

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Curso de Graduação em Odontologia

LUCAS PEREIRA BORGES

**ADERÊNCIA *IN VITRO* DE BACTÉRIAS BUCAIS A DIFERENTES
TIPOS DE *PIERCINGS* LINGUAIS**

João Pessoa

2015

LUCAS PEREIRA BORGES

**ADERÊNCIA *IN VITRO* DE BACTÉRIAS BUCAIS A DIFERENTES
TIPOS DE *PIERCINGS* LINGUAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para conclusão.

Orientadora: Ana Maria Gondim Valença, Doutora em Odontologia Social.

Co-orientadora: Bianca Marques Santiago, Doutora em Ciências (Saúde Pública).

João Pessoa
2015

B732a Borges, Lucas Pereira.

Aderência in vitro de bactérias bucais a diferentes tipos de piercings linguais /
Lucas Pereira Borges. - - João Pessoa, 2016.

56f.: il. -

Orientadora: Ana Maria Gondim Valença.

Coorientadora: Bianca Marques Santiago.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS, 2017.

1. Piercing Corporal. 2. Aderência Bacteriana. 3. Microbiologia.

BS/CCS/UFPB

CDU: 7.038.531(043.2)


LUCAS PEREIRA BORGES


**ADERÊNCIA IN VITRO DE BACTÉRIAS BUCAIS A DIFERENTES TIPOS DE
PIERCINGS LINGUAIS**


Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Curso
de Graduação em Odontologia,
da Universidade Federal da
Paraíba em cumprimento às
exigências para conclusão.

Monografia aprovada em 23 / 02 / 15


Prof^a. Ana Maria Gondim Valença
Orientadora – UFPB


Prof. Ricardo Dias de Castro
Examinador – UFPB


Prof^a. Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo
Examinador – UFPB


Prof^a. Simone Alves de Sousa
Examinador – UFPB

Dedico este trabalho a minha querida mãe, Aíla, que infelizmente não se encontra mais conosco. Dedico também a meu pai, Domingos e a minha tia Aurileide, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Sem eles, eu não teria chegado aqui. A vocês meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À **Profª Drª Ana Maria Gondim Valença** por ter me iniciado no mundo da pesquisa e por ter me dado a oportunidade de trabalharmos juntos. Obrigado por me fazer uma pessoa melhor tanto na vida acadêmica, como na vida pessoal. Saiba que é um exemplo de dedicação e competência para mim e que sou muito grato por todos os ensinamentos que recebi como seu orientando.

À **Profª Drª Bianca Marques Santiago** por seus ensinamentos, paciência e confiança depositada em mim. Por estar sempre disposta a me ajudar e orientar, principalmente nesse trabalho. Obrigado pelo apoio e por ser um exemplo de orientadora para mim.

À **Caroline Vieira, Júlia Martins e Julio Cesar** por terem me ajudado bastante durante as etapas laboratoriais da pesquisa e também pelo companheirismo e amizade compartilhadas durante esses anos de graduação.

Aos amigos do **NEO** (Núcleo de Estudos em Odontopediatria) por terem me mostrado a importância do trabalho em grupo. O aprendizado que obtive com vocês durante esses anos de convivência é imensurável.

Aos meus pais, irmã, madrastra, meus tios e tias e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus colegas da graduação, **Aimée Cabral, Ana Dal Piva, Iasmin Pequeno, Julio Cesar, Rafael Nogueira, Suzana Alexandre** e demais colegas com quem compartilhei momentos inesquecíveis durante a graduação.

Ao **Prof. Severino Jackson** e à **Meyson Cassio** do Laboratório de Solidificação Rápida (CT – UFPB) pela colaboração nas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

“A grandeza vem não quando as coisas sempre vão bem para você, mas a grandeza vem quando você é realmente testado, quando você sofre alguns golpes, algumas decepções, quando a tristeza chega. Porque apenas se você esteve nos mais profundos vales você poderá um dia saber o quão magnífico é se estar no topo da mais alta montanha.”

Richard Milhous Nixon

RESUMO

A utilização de *piercings* linguais vem se tornando bastante frequente, principalmente entre os jovens. *Eikenella corrodens* e *Streptococcus oralis* figuram-se entre as bactérias que estão mais presentes na superfície dos *piercings*. Diferentes materiais podem interferir na colonização microbiana de superfícies sólidas. Objetivou-se verificar a aderência *in vitro* de *E. corrodens* (ATCC 23834) e *S. oralis* (ATCC 10557) à superfície de *piercings* linguais de aço cirúrgico, titânio, bioplast e teflon. Utilizou-se 160 *piercings* para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e 32 *piercings* para a análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Destes, 96 (24 de cada tipo) foram incubados individualmente em 5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e 50 μ L do inóculo, a 37°C/24h. Os outros 96 *piercings* compuseram o grupo controle e foram incubados individualmente em 5 mL de caldo BHI, a 37°C/24h. Após esse período, transferiu-se cada *piercing* para 5 mL de solução salina estéril, agitou-se por 2 minutos e realizou-se diluições seriadas, que foram plaqueadas pela Técnica da Gota em ágar BHI. Incubou-se as placas a 37°C/48h para contagem das UFC/mL, sendo estes dados submetidos aos testes Kolmogorov-Smirnov, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e t de Student, considerando o nível de significância de 5%, ou seja, p-valor < 0,05. Para a análise em MEV, foram descritas as características da superfície dos *piercings*. Verificaram-se médias de aderência de *E. corrodens* para aço cirúrgico ($11,95 \pm 7,49 \times 10^5$ UFC/mL), titânio ($6,40 \pm 2,55 \times 10^5$ UFC/mL), bioplast ($67,36 \pm 44,99 \times 10^5$ UFC/mL) e teflon ($36,72 \pm 21,01 \times 10^5$ UFC/mL), havendo diferença entre os tipos de material ($p \leq 0,001$) e de *S. oralis* para aço cirúrgico ($29,68 \pm 31,04 \times 10^5$ UFC/mL), titânio ($24,21 \pm 17,26 \times 10^5$ UFC/mL), bioplast ($77,38 \pm 56,53 \times 10^5$ UFC/mL) e teflon ($68,34 \pm 39,48 \times 10^5$ UFC/mL), apresentando diferença entre os tipos de material ($p \leq 0,007$). Os quatro tipos de *piercings* apresentaram-se susceptíveis a colonização por *E. corrodens* e *S. oralis*, sendo a aderência bacteriana mais expressiva naqueles confeccionados em bioplast e teflon. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, evidenciou-se que os quatro tipos de *piercings* apresentaram colônias bacterianas em sua superfície, sendo constatada maior quantidade delas nos *piercings* plásticos provavelmente devido a sua superfície irregular e rugosa.

PALAVRAS-CHAVE: Piercing Corporal; Aderência Bacteriana; Microbiologia

ABSTRACT

The use of oral piercings is spreading among young people, especially the tongue piercing. *Streptococcus oralis* figures as one of the bacteria which adhere the most on the surface of tongue piercings, presenting differences in the bacterial colonization pattern on distinct materials of tongue piercings. The aim was to assess the *in vitro* adherence of *E. corrodens* (ATCC 23834) and *S. oralis* (ATCC 10557) to the surface of tongue piercings made of surgical steel, titanium, bioplast and teflon. It used 160 piercings to count the Colony Forming Units (CFU) and 32 piercings for analysis in Scanning Electron Microscope (SEM). Of these, 96 (24 of each type) were individually incubated in 5 mL BHI (Brain Heart Infusion) broth and 50 μ L of inoculum, at 37°C/24h. The others 96 piercings formed the control group and were incubated individually in 5 mL of BHI broth, at 37°C/24h. After this period, each piercing was transferred to 5 mL of saline solution, stirred during 2 min and realized seriated dilutions, that were inoculated by the Drop Technique in BHI agar. The dishes were incubated at 37°C/48h for CFU/mL counting, being these data submitted to Kolmogorov-Smirnov, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and t de Student tests, considering the level of significance of 5%, ie, p-value <0.05. For SEM analysis, the characteristics of the surface of the piercings were described. It was verified means of adherence of *E. corrodens* for surgical steel ($11,95 \pm 7,49 \times 10^5$ CFU/mL), titanium ($6,40 \pm 2,55 \times 10^5$ CFU/mL), bioplast ($67,36 \pm 44,99 \times 10^5$ CFU/mL) e teflon ($36,72 \pm 21,01 \times 10^5$ CFU/mL), existing difference between material types ($p \leq 0,001$) and of *S. oralis* for surgical steel ($29,68 \pm 31,04 \times 10^5$ CFU/mL), titanium ($24,21 \pm 17,26 \times 10^5$ CFU/mL), bioplast ($77,38 \pm 56,53 \times 10^5$ CFU/mL) e teflon ($68,34 \pm 39,48 \times 10^5$ CFU/mL), presenting difference between material types ($p \leq 0,007$). The four types of piercings presented themselves susceptible to colonization by *E. corrodens* and *S. oralis*, being the most significant bacterial adherence in those made of bioplast and teflon. By scanning electron microscopy, it was shown that the four types of piercings had bacterial colonies on the surface, being found greater amount of them in plastic piercings probably due to its irregular and rough surface.

PALAVRAS-CHAVE: Body Piercing; Bacterial Adhesion; Microbiology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Piercings</i> utilizados: aço cirúrgico, titânio, teflon e bioplast.....	27
Figura 2 - <i>Piercings</i> de aço cirúrgico e titânio incubados (S1).....	28
Figura 3 - <i>Piercings</i> de bioplast e teflon incubados (S1).....	28
Figura 4 - <i>Piercings</i> de aço cirúrgico e titânio - Controle (S2).....	29
Figura 5 - <i>Piercings</i> de bioplast e teflon - Controle (S2).....	29
Figura 6 - Diluição seriada.....	30
Figura 7 - Plaqueamento pela Técnica da Gota.....	30
Figura 8 - Ilustração representativa da Técnica da Gota.....	31
Figura 9 - Aparelho metalizador Emitech K550X.....	32
Figura 10 - Porta-amostras sendo dispensados no interior do MEV.....	32
Figura 11 - Puro (0) e diluições -1 e -2 do aço cirúrgico frente a <i>E. corrodens</i>	36
Figura 12 - Diluições -3, -4 e -5 do aço cirúrgico frente a <i>E. corrodens</i>	36
Figura 13 - Puro (0) e diluições -1 e -2 do bioplast frente a <i>S. oralis</i>	36
Figura 14 - Diluições -3, -4 e -5 do bioplast frente a <i>S. oralis</i>	36
Figura 15 - Eletromicrografia da superfície de um <i>piercing</i> de aço cirúrgico incubado na solução contendo <i>S. oralis</i> (A - <i>Piercing</i> de aço cirúrgico em um aumento de 50x; B - Interface entre haste e esfera em um aumento de 100x; C - Aumento de 500x; D - Presença de colônias de <i>S. oralis</i> em aumento de 1000x).....	38
Figura 16 - Eletromicrografia da superfície de um <i>piercing</i> de teflon incubado na solução contendo <i>S. oralis</i> (A - <i>Piercing</i> de teflon em um aumento de 50x; B - Região da esfera em um aumento de 100x; C - Aumento de 500x; D - Presença de colônias de <i>S. oralis</i> em aumento de 1000x).....	39
Figura 17 - Eletromicrografia da superfície de um <i>piercing</i> de titânio incubado na solução contendo <i>E. corrodens</i> (A - <i>Piercing</i> de titânio em um aumento de 50x; B - Interface entre a esfera e a haste em um aumento de 100x; C - Aumento de 500x; D - Presença de colônias de <i>E. corrodens</i> em aumento de 1000x).....	40
Figura 18 - Eletromicrografia da superfície de um <i>piercing</i> de bioplast incubado	

na solução contendo *E. corrodens* (A - *Piercing* de bioplast em um aumento de 50x; B - Interface entre a esfera e a haste em um aumento de 100x; Aumento de 500x; D - Presença de colônias de *E. corrodens* em aumento de 1000x).....41

