de sensibilidade, ao longo do período experimental, estando estes, dentro dos limites aceitáveis apenas no exame inicial. Já, os valores de especificidade não foram tão baixos como os observados para as bactérias isoladas, mas, mesmo assim, permaneceram abaixo dos limites aceitáveis. No estudo de Bretz *et al.*, (1993), a sensibilidade do Teste BANA em relação ao teste ELISA foi adequada, considerando-se a presença conjunta das três espécies bacterianas, porém a especificidade foi adequada apenas quando da análise isolada das bactérias.

A maior variabilidade dos resultados do teste BANA em relação ao *Checkerboard DNA – DNA hybridization* pareceu ocorrer para resultados negativos. Ou seja, nem sempre a ausência de atividade enzimática pode ser acompanhada de ausência das bactérias, que produzem arginina hidrolase. Este fato pode explicar sua baixa especificidade, isto é, reação BANA negativa na presença das bactérias.

Os resultados aqui observados sugerem que *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* apresentam diferentes contribuições para o resultado da reação BANA. Portanto, estudos futuros deverão ser conduzidos a fim de verificar se os resultados obtidos em 60 dias de observação, mantêm-se por períodos mais longos. E, se em outros períodos experimentais pode haver maior concordância de resultados entre estas duas técnicas microbiológicas.



## 6. CONCLUSÕES

O teste BANA mostrou ser uma técnica sensível para a detecção do “complexo vermelho”, no diagnóstico inicial. Todavia, a presença e os níveis subgingivais de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* não mostraram uma relação direta com os níveis de atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali RW, Johannessen AC, Dahlén G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. *J. Clin Periodontol.* 1997; 24(1): 830-835.

Ally N, Whisstock JC, Sieprawska-Lupa M, Potempa J, Le Bonniec BF, Travis J, Pike RN. Characterization of the specificity of arginina-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* reveals active site differences between different forms of the enzymes. *Biochemistry.* 2003; 42(40): 11693-11700.

Amalfitano J, De Filippo AB, Bretz WA, Loesche WJ. The effects of incubation length and temperature on the specificity and sensitivity of the BANA (N – Benzoyl – DL – Arginine – Naphthylamide) test. *J Periodontol.* 1993; 64: 848 – 852.

Armitage G C. Manual periodontal probing in supportive periodontal treatment. *Periodontol 2000.* 1996; 12: 33-39.

Armitage GC. Classifying periodontal diseases – a long-standing dilemma. *Periodontol 2000.* 2002; 30: 9-23.

Barbosa e Silva E, Salvador SL, Fogo JC, Marcantonio RA. Use of aspartate aminotransferase in diagnosing periodontal disease: a comparative study of clinical and microbiological parameters. *J. Oral Sci.* 2003; 45(1): 33-38.

Beikler T, Abdeen G, Schntzer S, Sälzer S, Ehmke B, Heinecke A, Flemming TF. Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. **J. Clin Periodontol.** 2004; 31: 777-783.

Bretz WA and Loesche WJ. Characteristic of Trypsin-like Activity in Subgingival Plaque Samples. **J. Dent Res.** 1987; 66(11): 1668-1672.

Bretz WA, Eklund SA, Radicchi R, Schork MA, Schork N, Schottenfeld D, Lopatin DE, Loesche WJ. The use of a rapid enzymatic assay in the field for the detection of infections associated with adult periodontitis. **J. Public Health Dent.** 1993; 53(4): 235-240.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalem WJ, Mendes MC, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.** 2002; 73(4): 360-369.

Cortelli SC, Cortelli JR, Auad RM, Jorge AOC. Métodos para detecção de patógenos periodontais. **Pós-Graduação Rev. Fac. Odontol São José dos Campos.** 2000; 3(1): 97-104.

Feinberg AP, Volgstein B. A technique for radiolabeling and side effects of 0.1% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. **Analytical Biochemistry.** 1983; 132: 6 – 13.

