

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração em Ortodontia

Alinne Ulbrich Mores Rymovicz, DDS, MSc candidate



Modulação da virulência de biofilmes de *Streptococcus mutans* por íons metálicos liberados de aparelhos ortodônticos

Curitiba, 2011

Alinne Ulbrich Mores Rymovicz, DDS, MSc candidate

Modulação da virulência de biofilmes de *Streptococcus mutans* por íons metálicos liberados de aparelhos ortodônticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientador:

Prof. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, BPharm, MSc, PhD.

Curitiba, fevereiro de 2011

*“Bem aventurado o homem que encontra sabedoria,
e o homem que adquire o conhecimento,
pois são mais proveitosos do que a prata,
e dão mais lucro do que o ouro.”*

Provérbios 3:13-14

DEDICO ESTE TRABALHO...

... a DEUS

Porque Ele é tudo em minha vida, eu não seria nada se não fosse a presença constante e o amor incondicional do Senhor. Se eu cheguei até aqui foi porque Deus permitiu, porque em Cristo Jesus eu sou mais que vencedora. Obrigada Senhor, a Ti o meu amor e eterna gratidão.

... ao MEU ESPOSO PAULO

Que com todo seu amor, carinho e compreensão soube aceitar as minhas decisões, esteve sempre ao meu lado, sendo a minha fortaleza. Você sem dúvidas nenhuma é parte fundamental disso tudo, eu não suportaria com tanta facilidade se não fosse o seu amor. Você é a calma das minhas tempestades, o meu porto seguro, aquele que me levanta, que me anima, que faz meus dias mais leves. Obrigada meu amor eu te amo muito.

...aos MEUS PAIS DIRCEU E LUCIMARI

Por toda dedicação e amor ao longo desses anos, por sempre acreditarem em mim, obrigada por seus esforços e orações, por todo exemplo de caráter, humildade e honestidade. Eu reconheço todos os seus sacrifícios em garantirem os meus estudos, se eu cheguei até aqui foi pelos seus investimentos e por acreditarem que eu conseguiria. Os seus incentivos foram o meu impulso para não desistir. Essa vitória também é de vocês. Recebam os meus mais sinceros agradecimentos. Pai, Mãe, eu amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa**

Pelos seus ensinamentos, companheirismo, dedicação e confiança. Sou imensamente grata não somente pelo professor e orientador, mas pelo grande amigo que és. Sinto-me presenteada por Deus em ser orientada sua. Ser sua aluna para mim é uma honra, um enorme privilégio. Certamente eu não seria o que sou hoje se você não tivesse acreditado em mim. As minhas grandes conquistas têm muito de você. Caminhando contigo, confirmei o desejo de ser professora e mais que isso, despertou-me o gosto pela pesquisa e o encantamento pelo laboratório. Vejo em você o exemplo do ser mestre. Obrigada por todo investimento e por ter acreditado no meu potencial. O meu muitíssimo obrigado.

À **Maiara Medeiros Ronsani**

Pela sua amizade, companheirismo e parceria durante todas as fases deste trabalho. Foi bom dividir esse dois anos com você, seja no laboratório ou fora dele.

À minhas irmãs **Thagiane e Tayrini**

Por todas as vezes que com poucas e pequenas palavras, ou mesmo em simples gestos me incentivaram e que mesmo de longe sempre torceram por mim. Amo vocês.

Ao **Pastor. Eliandro** e a **Carla**

Amigos de todas as horas. Obrigada por compartilharem os momentos da minha vida profissional e pessoal, por vibrarem comigo as minhas vitórias. Obrigada pelas palavras de ânimo e acima de tudo por orarem e intercederem por mim.

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Paraná** que através da bolsa Marcelino Champanhat permitiu continuar meus estudos e realizar este Mestrado.

À **Fundação Araucária** por ter acreditado neste projeto e financiado os meus dois anos de curso.