Figura 19 - Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de titânio incubado na solução contendo apenas BHI (A - *Piercing* de titânio em um aumento de 100x, apresentando superfície isenta de colonização; B - Superfície lisa e polida isenta de colonização, em um aumento de 500x).....42

Figura 20 - Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de teflon incubado na solução contendo apenas BHI (A - *Piercing* de teflon em um aumento de 100x, apresentando superfície isenta de colonização; B - Superfície rugosa e irregular isenta de colonização, em um aumento de 500x).....42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos preparados para incubação dos <i>piercings</i>	28
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias de aderência do <i>E. corrodens</i> e do <i>S. oralis</i> em UFC/mL para os quatro tipos de <i>piercings</i>	34
Tabela 2 - Médias de aderência do <i>E. corrodens</i> e do <i>S. oralis</i> em UFC/mL para comparação entre os materiais e as bactérias.....	34
Tabela 3 - P valor da comparação dos tipos de <i>piercing</i> dois a dois para o <i>E. corrodens</i>	35
Tabela 4 - P valor da comparação dos tipos de <i>piercing</i> dois a dois para o <i>S. oralis</i>	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 O surgimento do <i>piercing</i> e sua utilização atualmente.....	17
2.2 <i>Piercing</i> lingual e suas características.....	18
2.3 <i>Piercing</i> lingual e saúde bucal.....	19
2.4 <i>Eikenella corrodens</i> e <i>Streptococcus oralis</i>	22
2.5 Adesão bacteriana e o uso de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	22
3 OBJETIVOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Delineamento geral do estudo.....	26
4.2 Locais de realização da pesquisa.....	26
4.3 Microrganismos selecionados.....	26
4.4 Universo e amostra.....	27
4.5 Preparo do inóculo bacteriano.....	27
4.6 Montagem dos sistemas de aderência in vitro.....	28
4.7 Análise da aderência bacteriana.....	29
4.8 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura.....	31
4.9 Análise dos dados.....	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Em relação ao teste microbiológico de aderência de <i>E. corrodens</i> e <i>S. oralis</i>	34
5.2 Em relação à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
6. DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O termo *piercing* (do inglês, perfuração) é uma forma de arte corporal na qual os indivíduos inserem diferentes tipos de objetos em diversas partes do corpo (FENATO; MIURA; BOLETA-CERANTO, 2010).

Existem relatos de sua utilização, desde o Egito antigo, no umbigo, como um sinal de realeza (MAIBAUM; MARGHERITA, 1997). Os *piercings* foram utilizados na língua pelos maias, para simbolizar crenças espirituais, e na América do Norte eram bem comuns na tribo Sioux (BOTCHWAY; KUC, 1998). O uso do *piercing* labial parece ter surgido entre os povos do Alasca e das Ilhas Aleutas, representando diferentes acontecimentos nas vidas das pessoas, como puberdade e iniciação a caça e casamento (BOARDMAN; SMITH, 1997).

As regiões oral e perioral têm figurado como áreas bastante utilizadas para colocação de *piercings* (PANAGAKOS; LINFANTE; PASCUZZI, 2000). O interesse por estes locais pode ser atribuído a diversos fatores. A principal razão é o prazer dos jovens em estarem na moda e ter estilo. Outros fatores podem incluir religião, questões tradicionais, rituais, ou a necessidade em relação a outros membros da sua classe social (KUSTNER et al., 2003).

A utilização de *piercing* bucal, na boca ou nos lábios, pode trazer sérios agravos, independentemente se é em tecidos moles ou em tecidos duros, podendo causar problemas sistêmicos, no caso de indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Dentre inúmeras localizações do *piercing* na cavidade bucal, pode-se destacar: nos freio lingual e labial, nos lábios e na língua, sendo esta última uma das mais prevalentes (EULÁLIO et al., 2012).

De um ponto de vista médico, o uso de *piercing* lingual não pode ser considerado uma tendência da moda inofensiva, uma vez que podem produzir efeitos locais e gerais indesejáveis (ZIEBOLZ; HORNECKER; MAUSBERG, 2009), sendo as infecções, uma das complicações mais frequentes, juntamente com a formação de biofilme sobre os *piercings* (GOLD et al., 2005; KAPFERER; BEIER; PERSSON, 2011). Além disso, alguns estudos mostraram que o *piercing* pode levar a alterações periodontais, verificando-se desde uma simples retenção de biofilme dentário no material até mesmo uma periodontite localizada (EBRAHIM; NAIDOO, 2008; PÉCORA et al., 2010).

O biofilme dentário é uma biomassa densa, não calcificada e muito bem

estruturada, constituída por microrganismos envolvidos e aglutinados por uma matriz que representa cerca de 75% de seu volume (DE LORENZO, 2004). A colonização primária é feita predominantemente por cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, especialmente por espécies de *Streptococcus* (COLE et al., 1999). O *Streptococcus oralis* e o *Eikenella corrodens* estão entre as principais bactérias que aderem à superfície de *piercings* linguais (KAPFERER; BEIER; PERSSON, 2011).

Sabe-se também que algumas propriedades dos materiais podem interferir na colonização microbiana de superfícies sólidas como a composição química, rugosidade superficial, fendas e inclusões, cobertura por filmes de óxido ou revestimentos orgânicos e propriedades inerentes ao material utilizado (FLINT; BROOKS; BREMER, 2000).

Pode-se considerar o *piercing* bucal como um dos fatores etiológicos do câncer oral, pois ele facilita o surgimento de lesões crônicas na mucosa oral e perioral, bem como causa a liberação de substâncias carcinogênicas. E isso pode ser potencializado com o uso de álcool e cigarro, que são mais comuns entre as pessoas jovens portadoras desse artefato (EULÁLIO et al., 2012).

Em relação a este aspecto, constata-se que predomina dentre os usuários de *piercing* lingual as mulheres jovens, com média de idade entre 18 e 21 anos (FRAGELLI; CAMPOS; GASPAR, 2010; KIESER et al., 2005)

Nos estudos realizados por Eulálio et al. (2012) e Kieser et al. (2005) um pequeno número de participantes tiveram seus *piercings* colocados por um profissional da saúde. Esse dado tem uma grande importância, pois chama a atenção para os riscos a que os usuários estão expostos, já que não é raro a violação das normas de biossegurança por parte dos instaladores do artefato.

As pessoas que pretendem utilizar um *piercing* procuram locais onde muitas vezes não existe uma biossegurança adequada, nem mesmo alvará da vigilância sanitária, aumentando o risco de contaminação por diversos microrganismos, dentre eles, causadores de doenças graves como AIDS e hepatite. Por esses motivos, a colocação de *piercings* nas diferentes partes do corpo por profissionais despreparados e sem habilitação, torna-se um problema de saúde pública, pois atualmente, existe uma forte tendência para colocação de *piercings* entre os jovens, principalmente na boca e tecidos periorais (EULÁLIO et al., 2012).

Diante do exposto, um estudo que avalie a colonização bacteriana sobre as superfícies de *piercings* linguais torna-se interessante visto que permitirá que se tenha o conhecimento de qual material utilizado é o mais prejudicial à saúde bucal, pois o uso de materiais menos suscetíveis à acumulação de biofilme dentário pode contribuir para a prevenção de agravos bucais, sendo este o propósito do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O surgimento do *piercing* e sua utilização atualmente

Piercing é o nome que se dá a perfuração da pele e do tecido subjacente, bastante difundida entre os jovens, geralmente para a colocação de jóias permanentemente. São utilizados com frequência na genitália, umbigo, mamilo, na orelha, sobrancelhas, nariz, bochechas e cavidade bucal. Na cavidade bucal, os lábios são muito procurados, mas o *piercing* lingual está se tornando cada vez mais popular (PETICOLAS; TILLISS; CROSS-POLINE, 2000; THEODOSSY, 2003; ROSIVACK; KAO, 2003; VENTĀ et al., 2005).

Outras estruturas como freio lingual, úvula, mucosa jugal e dentes, também são alvos para a inserção de *piercing* (CERRI, 2001).

Modificações no corpo, incluindo tatuagens e *piercings* corporais, têm sido feitas por vários grupos de populações durante os séculos, em diferentes regiões geográficas, produzindo distintos significados culturais e sociais (PANCONESI, 2007).

A primeira representação conhecida do uso do *piercing* foi feita na figura de um cachorro criado no Egito por volta de 1500 AC. Os povos egípcios utilizavam *piercings* em seus umbigos como um sinônimo de realeza. Os maias perfuravam suas línguas com finalidades religiosas e os povos norte-americanos utilizavam o *piercing* como uma tradição (GATKOWSKI; DOBRZYŃSKI; PRZYWITOWSKA, 2007).

Os motivos que levavam as populações antigas a utilizarem *piercings* não diferem daqueles que atualmente induzem a escolha por essa prática. Sendo que o modismo, a identificação com o grupo ou simplesmente uma forma para chamar a atenção figuram como os principais fatores (CANTO et al., 2002). O *piercing* é uma modificação corporal muito antiga, que no passado era uma prática cultural, mas hoje é considerado uma moda (PLESSAS; PEPELASSI, 2012).

Segundo o estudo de Fragelli, Campos e Gaspar (2010) realizado em Araraquara, São Paulo, a idade média dos usuários de *piercing* lingual foi de

19,96 anos, sendo a maioria mulheres. No estudo feito por Kieser et al. (2005), na Nova Zelândia, a média de idade dos usuários foi de 21 anos e a maioria mulheres, corroborando com estudo anterior, onde predominou jovens e mulheres.

De um ponto de vista sociológico, a partir de um estudo feito em Rotenburg, Alemanha, a maioria dos participantes possuía ensino médio (46% comparado com 37% da população) e ensino fundamental (50%), a maioria era fumante, consumidores de álcool e relataram ter uma higiene bucal satisfatória, escovando seus dentes duas vezes por dia (ZIEBOLZ et al., 2012).

2.2 Piercing lingual e suas características

Os tipos de *piercing* mais utilizados são os que possuem um formato de uma haste (INCHINGOLO et al., 2011). O mais comum é o que apresenta na ponta uma esfera (94% dos casos), sendo o próximo, o que possui a ponta em formato de cone (4% dos casos) e os que apresentam na ponta um cilindro são os menos populares, com apenas 2% dos casos apresentados (ZIEBOLZ et al., 2012).

Existem dois tipos de *piercing* na língua, dorsoventral e dorsolateral. O dorsoventral é o mais seguro e mais comumente praticado. Sabe-se que a língua é perfurada na maioria das vezes na linha média e mais especificamente no sulco lingual médio, sendo os vasos sanguíneos maiores evitados durante o procedimento. Nesse tipo, a jóia é inserida da superfície dorsal para a ventral da língua. Alguns indivíduos podem escolher ter múltiplos *piercings* dorsoventrais, embora alguns *piercings* sejam colocados na região dorsolateral da língua, mais anteriormente ao frênulo lingual (PETICOLAS; TILLISS; CROSS-POLINE, 2000; STEAD et al., 2006).

Os objetos empregados no *piercing* são feitos de diferentes materiais, mais comumente metais, como aço cirúrgico e titânio (BOARDMAN; SMITH, 1997; PETICOLAS; TILLISS; CROSS-POLINE, 2000). Recentemente, *piercings* também têm sido confeccionados em materiais sintéticos como teflon, nylon e plástico (ZIEBOLZ et al., 2012).

Aço cirúrgico, titânio, teflon e bioplast são comumente usados como materiais de *piercing*. A superfície do aço cirúrgico, assim como a do titânio, é bem conhecida por apresentar boa propriedade mecânica, alta resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade (CARLSSON et al., 1986). O teflon é um polímero sintético autoclavável composto por carbono e flúor (DUPONT, 2014). O bioplast é um homopolímero esterilizável por calor e radiação, designado para aplicações médicas (BOREALISGROUP, 2014).