Feitosa ACR, Amalfitano J, Loesche WJ. The effects of incubation temperature on the specificity of the BANA (N-benzoyl-DL-arginine-naphthylamide) test. **Oral Microbiol Immunol.** 1993; 8: 57- 61.

Fenno JC, Lee SY, Bayer CH, Ning Y. The *opdB* Locus Encodes the Trypsin-Like Peptidase activity of denticola. **Infect Immun.** 2001; 69(10): 6193-6200.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. **J Clin Periodontol.** 2001; 28: 597 – 609.

Figueiredo LC, Toledo BEC, Salvador SL. The relationship between plaque BANA reactivity and clinical parameters in subjects with mental disabilities. **Special Care in Dentistry.** 2000; 20(5); 195-198.

Figueiredo LC, Rosetti EP, Marcantonio E Jr, Marcantonio RA, Salvador SL. The relationship of oral malodor in patients with or without periodontal disease. **J. Periodontol.** 2002; 73(11): 1338-1342.

Figueiredo LC, Feres M, Salvador SL. Halitosis and periodontal disease in subjects with mental disabilities. **Oral Diseases.** 2005; II (suppl. I): 83 – 85.

Greenstein G. The role of bleeding upon probing in the diagnosis of periodontal disease. **J. Periodontol.** 1984; 55(12): 684-88.

Grisi MFM, Filho TAC, Fanganiello CLS, Martins Jr, W, Silva Neto, CR, Salvador DS .  
Relacionamento entre a presença ou a ausência do sangramento gengival e do teste enzimático BANA. **Braz Dent J.** 2001; 12(1): 23-26.

Jeffcoat M K, Wang I C, Reddy M S. Radiographic diagnosis in periodontics.  
**Periodontol 2000.** 1995; 7: 54-68.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML. New bacterial species associated with chronic periodontitis. **J Dent Res.** 2003; 82: 338 – 344.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr. RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal disease. **J. Clin Periodontol.** 1997; 24: 324-334. (a)

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. **J Clin Periodontol.** 1997; 24: 767-76. (b)

Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. **J. Clin Periodontol.** 1998; 25: 346-353.

Haffajee AD, Smith C, Torresyap G, Thompson M, Guerrero D, Socransky SS. Efficacy of manual and powered toothbrushes (II). Effect on microbiological parameters. **J. Clin Periodontol.** 2001; 28: 947-954.

Haffajee AD, Borgren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J. Clin Periodontol.** 2004; 31(11): 996-1002.

Haffajee AD, Japlit M, Borgren A, Kent RL Jr, Goodson JM, Socransky SS. Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. **J. Clin Periodontol.** 2005; 32(1): 33-39.

Hemmings KW, Griffiths GS, Bulman JS. Detection of neural protease (Periocheck) and BANA hydrolase (Perioscan) compared with traditional clinical methods of diagnosis and monitoring of chronic inflammatory periodontal disease. **J. Clin Periodontol.** 1997; 24: 110-114.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15: 341-349.

Lee SY, Fenno JC. Expression of *Treponema denticola* oligopeptidase B in *Escherichia coli*. **Curr Microbiol.** 2004; 48(5): 379-382.

Löe H, *et al.* Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.** 1965; 36: 177-187.

Loesche W. Chemotherapy of dental plaque infections. **Oral Sci Rev.** 1976; 9: 65 – 107.

Loesche WJ, Syed SA, Stoll J. Trypsin-like activity in subgingival plaque. **J. Periodontol.** 1987; 28(4): 266-273.

Loesche WA, Bretz WA, Kerschensteiner D, Stoll J, Socransky SS, Hujoel P, Lopatin DE. Development of a Diagnostic test for anaerobic periodontal infection based on plaque hydrolysis of Benzoyl-DL-Arginine-Naphthlamide. **J. Clin Microbiol.** 1990; 28(7): 1551-1559.