Ao **Prof. Odilon Guariza Filho** por conduzir nossos aprendizados com alegria e entusiasmos. Por estar sempre disposto a nos ensinar e por acreditar em nossa capacidade Obrigada pela sua amizade, carinho e paciência.

Ao **Prof. Hiroshi Maruo** pela sua competência, pelo compartilhar de experiências e por transmitir o conhecimento ortodôntico com excelência.

À **Prof. Elisa Souza Camargo** pelo carinho e amizade, por nos mostrar que os detalhes fazem a diferença e por ensinar que perfeição e ortodontia são duas palavras que caminham juntas.

Ao **Prof. Orlando M. Tanaka** por toda a sua dedicação e empenho em fazer a O.R.T.O.D.O.N.T.I.A da PUCPR um curso de excelência, obrigada pela sua exigência, cobranças e ensinamentos.

Ao **Prof. José Vinícius Bolognese Maciel** por ter contribuído com a nossa formação, pelas conversas descontraídas e pela disposição em nos ensinar.

Ao **Prof. Sérgio Aparecido Ignácio** pelo seu carinho, rapidez e prontidão junto as análises estatísticas.

À **Rosimeire Takaki Rosa** obrigada pelo companheirismo, ensino, colaboração, paciência e amizade durante todos esses anos. Nossas conversas descontraíram as minhas tardes e suas ensinamentos engrandeceram os meus conhecimentos.

À **Prof. Patricia Maria Stuelp Campelo** pela imensa ajuda, instrução e conselhos durante cada fase experimental.

À **Prof. Selene Elíbio Esposito** pela presteza e matérias cedidos para a elaboração deste projeto.

Ao **Prof. Luiz Fernando Pereira** pelas dicas e atenção dispensada.

Aos meus colegas de turma **Ana Leticia Rocha Avila, Cristina Hepp, Denise Odete Manarelli, Dolores Fátima Campos Navarro, Gabriela Pinto Molina da Silva, Ismael Signori, Lilian Mary Karakida, Maria Cecilia Galacini Añez, Thiago Martins Meira** por ter compartilhado cada segundo de cada minuto desses intensos dois anos. Vocês são especiais.

À **Neide Reis Borges** pela competência e prontidão em nos atender.

À **Maria Nilce da Silva Reis** pela disposição em nos servir e por compartilhar dos momentos de clínica e fazê-los mais animados.

Aos **funcionários da Clínica da PUCPR**, ao pessoal da secretária pelas inúmeras vezes que nos ajudaram e as meninas da limpeza, em especial a Dona Arlinda, Vanda e a Rosângela por compartilhar o final das manhãs de quarta-feira na clínica. Obrigada a todos pelo bom humor pelos corredores.

A **Inês Santos** pela amizade, conselhos, por fazer parte da minha vida, por torcer e vibrar comigo as minhas vitórias. Obrigada Dada.

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS
RESUMO	1
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	4
RESULTADOS	8
DISCUSSÃO	11
CONCLUSÕES	15
REFERÊNCIAS	15
TABELAS	19
FÍGURA 1	20
FÍGURA 2	21
FÍGURA 3	22
2. ARTIGO EM INGLÊS	23
3. ANEXOS	43
ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	44
ANEXO II – TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	45
ANEXO III – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS (AJODO).....	47

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS

**MODULAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE BIOFILMES DE *Streptococcus mutans*
POR ÍONS METÁLICOS LIBERADOS DE APARELHOS ORTODÔNTICOS**