Esses quatro materiais diferem na aspereza das suas superfícies (que é maior no teflon), na molhabilidade, que é a capacidade de um líquido em manter contato com uma superfície sólida, (que é menor no teflon) e na composição química (KAPFERER; BEIER; PERSSON, 2011).

2.3 *Piercing* lingual e saúde bucal

As consequências indesejáveis provocadas pela utilização do *piercing* variam de acordo com a região onde o adorno é colocado. Assim, pode-se considerar que o uso de um *piercing* na mucosa é mais preocupante do que na pele, pois são estruturas que apresentam diferenças anatômicas, histológicas e fisiológicas. A pele é mais protegida, estática, sendo esta mais espessa e menos vascularizada. Já a mucosa, principalmente a mucosa oral, apresenta uma alta vascularização, é úmida e possui uma flora bacteriana bastante excessiva, estando esta em constante movimentação (DOUGLAS, 1998).

Assim, a preocupação do ponto de vista odontológico deve crescer no que se refere às lesões tanto em tecidos moles, quanto mineralizados decorrentes da prática do uso de *piercing* na cavidade bucal e em tecidos adjacentes (FENATO; MIURA; BOLETA-CERANTO, 2010).

Existem várias complicações associadas com o *piercing* oral, que podem comprometer a saúde bucal e levar a problemas periodontais. Dentre elas estão a dor, edema, infecção, transmissão de doenças, obstrução das vias aéreas secundárias por sangramento, sangramento prolongado, dentes lascados ou fraturados, trauma na mucosa gengival, interferência na mastigação ou salivação, impedimento na fala, hipersalivação, formação de

tecido hiperplásico ou cicatricial, danos nos nervos e parestesia, aspiração do artefato, incorporação de corpo estranho no local do *piercing*, distorção de imagens radiográficas, formação de cálculos sobre as superfícies do metal e hipersensibilidade ao metal (HARDEE; MALLYA; HUTCHISON, 2000; UPPAL et al., 2012).

A infecção é a complicação mais comum em pacientes que fazem o uso de *piercings* linguais (FARAH; HARMON, 1998; KEOGH; O'LEARY, 2001). A acumulação de biofilme dentário e cálculos em locais onde o *piercing* foi colocado pode aumentar o desenvolvimento de infecções (SHACHAM et al., 2003). Além disso, biofilmes em *piercings* bucais podem servir de reservatórios para bactérias associadas com a periodontite, por causa da condição anaeróbica no local do *piercing* (ZIEBOLZ; HORNECKER; MAUSBERG, 2009).

O tempo médio de cicatrização, no lábio e na língua é de, aproximadamente, cinco semanas. Nos casos em que o paciente apresentar dor e/ou inflamação ocorre um conseqüente aumento do período de cicatrização, sendo sugerida a limpeza do local com uso de clorexidina e antibioticoterapia sistêmica (LIMA, 2000).

Uma maior quantidade de biofilme pode ser produzida no local do *piercing* bucal devido à dificuldade de manter a higiene e a retenção de restos de alimentos, criando um ambiente ideal para grande acumulação de biofilme e cálculo. Além disso, o constante contato com o objeto aumenta a probabilidade de surgimento de biofilme supra e subgengival nos incisivos centrais inferiores. Essas acumulações podem produzir halitose e possível infecção (UPPAL et al., 2012).

Pode-se afirmar que quanto mais tempo o *piercing* permanece na cavidade bucal e pior é a higiene oral e do *piercing*, mais rápida será a mudança de bactérias com potencial periodontopatogênico moderado para bactérias com potencial periodontopatogênico muito alto (ZIEBOLZ; HORNECKER; MAUSBERG, 2009).

Além disso, as pesquisas mostram que a movimentação do *piercing* na boca provoca uma reação de células inflamatórias e hiperplasia tecidual, havendo a possibilidade de formação neoplásica (BOARDMAN; SMITH, 1997).

Em áreas nas quais anteriormente foram inseridos *piercings*, biópsias realizadas demonstraram que, em todos os casos, havia algum tipo de

alteração histológica. As alterações variavam desde quadros menos preocupantes, como uma reação inflamatória crônica, até displasias epiteliais. Neste sentido, os *piercings* atuariam como um agente traumático na etiologia dos cânceres bucais. Aliado a utilização do *piercing*, se o paciente consumir frequentemente bebidas alcoólicas e for tabagista, pode-se ter um fator contribuinte para a evolução, em longo prazo, de uma lesão cancerizável (CERRI, 2001).

Em um estudo realizado com jovens da cidade de Innsbruck, Áustria, verificou-se que diferenças no padrão de colonização das bactérias ocorreram em distintos materiais de *piercings*. *Piercings* confeccionados em aço cirúrgico podem promover maior desenvolvimento de biofilme, enquanto que os feitos de teflon e plástico podem ser inertes à colonização de bactérias (KAPFERER; BEIER; PERSSON, 2011).

A instalação do *piercing* oral é considerada um procedimento cirúrgico devendo, portanto, ser assegurada por profissionais qualificados que obedeçam aos princípios de esterilização e assepsia (INCHINGOLO et al., 2011). A instalação de *piercings* realizada por profissionais não qualificados expõe os indivíduos a riscos e complicações adicionais (MELO et al., 2013).

É possível ter um resultado reverso quando o *piercing* é utilizado para fins estéticos, e na maioria dos casos envolve a região perioral. Não é raro o aparecimento de cicatrizes e até mesmo quelóides após a retirada da jóia, que muitas vezes requerem cirurgias estéticas para correção (DE MOOR; DE WITTE; DE BRUYNE, 2000).

Os *piercings* corporais existem há séculos e não estão perto de acabar. Deste modo, o cirurgião-dentista tem a responsabilidade de esclarecer o paciente de todas as possíveis conseqüências do uso do *piercing*, sendo proativo em educar a respeito de estilos de vida mais saudáveis deixando claro que o hábito pode trazer riscos para a saúde bucal e sistêmica. O conhecimento sobre o assunto ajudaria cirurgiões-dentista no aconselhamento de pacientes a respeito do *piercing* bucal e auxiliaria a compreensão desse comportamento (STEIN; JORDAN, 2012; PATUSSI et al., 2014).

O estudo de Levin, Zadik e Becker (2005), em Tel Aviv, Israel, mostrou que 58% dos indivíduos que utilizavam *piercing* lingual não haviam sido informados sobre os riscos de um *piercing* bucal.

2.4 *Eikenella corrodens* e *Streptococcus oralis*

Eikenella corrodens é um bacilo anaeróbico facultativo e de crescimento lento que é conhecido por causar sérias doenças em humanos. Os casos documentados incluem infecções na cabeça e pescoço, meningite, endocardite, infecções intra-abdominais, infecções na pele e infecção após mordida humana (PAUL; PATEL, 2001). Essa bactéria faz parte da microbiota bucal, da flora respiratória superior e gastrointestinal, sendo também associada com a exposição a secreções orais (ANDRÉS et al., 2002).

A associação do *E. corrodens* com *piercing* lingual já foi documentada. Casos de infecção intrauterina foram diagnosticados. A utilização de *piercing* lingual pela mulher, ou até mesmo por ela e seu parceiro, pode ter sido um dos fatores contribuintes para a propagação hematogênica e vaginal do *E. corrodens*, devido ao trauma na língua e prática de sexo oral (JADHAV; BELFORT; DILDY, 2009; HU; CREWALK; ASCHER, 2012).

Streptococcus oralis, um membro do grupo mitis, que faz parte do grupo estreptococos viridans, é um constituinte do biofilme dentário, em que se forma uma significativa proporção de microflora acidúrica (BRAILSFORD et al., 1999). O *S. oralis* tem um papel importante na cárie dental, apresentando também associação com algumas doenças extra orais como endocardite e infecções em pacientes susceptíveis, incluindo aqueles que estão imunologicamente comprometidos (WILKINS; BEIGHTON; HOMER, 2003).

Na literatura existe apenas um estudo que relaciona o *S. oralis* com *piercing* lingual. Kapferer, Beier e Persson (2011), realizaram testes microbiológicos em pacientes portadores de *piercing* lingual. Dentre inúmeras bactérias encontradas, foi verificado que *S. oralis* e *E. corrodens* estavam entre os microrganismos mais presentes nesses artefatos.

2.5 Adesão bacteriana e o uso de Microscopia Eletrônica de Varredura

Os biofilmes são estruturas tridimensionais consideradas comunidades

microbianas aderidas em superfícies sólidas. São encontradas no esmalte dentário, superfície radicular ou implantes dentários (ZIJNGUE et al., 2010). Esses microrganismos apresentam-se embebidos em uma matriz extracelular composta por glicoproteínas e polissacarídeos. Tem-se a formação da película adquirida como o primeiro estágio para o desenvolvimento do biofilme. Esta película é considerada um filme condicionante que altera a carga e a energia livre de superfície, deste modo, aumenta a eficiência da adesão (MARSHALL, 1992; TEN CATE et al., 2009).

Entretanto, sabe-se que a película adquirida irá influenciar na aderência de microrganismos orais, reduzindo-a ou potencializando-a em alguns casos, dependendo da composição da película e do tipo de microrganismo. A película tem a função de conferir especificidade ao processo de adsorção e suas proteínas apresentam uma maior atração por alguns microrganismos do que com outros (SANTOS; JORGE, 2007).

As bactérias possuem um sistema de reconhecimento nas suas superfícies, o que irá possibilitar a adesão dos componentes específicos da superfície bacteriana (adesinas) às moléculas complementares (receptores) na película adquirida. Sabe-se que *S. Sanguis* e *S. oralis* se ligam especificamente a resíduos terminais de ácido siálico das glicoproteínas salivares humanas (GIBBONS, 1989). Já o *S. mutans* possuem receptores específicos que irão interagir com as proteínas ricas em prolina (PRP), que se ligam a superfície dentária e fazem parte da composição da película (NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLOF, 2005).

Foram desenvolvidos muitos modelos de estudo *in vitro* com o objetivo de tentar explicar os fenômenos de interações microbianas, coagregação, aderência e metabolismo dos vários microrganismos bucais. Dependendo do tipo de análise a ser realizada, os fatores relacionados à microbiota bucal necessitam ser minimizados, e assim ter-se-á uma análise mais detalhada e precisa de cada fenômeno estudado. Esses modelos de estudo são feitos para testar corpos de prova, cortes dentais, fragmentos de dentina, vidro, entre outros, sabendo que a adesão bacteriana nesses materiais é diferente (BARBIERI, 2005; ALMEIDA et al., 2008).

A utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) em estudos que envolvem a adesão de bactérias é frequentemente empregada. No estudo

realizado por Gondim (2010), avaliou-se, por meio do MEV, a superfície de diversos materiais restauradores frente à *Streptococcus mutans*. No estudo de Souza (2011), verificou-se a aderência *in vitro* do *S. mutans* à superfície de braquetes ortodônticos metálicos e de policarbonato, utilizando também o MEV, pois com o seu auxílio, foi possível ter acesso a imagens tridimensionais da conformação espacial tanto dos materiais como das colônias bacterianas, através da sua grande capacidade de resolução.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a aderência *in vitro* das bactérias *Eikenella corrodens* e *Streptococcus oralis* à superfície de *piercings* linguais de aço cirúrgico, titânio, polipropileno (bioplast) e politetrafluoretileno (teflon).

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se existem diferenças na aderência das bactérias à superfície de *piercings* linguais de aço cirúrgico, titânio, bioplast e de teflon;
- Analisar as superfícies colonizadas desses *piercings* mediante Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento geral do estudo

O estudo apresenta como metodologia uma abordagem indutiva com procedimento estatístico e comparativo e como técnica de pesquisa a observação direta intensiva em laboratório (LAKATOS; MARCONI, 2010).