Luterbacher S, Mayfield L, Brägger U, Lang NP. Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosal tissue conditions during supportive periodontal therapy (SPT). **Clin Oral Impl Res.** 2000; 11: 521-529.

Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **J. Clin Periodontol.** 2003; 30: 644-654.

Miura M, Hamachi T, Fujise O, Maeda K. The prevalence and pathogenic differences of Porphyromonas gingivalis filmA genotypes in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontal Res.** 2005; 40(2): 147-152.

Morita M, Wang HL. Relationship of sulcular sulfide level to severity of periodontal disease and BANA test. **J. Periodontol.** 2001; 72: 74-78.

Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. **Periodontol 2000.** 2002; 28: 56-71.

Pomes CE, Bretz WA, de Leon A, Aguirre R, Milian E, Chaves ES. Risk indicators for periodontal diseases in Guatemalan adolescents. *Braz Dent J*. 2000; 11(1): 49-57.

Querido SMR, Cortelli SC, Araujo MWB, Cortelli JR. Clinical and microbial evaluation of dental scaling associated with subgingival minocycline in chronic periodontitis subjects. *Braz Oral Res*. 2004; 18(2): 110-115.

Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, van Ateenberghe D. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J. Dent Res*. 2005; 84(4): 340-344.

Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. *J. Clin Periodontol*. 2003; 30: 990-995.

Schmidt EF, Bretz WA, Hutchinson Loesche. Correlation of the hydrolysis of benzoyl-arginine naphthylamide (BANA) by plaque with clinical parameters and subgingival levels of spirochetes in periodontal patients. *J. Dent Res*. 1988; 67(12): 1505-1509.

Sela MN. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12(5): 399-413.

Smith AJ, Wade WG, Greenman J, Addy M. Analysis of cultivable *Porphyromonas gingivalis* with trypsin-like protease enzyme activity and serum antibodies in chronic adult periodontitis. *Oral Dis*. 1995; 1(2): 70-76.



Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster B J, Dewhirst F E, Levin A E. "Checkerboard" DNA-DNA Hybridization. *BioTechniques*. 1994; 17(4): 788-792.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin Periodontol*. 1998; 25: 134-144.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002; 28: 12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19(6): 352-362.

Tanner A, Maiden MFJ, Macuch PJ, Murray LL, Kent Jr RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J. Clin Periodontol*. 1998; 25: 85-98.

Takaishi Y, Morri H, Miki T. The benzoyl-DL arginina-naphthylamide (BANA) test and polymerase chain reaction measurement of pathogenic bacteria can assess the severity of periodontal disease. *Int J Tissue React*. 2003; 25(1): 19-24.

Vergani SA, Barbosa e Silva E, Vinholis AH, Marcantonio RAC. Systemic use of metronidazole in the treatment of chronic periodontitis: A pilot study using clinical, microbiological, and enzymatic evaluation. *Braz Oral Res*. 2004; 18(2): 121-127.

Watson MR, Lopatin DE, BretzWA, Ertel IJ, Loesche WJ. Detection of two anaerobic periodontopathogens in children by means of the BANA and Elisa assays. **J. Dent Res.** 1991; 70(7): 1052-1056.

Wetzel AC, Schupbach AN, Lopatin DE, Lang NP. Use of BANA hydrolysis as a diagnostic test for identifying periodontopathic environments. **Schweiz Monatsschr Zahnmed** .1991; 101(1): 1127-1132.

Wilson M, Lopatin D, Osborne G, Kieser JB. Prevalence of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in plaque from periodontally-healthy and periodontally-diseased sites. **J. Med Microbiol.** 1993; 38(6): 406-410.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. **J. Clin Periodontol.** 2000(a); 27: 637-647.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis. **J. Clin Periodontol.** 2000(b); 27: 648-657.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. **J. Clin Periodontol.** 2000(c); 27: 722-732.