1 RESUMO

2 **Introdução:** Íons metálicos são continuamente liberados a partir de ligas
3 metálicas de aparelhos ortodônticos fixos. A modulação de virulência de
4 biofilmes de *Streptococcus mutans* por íons metálicos oriundos de aparelhos
5 ortodônticos ainda é incerta. Este estudo avaliou a modulação de virulência de
6 biofilmes de *S. mutans* ATCC®25175™ por alguns íons metálicos comumente
7 esfoliados de aparelhos ortodônticos. **Métodos:** A cepa foi crescida na
8 presença de íons metálicos Ni^{+2} 10 ng.mL⁻¹, Fe^{+3} 6,77 ng.mL⁻¹, Cr^{+3} 4,5 ng.mL⁻¹,
9 Co^{+2} 0,44 ng.mL⁻¹ e na mistura de todos, em suas respectivas concentrações,
10 bem como na ausência deles. Poços de placas de microtitulação foram
11 condicionados com saliva e receberam células bacterianas que sofreram
12 adesão. Os biofilmes foram formados por 72 h na presença e na ausência dos
13 íons metálicos e desafiados por até 12 h com glucose 5%. **Resultados:** Os
14 íons interferiram no desempenho fisiológico de *S. mutans* reduzindo sua
15 biomassa (Ni^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3}), elevando as taxas de metabolismo do açúcar (Ni^{+2} ,
16 Fe^{+3} , Cr^{+3}) e de secreção de lactato (Ni^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} e mistura). **Conclusão:** os
17 íons metálicos testados se mostraram capazes de interferir na virulência do *S.*
18 *mutans* e devem ser levados em consideração quando da avaliação do risco de
19 cárie em pacientes sob terapia ortodôntica.

20

21 **Palavras-chave:** *Streptococcus mutans*, Aparelho ortodôntico, Íons metálicos,
22 Virulência.

23

1 INTRODUÇÃO

2 Devido as suas propriedades mecânicas, as estruturas dos aparelhos
3 ortodônticos fixos como bráquetes, arcos e bandas são feitas com ligas
4 metálicas, como o aço inoxidável, liga de cobalto-cromo-níquel (CoCrNi), liga
5 de níquel-titânio (NiTi), liga de β -titânio (β -Ti) e titânio puro (Iijima *et al.*, 2006).

6 Uma vez na boca, os aparelhos ortodônticos metálicos se tornam
7 passíveis de sofrer corrosão em função de estresse dinâmico (Kerosuo *et al.*,
8 1995), por fadiga (Eliades & Athanasiou, 2002) e de ácidos provenientes da
9 dieta ou da fermentação láctica pela microbiota adjacente. Essa esfoliação leva
10 a um aumento na concentração salivar de íons metálicos (Gürsoy *et al.*, 2004;
11 Amini *et al.*, 2008) e, a exposição continuada dos microrganismos orais a eles
12 certamente deve refletir em algum nível de alteração fisiológica nessas
13 entidades. O *Streptococcus mutans*, uma das bactérias mais acidogênicas da
14 microbiota bucal, é um organismo cuja fisiologia é sabidamente afetada por
15 íons metálicos como Zn^{+2} (He *et al.*, 2002), Al^{+3} (Sturr & Marquis, 1990), Mn^{+2}
16 (Arirachakaran *et al.*, 2007) e Fe^{+2} (Evans *et al.*, 1986). Além disso, o *S.*
17 *mutans* produz matriz extrapolimérica rica em glucanos que retém
18 cumulativamente íons metálicos até concentrações excessivamente maiores no
19 interior da placa que no ambiente ao redor (Chen *et al.*, 2006).

20 Já se investigou se metais ionizados provenientes da água interferem no
21 crescimento de *S. mutans* (Aranha *et al.*, 1982); contudo, muito pouco foi
22 investigado acerca de interferência na fisiologia dessa espécie por íons
23 oriundos de aparelhos ortodônticos. Dentre esses escassos estudos, se
24 destacam (1) a investigação do efeito inibitório intrínseco dos aparelhos

1 (Grimsdottir & Henstett-Pettersen, 1993) e (2) a quantificação de Ni⁺² em placa
2 dental de pacientes ortodônticos (Fors & Persson, 2006).