4.2 Locais de realização da pesquisa

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral, localizado no Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

A análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi desenvolvida no Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAT) do Centro de Tecnologia (CT) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3 Microrganismos selecionados

Foram utilizados como microrganismos teste, cepas de *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) e *Eikenella corrodens* (ATCC 23834). Tais microrganismos foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), situado na cidade do Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

4.4 Universo e amostra

Foram selecionados *piercings* linguais de aço cirúrgico, titânio, bioplast e teflon da mesma marca e modelo (Figura 1). Assim, a amostra foi composta por 192 *piercings* linguais. Para cada material, 40 *piercings* foram destinados ao teste microbiológico e outros 8 à análise em MEV. As amostras foram escolhidas aleatoriamente no momento da compra. O critério mínimo de inclusão para cada tipo de *piercing* era que os materiais fossem confeccionados pelo mesmo fabricante e apresentassem o mesmo tamanho e formato pré-estabelecidos.



Figura 1 - *Piercings* utilizados: aço cirúrgico, titânio, teflon e bioplast.

4.5 Preparo do inóculo bacteriano

Foram preparadas suspensões das cepas teste em solução salina estéril, as quais foram padronizadas de acordo com o tubo 0,5 da Escala Nefelométrica de McFarland (PROBAC DO BRASIL[®], São Paulo, SP, Brasil) correspondendo à concentração de aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

4.6 Montagem dos sistemas de aderência *in vitro*

As amostras foram divididas em dois grupos de acordo com o tipo de solução, onde cada grupo apresentou 96 piercings, 24 de cada tipo, sendo eles previamente autoclavados. Desses, 20 de cada tipo foram utilizados para realização do teste da aderência bacteriana e 4 para a análise em MEV. O primeiro grupo (S1) apresentou 96 tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion – HIMEDIA®, Mumbai, Índia) e 50 µL do inóculo bacteriano (Figura 2 e 3) e o segundo grupo (S2) apresentou 96 tubos de ensaio contendo 5 mL de BHI caldo (Figura 4 e 5) servindo para o controle de esterilidade do meio de cultura e das amostras (Quadro 1).

Grupos	Composição de cada grupo	Piercings por grupo
Grupo 1 (S1)	96 tubos de ensaio contendo 5mL de BHI + 50 µL do inóculo bacteriano.	24 Aço 24 Titânio 24 Bioplast 24 Teflon
Grupo 2 (S2)	96 tubos de ensaio contendo 5 mL de BHI (controle de esterilidade do meio de cultura e das amostras).	24 Aço 24 Titânio 24 Bioplast 24 Teflon

Quadro 1 - Grupos preparados para incubação dos *piercings*.

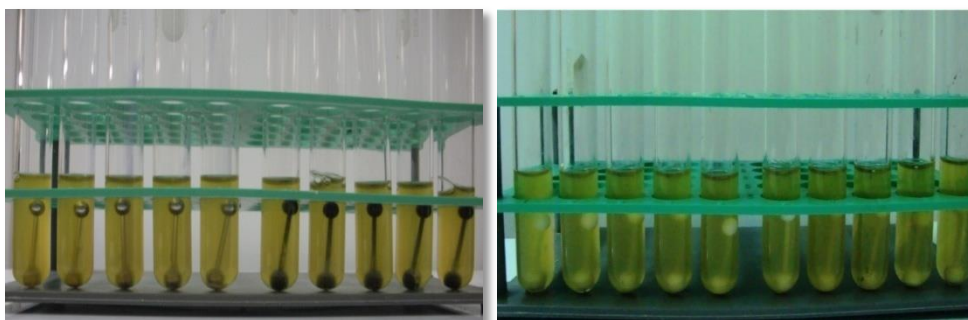


Figura 2 e 3 - *Piercings* de aço cirúrgico, titânio, bioplast e teflon incubados (S1).

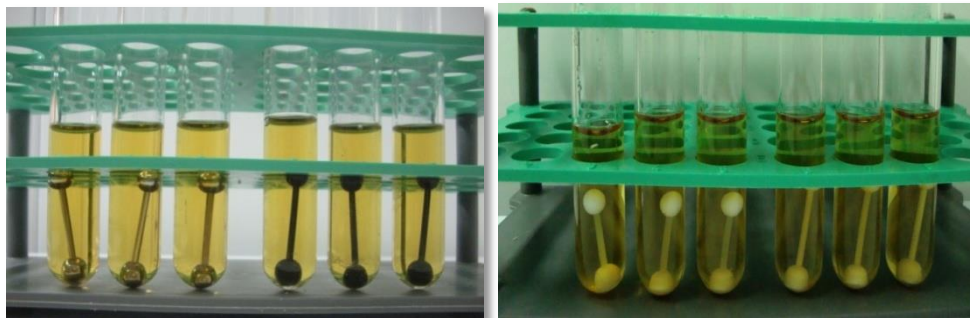


Figura 4 e 5 - Piercings de aço cirúrgico, titânio, bioplast e teflon - Controle (S2).

Após a colocação dos *piercings*, com o auxílio de uma pinça estéril, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C, em microaerofilia, por um período de 24 horas.

4.7 Análise da aderência bacteriana

Após o período de 24 horas, cada *piercing* foi transferido, com auxílio de uma alça de platina flambada até o rubro, para um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril, sendo em seguida agitados por 2 minutos em um agitador de soluções AP 59 (Phoenix[®], Araraquara, SP, Brasil) na velocidade 5. Em seguida, a solução obtida foi diluída em série em solução salina estéril até a 10^{-5} . Assim, para cada amostra foram preparados 5 tubos de ensaio contendo 4,9 mL de solução fisiológica estéril. Em seguida realizou-se a diluição seriada como mostra o esquema representativo visualizado na Figura 6.

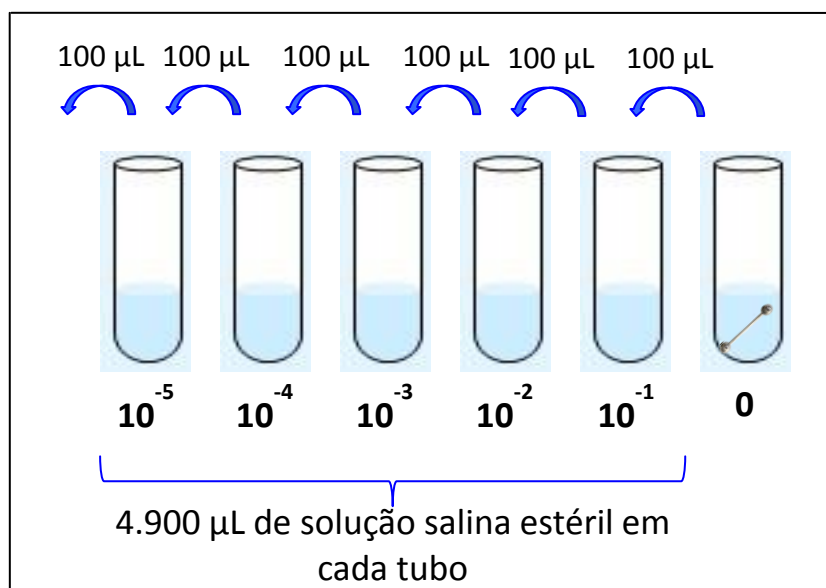


Figura 6 - Diluição seriada

Alíquotas de 25 µL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram inoculadas em placas contendo meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) (DIFCO[®], São Paulo, SP, Brasil) pela Técnica da Gota (MILES; MISRA; IRURN, 1938) (Figura 7).



Figura 7 - Plaqueamento pela Técnica da Gota.

Para cada *piercing* foram utilizadas duas placas de Petri divididas em três partes iguais (Figura 8).

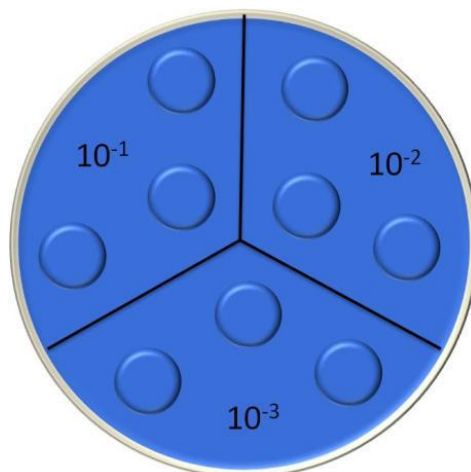


Figura 8 - Ilustração representativa da Técnica da Gota.

Em cada parte da placa foram inoculadas 3 alíquotas de 25 μL de cada diluição. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h em microaerofilia para posterior contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). Para cada amostra, foi realizada a contagem das três gotas da diluição que apresentou o menor número de colônias. A média das três contagens foi multiplicada por 40 e elevada à potência correspondente a diluição, para assim estimar o número de UFC/mL, ou seja, UFC/*piercing* (THOMÉ, 2005).

4.8 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura

Após o período de incubação (24 horas), os 32 *piercings* foram preparados para a análise em MEV. Para tanto, os espécimes foram fixados com solução tampão de fosfato de sódio 0,1M (pH 7) e glutaraldeído 2% por 3 horas e em seguida, foi feita três lavagens consecutivas com a solução tampão por 10 minutos cada (SESSO, 2007). Feito isto, os *piercings* foram montados em porta-amostras de alumínio e recobertos com uma fina camada de ouro, por meio do aparelho metalizador Emitech K550X (Emitech®, Molfetta, Itália) (Figura 9). Após o recobrimento, as amostras foram analisadas e fotografadas

em MEV (LEO 1430[®], Elektronen mikroskopie Gmb H, Reino Unido) (Figura 10) em aumentos padronizados de 50x, 100x, 500x e 1000x. Mediante esta análise foi possível verificar características superficiais dos piercings e a organização das colonizações bacterianas sobre essas superfícies.

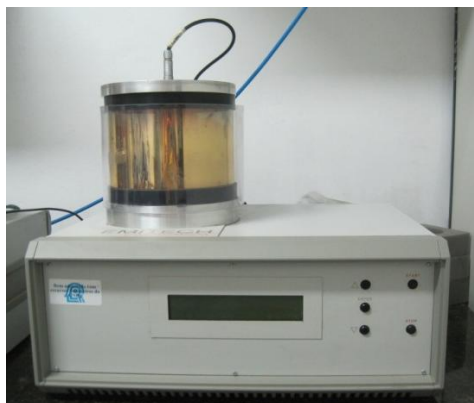


Figura 9 - Aparelho metalizador Emitech K550X.

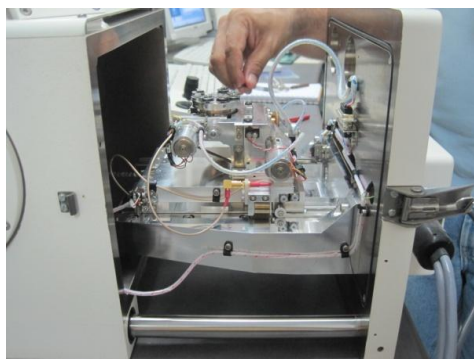


Figura 10 - Porta-amostras sendo dispensados no interior do MEV.

4.9 Análise dos dados

Os dados referentes à contagem de UFC/mL foram testados quanto a normalidade na sua distribuição e empregou-se os seguintes testes: Kolmogorov-Smirnov, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e t de Student, considerando o nível de significância de 5%, ou seja, p-valor < 0,05. Para tanto foi utilizado o programa estatístico Statistical Package for Social Science (SPSS), versão 20.

Os dados relativos à análise em MEV foram analisados descritivamente, apontando-se as características da superfície dos quatro tipos de *piercings* e da colonização bacteriana sobre os mesmos.

5 RESULTADOS

5.1 Em relação ao teste microbiológico de aderência de *E. corrodens* e *S. oralis*

A contagem das UFC para cada *piercing* e bactéria está disposta nas Tabelas 1 e 2. Percebe-se que houve aderência dos dois microrganismos a todos os *piercings*, sendo que os de titânio foram os que menos aderiram para ambas as bactérias, ao passo que os de bioplast e teflon foram os que mais aderiram *E. corrodens* e *S. oralis*, respectivamente. Verificou-se também diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os materiais testados sobre uma mesma bactéria.