Yucekal-Tuncer B, Uygur C, Firatli E. Gingival crevicular fluid levels of aspartate amino transferase, sulfide ions and N-benzoil-DL-arginine-2-naphthylamide in diabetic patients with chronic periodontitis. ***J. Clin Periodontol.*** 2003; 30(12): 1053-1060.

Zambon JJ & Haraszthy. The laboratory diagnosis of periodontal infections. ***Periodontol 2000.*** 1995; 7: 69-82.

**ANEXO 1 – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UnG**

## **ANEXO 2 - Protocolo dos Reagentes usados no *Checkerboard DNA – DNA hybridization***

### **NaOH: 0,5M**

Preparo: 1gr de NaOH em 50ml de água destilada

### **Acetato de amônio: 5M:**

Preparo: 38,5gr em 100ml de água destilada

### **Solução de 2XSSC:**

Preparo:

50ml da Solução 2XSSC diluir em 450ml de água destilada

OBS: Solução preparada a partir da **solução de 20XSSC**

### **Solução de 20XSSC:**

87,67gr de NaCL

44,12gr de Citrato de Sódio

Diluir em 500ml de água destilada: pH 7,5

Autoclavar

### **Solução de Pré-Hibridização (Estoque)**

88gr de NaCL

44gr de Citrato de sódio

6,9gr de Fosfato de sódio monobásico

Diluir em 500ml de água destilada: pH 6,5

Autoclavar

### **Solução de Hibridização (Estoque)**

30,7gr de NaCL

16,1gr de Citrato de sódio

2,01gr de Fosfato de sódio monobásico

Diluir em 300ml de água destilada: pH 6,5

Autoclavar

### **Solução de Pré-Hibridização (Uso)**

50ml de Formamida (Usar do estoque)

6ml de Rna de levedura (Usar do estoque)

35ml de Sol. De Pré-Hibridização

10ml de Caseína (Usar do estoque)

### **Solução de Hibridização (Uso) - Diluir as sondas**

20ml de Formamida (Usar do estoque)

800ul de Rna de levedura (Usar do estoque)

Dissolver 4gr de Sulfato de Dextran em 17,2ml de Solução de Hibridização (Usar do estoque)

4ml de caseína (Usar do estoque)

**Formamida (Estoque)**

500ml de Formamida  
25gr de resina de deionização  
Deixar meia hora homegeinizando  
Filtrar com papel de filtro  
Estocar no Freezer

**Rna de Levedura (Estoque)**

1gr de Rna de Levedura em 100ml de água destilada  
Ferver para dissolver bem  
Estocar no Freezer

**Solução de TE**

0,785gr de TrisHCL  
0,186gr de EDTA  
pH 7,6  
Filtrar  
Autoclavar

**Tampões de Lavagem****Buffer de Fosfato (Primeira lavagem no Banho-maria com circulação 65°C)**

30gr de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)  
1,1gr de EDTA  
8,4gr de Fosfato de sódio dibásico  
Diluir em 3litros de água destilada  
Autoclavar

**Blocking Buffer (Segunda lavagem)**

450ml de Maleic Buffer  
50ml de caseína  
OBS: Deste total 50ml para diluição do anticorpo

**Anticorpo (Anti Digoxigenina)**

5ul de anticorpo  
50ml de Blocking Buffer

**Maleic Buffer (Terceira lavagem) – Lavagem para retirar o excesso de anticorpo**

34,8gr de ácido maleico  
26,3gr de NaCl  
22gr de NaOH  
Diluir em 3litros de água destilada: pH 7,5  
Adicionar 9ml de Tween 20  
Autoclavar

**Buffer 3**

7,85gr de TrisHCL

8,75gr de NaCl

Diluir em 500ml de água destilada: pH 9,5

Autoclavar

**Buffer 1 (Usado para preparar a Caseína)**

29gr de ácido maleico

21,75gr de NaCl

18,75 de NaOH

Diluir em 2,5litros de água destilada: pH 7,5

Autoclavar

**Caseína**

80gr de caseína em 800ml de água destilada

Homenizar

Autoclavar