3 Apesar de se saber que íons metálicos são continuamente liberados
4 para a cavidade bucal de pacientes sob terapia ortodôntica, a modulação da
5 virulência da microbiota cariogênica associada ainda é desconhecida. Diante
6 do exposto, estudos que testem as hipóteses de que íons metálicos oriundos
7 de acessórios ortodônticos podem interferir favorecendo ou dificultando o
8 desenvolvimento de cáries são pertinentes.

9

10 **OBJETIVOS**

11 **OBJETIVO GERAL**

12 Avaliar *in vitro* a modulação de virulência de biofilmes de *S. mutans*
13 ATCC[®]25175[™] dos principais íons metálicos níquel, ferro, cromo e cobalto
14 comumente esfoliados de aparelhos ortodônticos.

15 **OBJETIVO ESPECÍFICO**

- 16 1. Avaliar se ocorrem diferenças na formação de biofilmes de
17 *Streptococcus mutans* na presença do níquel, ferro, cromo, cobalto
18 e/ou na mistura de todos os íons.
- 19 2. Avaliar se ocorrem diferenças no metabolismo de glucose em
20 biofilmes de *Streptococcus mutans* crescidos na presença de
21 diferentes íons, por 72 h.
- 22 3. Avaliar se ocorrem diferenças na produção de ácido láctico por
23 biofilmes de *Streptococcus mutans* crescidos na presença de
24 diferentes íons, por 72 h.

1 MATERIAL E MÉTODOS

2 **Microrganismo**

3 A cepa-tipo *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ foi crescida
4 aerobicamente em 50 mL de infuso de cérebro e coração (BHI) (Difco
5 Laboratories, Inc.) a 37 °C, em agitação de 100 rpm e pCO₂ 10%. Após 24 h,
6 as células foram centrifugadas e lavadas com NaCl 145 mM estéril. As células
7 foram ressuspensas em NaCl 145 mM até uma OD₆₆₀ de 1,00.

8 **Preparo das soluções de íons metálicos**

9 Diferentes íons metálicos foram preparados de acordo com as
10 concentrações em saliva de usuários de aparelhos ortodônticos (Gürsoy *et al.*,
11 2004; Amini *et al.*, 2008). Os íons elencados e suas respectivas concentrações
12 foram níquel divalente (Ni⁺²) 10 ng•mL⁻¹ (170 nM), ferro trivalente (Fe⁺³) 6,77
13 ng•mL⁻¹ (121 nM), cromo trivalente (Cr⁺³) 4,5 ng•mL⁻¹ (86,5 nM) e cobalto
14 divalente (Co⁺²) 0,44 ng•mL⁻¹ (7,46 nM). A bactéria foi também desafiada com
15 mistura dos íons (Mix) que foram dissolvidos em um mesmo solvente nas
16 concentrações acima. O solvente empregado para a confecção dos meios de
17 cultura e soluções foi a água reagente tipo II com resistividade específica maior
18 que 2 Mohm•cm⁻¹ (ASTM, 1991; NCCLS, 1997). Em função de suas maiores
19 solubilidades, foram utilizados nitratos metálicos de alto grau de pureza (Merck
20 Chemicals SA). O controle negativo continha meio de cultura sem a adição de
21 qualquer íon metálico.

22 Foram preparados caldos BHI contendo os íons metálicos
23 separadamente e em conjunto (50 mL). Esses caldos receberam alíquotas de
24 200 µL de suspensão padronizada de *S. mutans* ATCC®25175™ e foram
25 incubados a 37 °C, em agitação de 100 rpm e pCO₂ 10 %. Esse passo serve

1 para que as células se adaptem à presença dos íons metálicos. Após 24 h, as
2 células foram centrifugadas e lavadas com NaCl 145 mM estéril. As células
3 foram ressuspensas em NaCl 145 mM até uma OD₆₆₀ de 1,00.