Pode-se constatar que houve diferença estatisticamente significativa quando comparou-se cada material sobre as duas bactérias, não havendo apenas para o bioplast ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias de aderência do *E. corrodens* e do *S. oralis* em UFC/mL para os quatro tipos de *piercings*.

	Aço cirúrgico	Titânio	Bioplast	Teflon
<i>E. corrodens</i>	11,95x10 ⁵	6,40x10 ⁵	67,36x10 ⁵	36,72x10 ⁵
<i>S. oralis</i>	29,68x10 ⁵	24,21x10 ⁵	77,38x10 ⁵	68,34x10 ⁵
P valor*	0,002	0,010	0,666	0,038

*Teste utilizado: Kruskal-Wallis.

Tabela 2 - Médias de aderência do *E. corrodens* e do *S. oralis* em UFC/mL para comparação entre os materiais e as bactérias.

	Aço cirúrgico	Titânio	Bioplast	Teflon	P valor*
<i>E. corrodens</i>	11,95x10 ⁵	6,40x10 ⁵	67,36x10 ⁵	36,72x10 ⁵	0,001
<i>S. oralis</i>	29,68x10 ⁵	24,21x10 ⁵	77,38x10 ⁵	68,34x10 ⁵	0,007

*Teste utilizado: Kruskal-Wallis.

Ao comparar os diferentes materiais dois a dois para o *E. corrodens*, verificou-se que apenas o Bioplast comparado com o Teflon, não apresentou diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - P valor da comparação dos tipos de *piercing* dois a dois para o *E. corrodens*.

<i>E. corrodens</i>	Aço cirúrgico	Titânio	Bioplast	Teflon
(P valor*)				
Aço cirúrgico	-	0,023	0,001	0,001
Titânio	-	-	0,001	0,001
Bioplast	-	-	-	0,089
Teflon	-	-	-	-

*Testes utilizados: Mann-Whitney e t de Student.

Na Tabela 4, tem-se a comparação dos diferentes materiais dois a dois para o *S. oralis*. Nota-se que não houve diferença estatisticamente significante quando confronta-se aço cirúrgico com titânio e teflon, e também quando confronta-se bioplast e teflon.

Tabela 4 - P valor da comparação dos tipos de *piercing* dois a dois para o *S. oralis*.

<i>S. oralis</i>	Aço cirúrgico	Titânio	Bioplast	Teflon
(P valor*)				
Aço cirúrgico	-	-	-	-
Titânio	0,353	-	-	-
Bioplast	0,035	0,004	-	-
Teflon	0,063	0,007	0,631	-

*Testes utilizados: Mann-Whitney e t de Student.

No grupo S2 (apenas BHI), não foi observada aderência bacteriana na superfície de nenhum tipo de *piercing*, confirmando a esterilidade das amostras e do meio de cultura utilizados.

As Figuras de 11 a 14, exemplificam a visualização das UFC/mL nas diluições 0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para os quatro tipos de *piercings*

incubados nas soluções contendo *E. corrodens* e *S. oralis*.

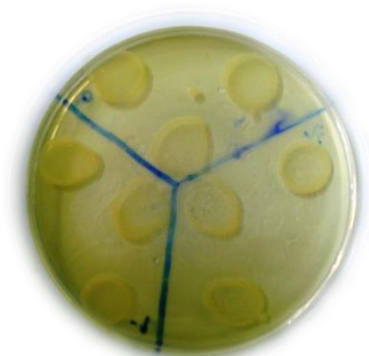


Figura 11: Puro (0) e diluições -1 e -2 do Aço Cirúrgico frente a *E. corrodens*.



Figura 12: Diluições -3, -4 e -5 do Aço Cirúrgico frente a *E. corrodens*.

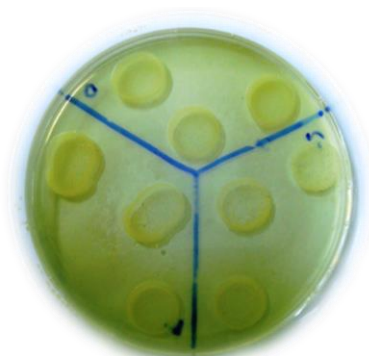


Figura 13: Puro (0) e diluições -1 e -2 do Bioplast frente a *S. oralis*.

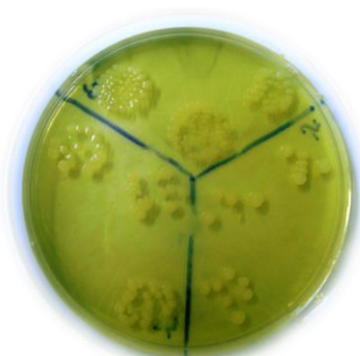


Figura 14: Diluições -3, -4 e -5 do Bioplast frente a *S. oralis*.

5.2 Em relação à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a microscopia, observaram-se as colônias de *E. corrodens* e *S. oralis* nas superfícies dos *piercings*, sendo possível visualizá-las de forma esparsa e em menor quantidade nos *piercings* metálicos, quando comparados com os artefatos de plástico (Figuras 15, 16, 17 e 18). Também comprovou-se a ausência de microrganismos na superfície dos *piercings* incubados apenas em BHI (Controle) (Figuras 19 e 20).

Além disso, a análise possibilitou entender a configuração espacial dos *piercings*, bem como a visualização minuciosa das suas superfícies. Assim, pôde-se perceber que os *piercings* metálicos e de plástico têm formas e superfícies distintas. Os primeiros possuem uma superfície lisa e polida. Enquanto que os *piercings* de plástico têm uma superfície de aspecto rugoso e irregular (Figuras 19 e 20).

A seguir, são apresentadas eletromicrografias dos quatro tipos de *piercings* submetidos à *E. corrodens* e *S. oralis*:

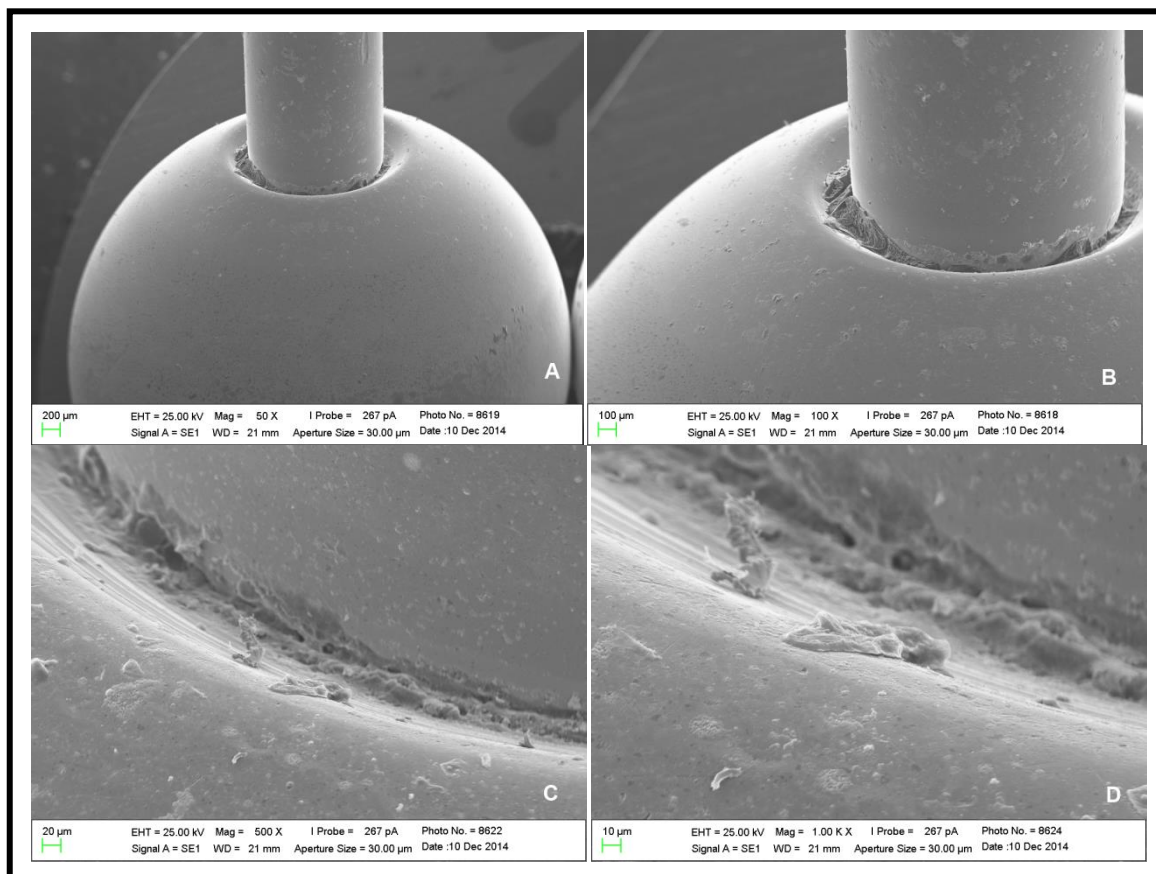


Figura 15: Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de aço cirúrgico incubado na solução contendo *S. oralis* (**A** - *Piercing* de aço cirúrgico em um aumento de 50x; **B** - Interface entre haste e esfera em um aumento de 100x; **C** - Aumento de 500x; **D** - Presença de colônias de *S. oralis* em aumento de 1000x).

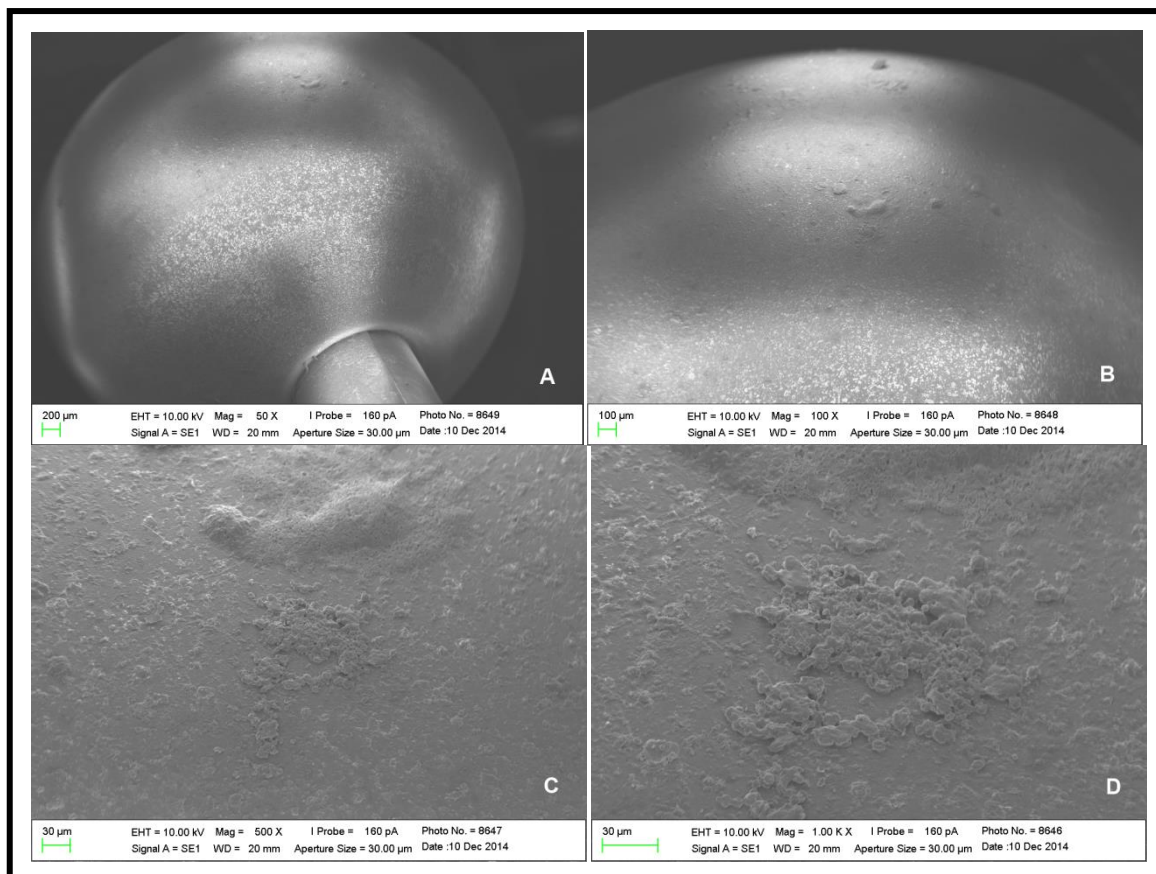


Figura 16: Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de teflon incubado na solução contendo *S. oralis* (**A** - *Piercing* de teflon em um aumento de 50x; **B** - Região da esfera em um aumento de 100x; **C** - Aumento de 500x; **D** - Presença de colônias de *S. oralis* em aumento de 1000x).