4 **Coleta de saliva estimulada**

5 Alíquotas de 10 mL de saliva total estimulada foram coletadas de três
6 doadores voluntários saudáveis, com idades variando de 20 a 45 anos, que
7 não estavam em terapia medicamentosa e que também não estavam em
8 tratamento ortodôntico, além de não possuírem restaurações de amálgama
9 e/ou próteses dentais metálicas. A participação dos doadores foi condicionada
10 à assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido, em
11 concordância com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos
12 da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Protocolo 5410; Parecer
13 3588/09) (Anexo 1).

14 Esses doadores foram orientados a não se alimentar ou escovar os
15 dentes por pelo menos duas horas antes do período de coleta. As coletas se
16 deram pela mastigação de tubo de silicone esterilizado em autoclave. Essas
17 alíquotas foram misturadas para que a película fosse composta por um maior
18 número de receptores e para garantir uma formação mais uniforme (Gibbons *et*
19 *al.*, 1986). Logo após a coleta, a amostra foi resfriada em gelo e purificada por
20 centrifugação (10000 × *g*, 4 °C, 20 min) e imediatamente usada.

21 **Formação de biofilme**

22 Os biofilmes foram formados segundo protocolo de Oliveira *et al.* (2007)
23 utilizando placas de cultura celular de poliestireno com vinte quatro poços
24 (TPP, Trasadingen, Suíça). Primeiramente, uma quantidade de 100 µL de
25 saliva clarificada foi transferida para cada um dos poços da placa que foi

1 incubada aerobicamente por 2 h, a 37 °C, para formação da película adquirida.
2 As placas foram lavadas duas vezes com NaCl 145 mM estéril, para remover a
3 saliva que não formou película. Alíquotas de 1 mL da suspensão celular
4 padronizada ($OD_{660} = 1,00$) foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37
5 °C, em 100 rpm e pCO_2 10%, por 2 h, afim de que as células viessem a aderir
6 na superfície dos poços. Após essa fase de aderência, as suspensões
7 celulares foram aspiradas e cada poço foi lavado duas vezes com solução
8 NaCl 145 mM estéril para remover células não aderidas ou fracamente
9 aderidas. Alíquotas de 1 mL de BHI contendo os íons metálicos ou sem
10 qualquer íon (controle) foram adicionados aos poços e incubados em agitação
11 a 37 °C e pCO_2 10%, por 72 h. Os meios de cultura foram trocados a cada 24 h
12 por aspiração e repostos com alíquotas estéreis. Finalmente, o experimento foi
13 submetido aos testes de quantificação do biofilme pela retenção diferencial de
14 cristal violeta, metabolismo de glucose e produção de ácido láctico, com testes
15 enzimáticos específicos.

16 **Quantificação das biomassas dos biofilmes**

17 A quantificação do biofilme foi realizada pelo método de retenção de
18 cristal violeta (Peeters *et al.*, 2008). As células crescidas nos biofilmes de 72 h
19 foram fixadas com 1 mL de metanol 99% (Merck GmbH, Darmstadt,
20 Alemanha), por 15 min. Os sobrenadantes foram removidos e as placas foram
21 secas com ar. Alíquotas de 1 mL de cristal violeta 0,5% (CV) (Isofar Ltd., Rio de
22 Janeiro, Brasil) foram adicionadas aos poços. Após 20 min, o excesso de CV
23 foi removido pela lavagem com água destilada abundante. Finalmente, o CV
24 impregnado foi liberado pela adição de 1 mL de ácido acético 33% (Merck
25 GmbH, Darmstadt, Alemanha), por 20 min; alíquotas de 200 μ L de cada

1 sobrenadante foram transferidas para placa de leitura de 96 poços (TPP,
2 Trasadingen, Suíça). As biomassas de biofilme foram estimadas em função da
3 retenção de cristal violeta. A absorbância do CV foi mensurada usando uma
4 leitora de microplacas TP-Reader[®] (Thermo Plate, BR), com comprimento de
5 onda de 590 nm.

6 **Quantificação da taxa glicolítica**

7 A taxa de consumo de glucose foi determinada com células de biofilme
8 intacto. Após o crescimento por 72 h, cada poço foi lavado duas vezes com
9 NaCl 145 mM estéril. Em seguida, os poços receberam 1 mL de caldo de
10 incubação (CI) contendo glucose 5 mg•mL⁻¹ (27,77 mmoles•L⁻¹) e foram
11 incubados a 37 °C, pCO₂ 10% e 90 rpm, por 6 e 12 h. Alíquotas de 10 µL foram
12 recolhidas e misturadas com 1 mL de reagente enzimático contendo glucose-
13 oxidase (Lott & Turner, 1975). Os passos analíticos subsequentes foram
14 realizados segundo as recomendações do fabricante (Laborlab Inc., São Paulo,
15 Brazil). Os valores, expressos em mg•dL⁻¹, foram convertidos em mmoles•L⁻¹ e
16 subtraídos de 27,77 mmoles•L⁻¹ para se obter para se obter a taxa de glucose
17 consumida. Os valores assim obtidos foram divididos pelo tempo (min) e,
18 subsequentemente, pelas absorbâncias da quantificação de biomassa para se
19 obter as taxas metabólicas, expressas como (µmol•L⁻¹)•min⁻¹•biomassa⁻¹.

20 **Quantificação da taxa de produção de lactato**

21 Foram utilizados os excedentes do CI do teste anterior com biofilme
22 intacto. Alíquotas de 2 µL das amostras foram recolhidas e misturadas com 200
23 µL de reagente enzimático contendo lactato-oxidase (Fossati *et al.*, 1980). Os
24 passos analíticos subsequentes foram realizados segundo as recomendações
25 do fabricante (Biotécnica Inc., Minas Gerais, Brazil). Os valores, expressos em

1 mg•dL⁻¹, foram convertidos em mmoles•L⁻¹ e divididos pelo tempo (min).
2 Subsequentemente, foram divididos pelas absorvâncias da quantificação de
3 biomassa para se obter as taxas de secreção de lactato, expressas como
4 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)•min⁻¹•biomassa⁻¹.

5 **ESTATÍSTICA**

6 Os experimentos foram conduzidos em sextuplicata, em quatro
7 momentos distintos. Todos os dados foram avaliados em relação à
8 homogeneidade das varianças pelo Teste de Levene e analisados pelo teste de
9 Games-Howell com pacote estatístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). O
10 valor $p < 0,05$ foi assumido como o ponto limítrofe para estabelecimento de
11 diferenças.

12

13 **RESULTADOS**

14 **Quantificação das biomassas dos biofilmes**

15 As biomassas dos biofilmes de 72 h crescidos na presença/ausência de
16 íons metálicos foram estimadas após desafios com glucose 5% por 6 e 12 h,
17 conforme mostrado na tabela 1. Após 6 h de desafio, incrementos na biomassa
18 somente foram obtidos com adição de Fe⁺³ aos caldos ($p \leq 0.049$). As
19 biomassas obtidas com Ni⁺², Cr⁺³, Co⁺² e mistura de íons apresentaram médias
20 com ligeiras oscilações, mas sem significância estatística em relação ao
21 controle ($p \geq 0,506$).

22 Quando os desafios se prolongaram por 12 h, a biomassa média do
23 controle apresentou absorvância de $1,685 \pm 0,326$. Reduções estatisticamente
24 suportadas ($p \leq 0,015$) nas biomassas foram obtidas em biofilmes crescidos na
25 presença de Ni⁺² ($1,048 \pm 0,326$), Fe⁺³ ($1,414 \pm 0,470$) e Cr⁺³ ($1,302 \pm 0,494$). A

1 mistura de íons ($1,676 \pm 0,339$) e o Co^{+2} ($1,774 \pm 0,355$) promoveram formação
2 de biofilmes com biomassas próximas às do controle ($p \geq 0,419$).