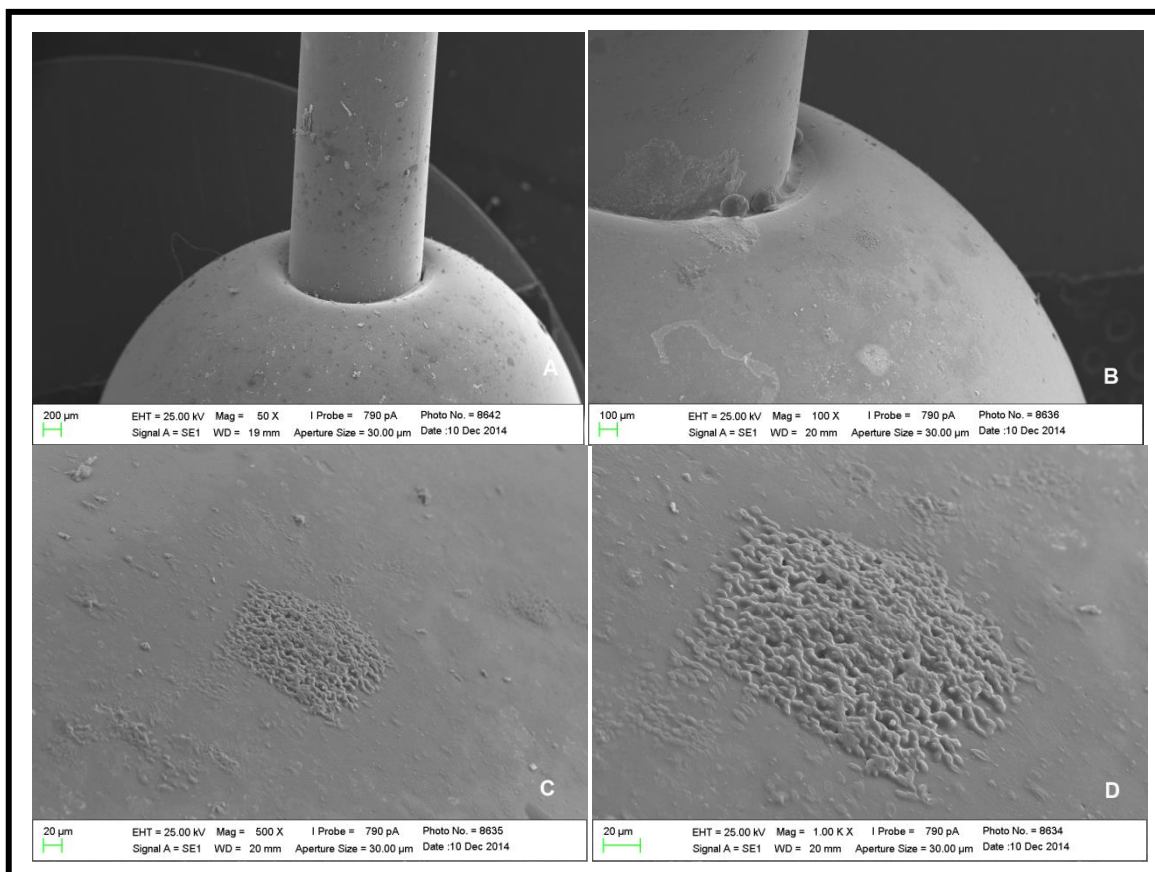


Figura 17: Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de titânio incubado na solução contendo *E. corrodens* (**A** - *Piercing* de titânio em um aumento de 50x; **B** - Interface entre a esfera e a haste em um aumento de 100x; **C** - Aumento de 500x; **D** - Presença de colônias de *E. corrodens* em aumento de 1000x).

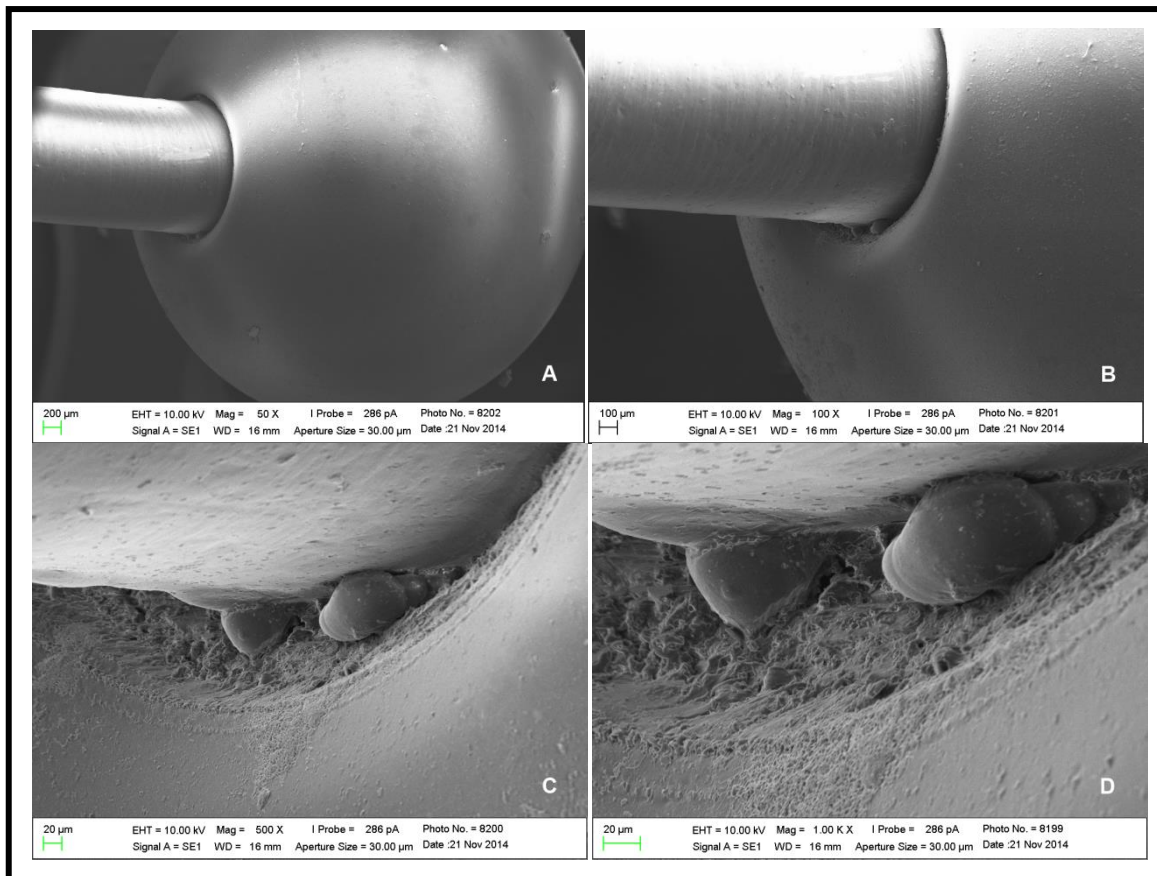


Figura 18: Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de bioplast incubado na solução contendo *E. corrodens* (**A** - *Piercing* de bioplast em um aumento de 50x; **B** - Interface entre a esfera e a haste em um aumento de 100x; **C** - Aumento de 500x; **D** - Presença de colônias de *E. corrodens* em aumento de 1000x).

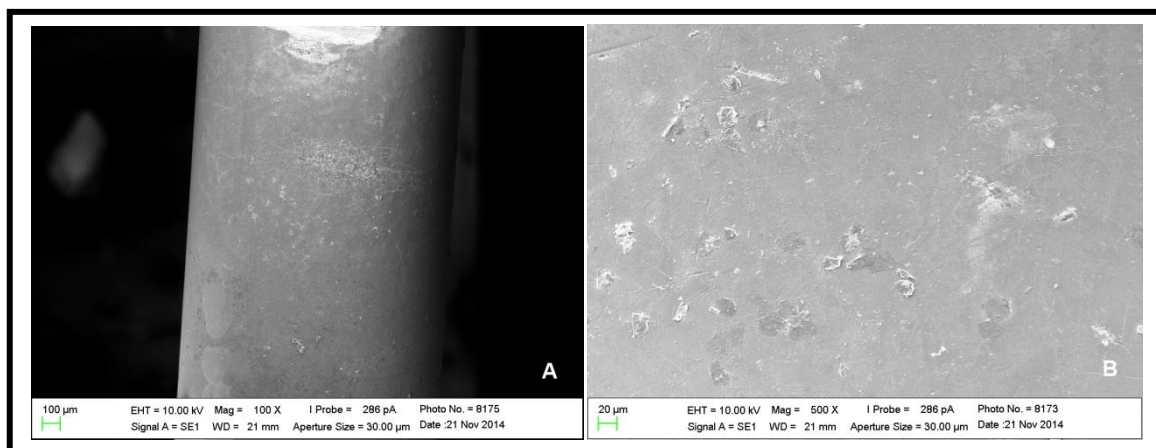


Figura 19: Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de titânio incubado na solução contendo apenas BHI (**A** - *Piercing* de titânio em um aumento de 100x, apresentando superfície isenta de colonização; **B** - Superfície lisa e polida isenta de colonização, em um aumento de 500x).

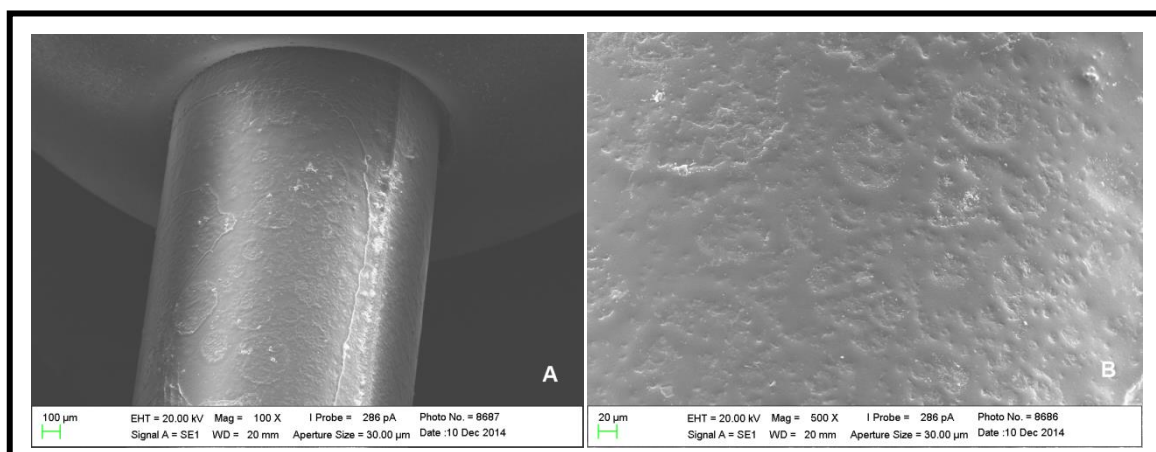


Figura 20: Eletromicrografia da superfície de um *piercing* de teflon incubado na solução contendo apenas BHI (**A** - *Piercing* de teflon em um aumento de 100x, apresentando superfície isenta de colonização; **B** - Superfície rugosa e irregular isenta de colonização, em um aumento de 500x).