3 É perceptível que os valores de biomassa para tratamentos com Ni^{+2} ,
4 Fe^{+3} e Cr^{+3} sofreram reduções com desafios de glucose por 12 h, em
5 comparação aos seus valores para desafios por 6 h. Esse fato, no mínimo
6 curioso, a princípio, causou-nos certa apreensão; contudo, foram
7 desconsideradas possibilidades de erro metodológico e a hipótese mais
8 plausível é de que, com a queda de pH mais acentuada no decorrer das 12 h,
9 os íons se tornaram tóxicos para parte do conteúdo celular, incorrendo em
10 redução da viabilidade celular. Tal hipótese deve ser futuramente testada, a fim
11 de se comprovar ou refutar sua possibilidade de ocorrência.

12 **Quantificação da taxa metabólica**

13 As taxas metabólicas foram determinadas em função da quantidade de
14 glucose consumida pela quantidade de biomassa formada na
15 presença/ausência dos íons metálicos em desafios com glucose 5%, por 6 h e
16 12 h (Tabela 2). No desafio por 6 h, nenhum grupo experimental apresentou
17 resultados diferentes daqueles do controle ($p \geq 0,657$), i.e., a presença ou a
18 ausência do metal não é fator determinante para alterações metabólicas de
19 maior magnitude. Por outro lado, após 12 h de desafio com glucose, os
20 biofilmes apresentaram incrementos na taxa metabólica quando Ni^{+2} , Fe^{+3} e
21 Cr^{+3} estavam presentes ($p \leq 0,033$).

22 **Quantificação da taxa de produção de lactato**

23 Embora houvesse variações significativas entre os resultados dos íons
24 (e.g. Fe^{+3} vs demais íons), em desafios prolongados por 6 h, essas produções
25 de lactato não foram diferentes do controle ($p \geq 0,065$). Por outro lado, a

1 secreção de lactato após 12 h de desafio com glucose foi aumentada quando
2 na presença de Ni^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} e mistura de íons ($p \leq 0,046$; tabela 3).

3 **Estequiometria**

4 A figura 1 apresenta a distribuição espacial de médias de consumo de
5 glucose ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) vs secreção de lactato ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Esse escatergrama foi
6 construído na tentativa de se estabelecer a influência dos íons metálicos nas
7 relações entre o uso de glucose e consequente secreção de ácido fixo.
8 Contudo, pode-se observar que a dispersão das médias não gerou
9 concentrações tipo-nuvem para um dado íon ou para duração de desafio (6 h e
10 12 h).

11 Análises de correlação usando o coeficiente de Pearson (r_P) revelaram
12 que após 6 h de desafio com glucose, o controle apresentou fraca correlação
13 negativa não significativa ($r_P = -0,157$; $p > 0,05$). A mistura de íons também
14 promoveu fraca correlação negativa ($r_P = -0,024$; $p > 0,05$). Fortes correlações
15 positivas foram obtidas para Ni^{+2} ($r_P = 0,777$; $p < 0,05$) e Fe^{+3} ($r_P = 0,742$; $p <$
16 $0,05$). Após 12 h de desafio, os coeficientes se mostraram positivos para todos
17 os grupos, exceto para mistura de íons ($r_P = -0,111$; $p > 0,05$). Digno de
18 destaque foi o Ni^{+2} , que apresentou forte correlação positiva ($r_P = 0,833$; $p <$
19 $0,05$).