6 DISCUSSÃO

O dinamismo do meio bucal, em conjunto com mecanismos imunológicos do hospedeiro, condições ambientais, microrganismos da microbiota, e em especial a dieta e higiene bucal, não podem ser reproduzidos no ambiente laboratorial (KOLENBRANDER; LONDON, 1993; MARCOTTE; LAVOIE, 1998).

Entretanto, os fatores que estão ligados à microbiota oral devem ser minimizados para a análise de cada acontecimento, levando em conta o tipo de experiência a ser realizada (BARBIERI, 2005). Desse modo, o presente estudo é relevante por recriar condições fisiológicas, porém seus resultados não podem ser encarados como verdade absoluta.

Neste estudo, foram utilizadas cepas de *E. corrodens* e *S. oralis* isoladas, com o objetivo de facilitar o entendimento dos dados e avaliar como cada bactéria se comporta isoladamente na presença dos *piercings* testados. Porém, sabe-se que ambas as bactérias *in vivo* possuem ações recíprocas entre si e com uma grande variedade de outras bactérias, sendo assim, interessante a realização de estudos de aderência a *piercings* em um modelo de biofilme microbiano.

A *Eikenella corrodens* e a *Streptococcus oralis* foram as bactérias escolhidas para serem testadas devido ao estudo de Kapferer, Beier e Persson (2011) que demonstrou uma maior presença dessas bactérias a superfície de *piercings* linguais.

A escolha dos materiais de *piercing* que seriam utilizados no experimento se deu mediante consulta à literatura. Diversos estudos apontaram os *piercings* de aço cirúrgico, titânio, bioplast e teflon como sendo os mais comumente encontrados em pacientes e que são de fácil acesso à população em geral (BOARDMAN; SMITH, 1997; PETICOLAS; TILLISS; CROSS-POLINE, 2000; ZIEBOLZ et al., 2012).

Na literatura, pode-se encontrar algumas pesquisas realizadas com pacientes portadores de *piercing* lingual, como os estudos de Fragelli, Campos e Gaspar (2010), Pires et al. (2010), Plessas e Pepelassi (2012), Eulálio et al. (2012) e Ziebolz et al. (2012). Estes estudos abordam apenas aspectos como prevalência de complicações decorrentes da utilização de *piercing* lingual e sua

influência no periodonto.

Apenas dois estudos abrangem a microbiologia relacionada com a utilização de *piercing* lingual (ZIEBOLZ; HORNECKER; MAUSBERG, 2009; KAPFERER; BEIER; PERSSON, 2011). Entretanto, estes estudos foram realizados *in vivo*, não sendo encontrada na literatura nenhuma pesquisa desenvolvida *in vitro* que tenha analisado *piercing* lingual.

No estudo de Ziebolz, Hornecker e Mausberg (2009), na cidade de Goettingen, Alemanha, os participantes responderam um questionário e tiveram seus *piercings* testados para a presença de 11 bactérias periodontopatogênicas. Todos apresentavam *piercing* em forma de haste com uma esfera na ponta e a maioria era de aço cirúrgico e titânio. Em todos os indivíduos mostrou-se um crescimento exacerbado de bactérias periodontopatogênicas. Quanto mais tempo o paciente possuía o *piercing*, aliado a uma falta de higiene adequada, maior o grau de complexidade das bactérias encontradas.

No estudo de Kapferer, Beier e Persson (2011) realizado com jovens da cidade de Innsbruck, Áustria, verificou-se que a média de idade entre os indivíduos estudados era de 22,47 anos, sendo a maioria fumante de moderado a assíduo. No teste microbiológico, foi possível observar que uma maior quantidade de bactéria foi encontrada nos *piercings* de aço cirúrgico quando comparado com outros materiais. Pode-se afirmar que diferenças no padrão de colonização das bactérias ocorreram em diferentes materiais de *piercings*. Corroborando estes achados, o presente estudo constatou diferença na quantidade de UFC/ml entre os distintos tipos de materiais de *piercing* (Tabela 2).

O *piercing* oral confeccionado com aço cirúrgico apresentou bons resultados com relação à aderência, tanto pra *E. corrodens* como para *S. oralis*, porém segundo Santo et al. (2007) esse material pode estar associado ao câncer bucal, em razão do desprendimento de cromo, substância considerada carcinogênica. Bordji et al. (1996) já haviam alertado para esse fato a respeito das ligas metálicas que possuem cromo na sua composição. Constatou-se que em estudos realizados em tecidos humanos, o cromo tem a capacidade de se concentrar no núcleo e na mitocôndria, inibindo o metabolismo oxidativo, interagindo com DNA e RNA e induzindo a formação de

células neoplásicas (ROGERO et al., 2000).

O trauma crônico, como a utilização de *piercing* lingual, por si só, não é capaz de induzir a formação de um câncer. Entretanto, quando associa-se outros fatores, tais como etilismo, tabagismo, radiação ionizante e suscetibilidade genética, o risco de o tecido sofrer alterações teciduais que iniciam uma lesão cancerígena é potencializado (SANTO et al., 2007).

Analisando ainda a Tabela 2, pode-se notar que os *piercings* metálicos apresentam uma menor aderência bacteriana quando comparado com os *piercings* plásticos. Isso difere dos achados encontrados por Kapferer, Beier e Persson (2011), onde os *piercings* metálicos apresentaram uma maior aderência bacteriana, enquanto os de plástico apresentaram-se inertes a colonização. Acredita-se que o método pode ter influenciado essa divergência de resultados entre os estudos, visto que um estudo foi realizado *in vivo* e o outro *in vitro*.

Diante do crescimento de pessoas que fazem uso de *piercings*, sobretudo dos linguais, é importante que o paciente tenha a informação de qual material utilizado é o mais prejudicial à saúde bucal, visto que o uso de materiais menos suscetíveis à acumulação de biofilme, pode contribuir para a prevenção de agravos bucais. Deve-se sempre orientar o paciente a não utilizar *piercing* lingual, visto que ele pode trazer muitos malefícios para o usuário, porém, caso o paciente insista, os *piercings* confeccionados com titânio são os mais indicados, pois, segundo o estudo de Carlsson et al. (1986), são os que apresentam menos corrosão, mais biocompatibilidade e de acordo com Santo et al. (2007) não apresentam desprendimento de cromo, como o aço cirúrgico. Além disso, no presente estudo, os *piercings* de titânio obtiveram os melhores resultados frente às duas bactérias testadas.

A utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura na análise das amostras é um método que pode ser considerado como padrão-ouro na análise de uma superfície, pois é provavelmente um meio mais sensível para verificar pequenas alterações estruturais (KÜHNISCH et al., 2007). Diversas pesquisas já utilizaram MEV para avaliar a aderência de bactérias a dentes ou a diferentes materiais de uso odontológico (BARBIERI, 2005; EICK et al., 2004; GONDIM, 2010). Porém, não há na literatura relatos de análises feitas da superfície de *piercing* linguais pelo Microscópio Eletrônico de Varredura,

tampouco das características de adesão das bactérias a estes artefatos.

No presente experimento, pôde-se afirmar que existem diferenças entre os *piercings* metálicos e os *piercings* plásticos quanto à colonização por *Eikenella corrodens* e o *Streptococcus oralis* mediante a análise em MEV. Os metálicos apresentam uma superfície bastante polida e lisa, entretanto os plásticos exibiram uma superfície rugosa e irregular. Esse fato pode ser o responsável pela diferença ocorrida, na etapa microbiológica, entre os dois tipos de *piercings* linguais. Consequentemente, a quantidade de colônias bacterianas, tanto de *E. corrodens* e *S. oralis* aderidas aos *piercings* foi visivelmente menor nos *piercings* metálicos quando comparados com os plásticos.

Desse modo, evidencia-se a necessidade de mais estudos como este, para que se tenha um maior conhecimento sobre quais materiais utilizados na fabricação de *piercings* linguais são mais indicados para um paciente, reduzindo assim os riscos de infecção e complicações que podem surgir com a utilização desse artefato.

7 CONCLUSÃO

- Os quatro tipos de piercings apresentaram-se susceptíveis a colonização por *E. corrodens* e *S. oralis*, sendo a aderência bacteriana mais expressiva naqueles confeccionados em bioplast e teflon.
- Por meio da microscopia eletrônica de varredura, evidenciou-se que os quatro tipos de *piercings* apresentaram colônias bacterianas em sua superfície, sendo constatada maior quantidade delas nos *piercings* plásticos provavelmente devido a sua superfície irregular e rugosa.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. G.; TREIN, M. P.; OPPERMANN, R. V.; RÖSING, C. K. Formação in situ de biofilme sobre esmalte e cimento de ionômero de vidro em diferentes tensões de oxigênio. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 48-52, 2008.

ANDRÉS, M. T.; MARTÍN, M. C.; FIERRO, J. F.; MÉNDEZ, F. J. Chorioamnionitis and neonatal septicaemia caused by *Eikenella corrodens*. **Journal of Infection**, Londres, v. 44, n. 2, p. 133- 134, 2002.

BARBIERI, D. S. V. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária**. 2005. 124f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BOARDMAN, R.; SMITH, R. A. Dental implications of oral piercing. **Journal of the California Dental Association**, Sacramento, v. 25, n. 3, p. 200-7, 1997.

BORDJI, K.; JOUZEAU, J. Y.; MAINARD, D.; PAYAN, E.; DELAGOUTTE, J. P.; NETTER, P. Evaluation of the effect of three surface treatments on the biocompatibility of 316L stain-less steel using human differentiated cells. **Biomaterials**, Oxford, v.17, n.5, p.491-500, 1996.

BOREALISGROUP. Disponível em:
<<http://www.borealisgroup.com/datasheets/10015489>>. Acesso em 21 de jan. 2015.

BOTCHWAY, C.; KUC, I. Tongue piercing and associated toothfracture. **Journal - Canadian Dental Association**, Ottawa, v. 64, n. 11, p. 803-5, 1998.

BRAILSFORD, S. R.; BYRNE,R. W.; ADAMS,S.; ZOITPOULOS,L.; ALLISON,C.; BEIGHTON, D. Investigation of the aciduric microflora of plaque.

Caries Research, Basel, v. 33, p. 290, 1999.

CANTO, G. L.; OLIVEIRA, J.; OURIQUES, K. A.; WOLF, F. L. "Piercing" bucal: o que os dentistas devem saber. **Revista regional de Aracatuba Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, Araçatuba, v. 56, n. 5, p. 345-49, 2002.

CARLSSON, L.; RÖSTLUND, T.; ALBREKTSSON, B.; ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P. Osseointegration of titanium implants. **Acta orthopaedica scandinavica**, Copenhagen, v. 57, n. 4, p. 285–9, 1986.

CERRI, A. Piercing: modismo perigoso. **Jornal de Assessoria ao Odontologista**, São Paulo, v. 28, p. 22-25, 2001.

COLE, M. F.; BRYAN, S.; EVANS, M. K.; PEARCE, C. L.; SHERIDAN, M. J.; SURA, P. A.; WIENTZEN, R. L.; BOWDEN, G. H. W. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. **Infection and immunity**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1878-86, 1999.

DE LORENZO, J. L. Placa (biofilme) dental. In: _____ **Microbiologia para o estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 73-85.

DE MOOR, R. J. G.; DE WITTE, A. M. J. C.; DE BRUYNE, M. A. A. Tongue piercing and associated oral and dental complications. **Endodontics and dental traumatology**, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 232-237, 2000.

DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia oral: fisiologia normal e patológica aplicada à odontologia e fonoaudiologia**. São Paulo: Pancast, p. 657, 1998.

DUPONT. Disponível em:
<http://www2.dupont.com/Teflon_Industrial/en_US/index.html>. Acesso em 21 de jan. 2015.

EBRAHIM R.; NAIDOO S. Oral and perioral piercings in Tshwane. **Journal of the South African Dental Association**, Gauteng, v. 63, n. 5, p. 288-91, 2008.

EICK, S.; GLOCKMANN, E.; BRANDL, B.; PFISTER, W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. **Journal of oral rehabilitation**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 278-285, 2004.

EULÁLIO, S. R. N.; TAPETY, F. I.; ALVES, E. L. M.; MESQUITA, G. V.; BRITO, J. N. P. O. Prevalência de complicações em tecidos moles e duros devido ao uso de piercing oral. **Revista enfermagem UERJ**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 429-33, 2012.

FARAH, C. S.; HARMON, D. M. Tongue piercing: case report and review of current practice. **Australian dental journal**, Sydney, v. 43, n. 6, p. 387–9, 1998.

FENATO, M. C.; MIURA, C. S. N.; BOLETA-CERANTO, D. C. F. Piercing bucal: sua saúde vale esse modismo? **Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 157-61, 2010.

FLINT, S. H.; BROOKS, J. D.; BREMER, P. J. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**, Pullman, v. 43, n. 4, p. 235-242, 2000.

FRAGELLI, C. M. B.; CAMPOS, J. A. D. B.; GASPAR, A. M. M. Considerações sobre o uso do piercing lingual. **Revista gaúcha de odontologia**, Porto Alegre, v. 58, n. 4, p. 451-455, 2010.

GOLD, M. A.; SCHORZMAN, C.M.; MURRAY, P. J.; DOWNS, J.; TOLENTINO, G. Body piercing practices and attitudes among urban adolescents. **Journal of adolescent health care**, New York, v. 36, n. 4, p. 352–3, 2005.

GONDIM, B. L. C. **Análise da colonização de *Streptococcus mutans* sobre**

materiais dentários restauradores. 2010. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

GATKOWSKI, A.; DOBRZYŃSKI, M.; PRZYWITOWSKA I. Oral piercing – review of literature. **Magazyn Stomatologiczny**, Varsóvia, v. 182, n. 4, p. 84-7, 2007.

GIBBONS, R. J. Bacterial adhesion to oral tissue: a model for infectious diseases. **Journal of dental research**, Washington, v. 68, n. 5, p. 750-760, 1989.

HARDEE, P. S. G. F.; MALLYA, L. R.; HUTCHISON, I. L. Tongue piercing resulting in hypotensive collapse. **British Dental Journal**, Londres, v. 188, n. 12, p. 657-658, 2000.

HU, B. L.; CREWALK, J. M.; ASCHER, D. P. Congenital sepsis caused by *Eikenella corrodens*. **Open Journal of Pediatrics**, v. 2, n. 2, p.175-177, 2012.

INCHINGOLO, F.; TATULLO, M.; ABENAVOLI, F. M.; MARRELLI, M.; INCHINGOLO, A. D.; PALLADINO, A.; INCHINGOLO, A. M.; DIPALMA, G. Oral piercing and oral diseases: a short time retrospective study. **International journal of medical sciences**, Blue Haven, v. 8, n. 8, p. 649-52, 2011.

JADHAV, A.R.; BELFORT, M.A.; DILDY, G. A. *Eikenella corrodens* chorioamnionitis: Modes of infection? **American journal of obstetrics and gynecology**, St. Louis, v. 200, p. 4-5, 2009.

KAPFERER, I.; BEIER, U. S.; PERSSON, R. G. Tongue piercing: The effect of material on microbiological findings. **Journal of adolescent health care**, New York, v. 9, n. 1, p. 76-83, 2011.

KEOGH, I. J.; O'LEARY, G. Serious complication of tongue piercing. **Journal of laryngology and otology**, Londres, v. 115, n. 3, p. 233–4, 2001.

KIESER, J. A.; THOMSON, W. N.; KOOPU, P.; QUICK, A. N. Oral piercing and oral trauma in a New Zealand sample. **Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 21, n. 5, p. 254-7, 2005.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere Today, Here Tomorrow: Oral Bacterial Adherence. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 175, n. 11, p. 3247-3252, 1993.

KÜHNISCH, J.; DIETZ, W.; STOSSER, L.; HICKEL, R.; HEINRICH-WELTZIEN, R. Effects of dental probing on occlusal surfaces – a scanning electron microscopy evaluation. **Caries Research**, Basel, v. 41, n. 1, p. 43-48, 2007.

KUSTNER, E. C.; TRAVE, I. B.; RENGIFO, S. V.; CARABANO, T. G.; IGLESIAS, H. V.; LLABRES, X. R. “Estetica y cultura: patologia bucal asociada a ciertas modas “actuales” (tatuajes, perforaciones bucales, etc.)”. **Medicina Oral**, Madrid, v. 8, n. 3, p. 197–206, 2003.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Fundamentos de metodologia científica**. 7. ed. São Paulo: Atlas, 2010.

LEVIN, L.; ZADIK, Y.; BECKER, T. Oral and dental complications of intra-oral piercing. **Dental traumatology**, Copenhagen, v. 21, n. 6, p. 341–343, 2005.

LIMA, I. C. A. A moda do “piercing” pode ser perigosa. **Jornal da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v. 35, n. 522, p. 37-8, 2000.

MAIBAUM, W.; MARGHERITA, A. Tongue piercing: a concern for the dentist. **General dentistry**, Chicago, v. 45, n. 5, p. 495-7, 1997.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v. 62, n. 1, p. 71-109, 1998.

MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society of Microbiology News**, Washington, v. 58, n. 4, p. 202-207, 1992.

MELO, A. R.; ABREU, T. C.; BARBOSA, L. M.; ARAÚJO, G. M.; VASCONCELOS, B. C. E. **Revista de cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial**, Recife, v.13, n.1, p. 83-88, 2013.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRURN, J. O. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of hygiene**, London, v. 38, n. 6, p. 732-49, 1938.

NAUNTOFTE, B.; TENOVUO, J. O.; LAGERLOF, F. Secreção e composição da saliva. In: FEJERSKOV, O; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 1. ed. São Paulo: Santos, 2005. p. 7-27.

PANAGAKOS, F. S.; LINFANTE, J.; PASCUZZI, J. N. Attachment loss associated with the presence of a tongue bar: a case report. **General dentistry**, Chicago, v. 48, n. 4, p. 454-6, 2000.

PANCONESI, E. Body piercing: psychosocial and dermatologic aspects. **Clinics in dermatology**, Philadelphia, v. 25, n. 4, p. 412-6, 2007.

PATUSSI, C.; SASSI, L. M.; DA SILVA, W. P.; ZAVAREZ, L. B.; SCHUSSEL, J. L. Oral Pyogenic Granuloma after Tongue Piercing Use: Case Report. **Dentistry**, v. 4, n. 5, p. 229, 2014.

PAUL, K.; PATEL, S. Eikenella corrodens infections in children and adolescents: Case reports and review of the literature. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 33, n. 1, p. 54-61, 2001.

PÉCORA, G. A.; REYES, A.; PEDRON, I. G.; UTUMI, E. R.; BORSATTI, M. A. Complicações decorrentes da utilização do piercing bucal - Avaliação e conduta clínica. **Odonto**, Brasil, v. 18, n. 36, p. 51-7, 2010.

PETICOLAS, T.; TILLISS, T.S.; CROSS-POLINE, G. N. Oral and perioral piercing: a unique form of self-expression. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, New Delhi, v. 1, n. 3, p. 30–46, 2000.

PIRES, I. L. O.; COTA, L. O. M.; OLIVEIRA, A. C. B.; COSTA, J. E.; COSTA, F. O. Association between periodontal condition and use of tongue piercing: a case–control study. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 37, n. 8, p. 712–718, 2010.

PLESSAS, A.; PEPELASSI, E. Dental and periodontal complications of lip and tongue piercing: prevalence and influencing factors. **Australian Dental Journal**, Sydney, v. 57, p. 71–78, 2012.

ROGERO, S.O.; HIGA, O. Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.14, n.6, p.497-504, 2000.

ROSIVACK, R. G.; KAO, J. Y. Prolonged bleeding following tongue piercing: a case report and review of complications. **Journal of clinical pediatric dentistry**, Birmingham, v. 25, n. 2, p. 154-6, 2003.

SANTO, E. A. R.; SANTOS, G. F. L.; CONCEIÇÃO, G. J.; PONTES, M. R. J.; ISRAEL, S. M.; RAMOS, B. E. M. Piercing oral: fator de risco para o câncer? **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 6, n. 2, p. 233-9, 2007.

SANTOS, S. F. S.; JORGE, A. O. C. Biofilme dentário. In: JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**. 3. ed. São Paulo: Santos, 2007, p. 53-70.

SESSO, A. Fixação de sistemas biológicos. In: HADDAD, A. et al. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. p. 1-24.

SHACHAM, R.; ZAGURI, A.; LIBRUS, H. Z.; BAR, T.; ELIAV, E.; NAHLIELI, O.

Tongue piercing and its adverse effects. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics**, St. Louis, v. 95, n. 3, p. 274–6, 2003.

SOUZA, T. M. P. A. **Aderência in vitro de Streptococcus mutans à superfície de dois tipos de braquetes ortodônticos**. 2011. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

STEAD, L. R.; WILLIAMS, J. V.; WILLIAMS, A. C.; ROBINSON, C. M. An investigation into the practice of tongue piercing in the South West of England. **British dental journal**, Londres, v. 200, n. 2, p. 103-7, 2006.

STEIN, T.; JORDAN, J. D. Health considerations for oral piercing and the policies that influence them. **Texas Dental Journal**, Dallas, v. 129, n. 7, p. 687-93, 2012.

TEN CATE, J. M.; KLIS, F. M.; PEREIRA-CENCI, T.; CRIELAARD, W.; GROOT, P. W. Molecular and cellular mechanisms that lead to Candida biofilm formation. **Journal of dental research**, Washington, v. 88, n. 2, p. 105-15, 2009.

THEODOSSY, T. A complication as tongue piecing: a case report and review of the literature. **British dental journal**, London, v. 194, n. 10, p. 551-2, 2003.

THOMÉ, T. **Análise in vitro do efeito do monômero antibacteriano MDPB sobre a adesão bacteriana à resina composta**. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

UPPAL, R. S.; KAPUR, S.; KAUR, J.; SINGH, A.; KAPUR, G. Oral Piercing: A Deleterious Vogue. **International Journal of Contemporary Dentistry**, New Delhi, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2012.

VENTÄ, I.; LAKOMA, A.; HAAHTELA, S.; PELTOLA, J.; YLIPAAVELNIEMI, P.; TURTOLO, L. Oral piercing among first-year university students. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics**, St. Louis, v. 99, n. 5, p. 546–549, 2005.

WILKINS, J. C.; BEIGHTON, D.; HOMER, K. A. Effect of Acidic pH on Expression of Surface-Associated Proteins of *Streptococcus oralis*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5290–5296, 2003.

ZIEBOLZ, D.; HILDEBRAND, A.; PROFF, P.; RINKE, S.; HORNECKER, E.; MAUSBERG, R. F. Long-term effects of tongue piercing — a case control study. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 231-7, 2012.

ZIEBOLZ, D.; HORNECKER, E.; MAUSBERG, R. F. Microbiological findings at tongue piercing sites: Implications to oral health. **International journal of dental hygiene**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 256–62, 2009.

ZIJNGUE, V.; VAN LEEUWEN, M. B. M.; DEGENER, J. E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMÜR, R.; HARMSSEN, H. J. M. Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 2, p. 1-9, 2010.