20 Para se determinar a influência dos íons metálicos na eficiência de
21 conversão de glucose em lactato, optou-se por considerar a equação
22 simplificada da fermentação homoláctica ($1 \text{ glucose} \rightarrow 2 \text{ lactato}$), sem qualquer
23 outro desvio metabólico (*e.g.* fermentação heteroláctica). Os valores de
24 concentração de lactato (em $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram divididos por dois para se obter a
25 quantidade de glucose convertida em lactato. Os quocientes obtidos foram

1 multiplicados por cem e divididos pela concentração de glucose consumida
2 total. Esses segundos quocientes foram novamente multiplicados por cem e
3 divididos pelos valores médios dos controles, para cada tempo de desafio.
4 Dessa maneira, os valores dos controles foram arbitrariamente considerados
5 como sendo 100%. A partir desse limiar, as percentagens de conversão de
6 glucose em lactato pelos biofilmes sob diferentes tratamentos foram
7 recalculadas (Figura 2). Os resultados para desafio por 6 h mostram que
8 somente o Fe^{+3} foi capaz de elevar a taxa de conversão acima do valor da
9 média do controle (32,83% de incremento). Os demais íons promoveram
10 reduções na conversão da ordem de 52,69% (Ni^{+2}), 66,85% (Cr^{+3}), 66,77%
11 (Co^{+2}) e 26,20% (mix). Por outro lado, o prolongamento dos desafios por 12 h
12 resultou em incrementos na conversão muito superiores ao controle, variando
13 de 351,47% (mix) a 1064,01% (Ni^{+2}). A exceção foi o Co^{+2} , que mostrou
14 redução de 3,35%.

15

16 **DISCUSSÃO**

17 Em termos metodológicos, uma questão que pode ser levantada é
18 acerca do desafio continuado dos biofilmes por até 12 h, o que pode parecer
19 demasiado longo. Contudo, nosso grupo optou pela manutenção desse tempo
20 de desafio, visto que é comum pais e pacientes reportarem consumo de açúcar
21 ao longo do período de vigília, mesmo que em várias tomadas diárias. Ainda, a
22 opção por avaliar os fenômenos aqui estudados em biofilmes de 72 h se baseia
23 na observação clínica de que alguns pacientes não são colaborativos e
24 conduzem uma higienização oral muito aquém daquela esperada.

1 Os resultados aqui reportados mostraram que quando comparados ao
2 controle, alguns íons metálicos, caso do Fe^{+3} e do Cr^{+3} , aumentaram a
3 biomassa durante as primeiras horas de desafio com glucose. Porém, esses
4 mesmos íons não garantem a manutenção do fenômeno quando do
5 prolongamento do desafio. É possível que tais íons atuem durante a nova fase
6 *lag* de crescimento dos biofilmes de 72 h, decorrente da adição de glucose,
7 promovendo seu encurtamento. A figura 3 ilustra graficamente tal possibilidade.
8 Contudo, como o *S. mutans* não dispõe de catalase para detoxificar espécies
9 reativas de oxigênio (ROS), é possível que os íons trivalentes tenham sofrido
10 redução para Fe^{+2} e Cr^{+2} , em função da acidez do biofilme e da baixa
11 disponibilidade de oxigênio molecular (Marquis, 1995) e, esses íons, uma vez
12 internalizados pelas células bacterianas tenham passado a catalisar a reação
13 de Fenton com subsequente produção de radical hidroxila, um forte agente
14 oxidante que compromete as funções celulares. Sob a óptica populacional, as
15 células das camadas externas dos biofilmes e, em menor quantidade, as
16 internas, devem ter morrido, o que implicou em menor detecção de biomassa
17 após 12 h de desafio.

18 Em se partindo da premissa de que a hipótese acima proposta seja
19 verdadeira, era esperado que a mistura de íons também induzisse um
20 comportamento populacional com incremento de biomassa nas primeiras seis
21 horas de desafio, seguido de redução com o prolongamento até 12 h de
22 incubação. Na verdade, o que se verificou foi uma elevação na biomassa após
23 12 h, induzida pela mistura de íons. Embora o Ni^{+2} , o Cr^{+3} e o Fe^{+3} tenham
24 causado redução na biomassa final, o Co^{+2} , que aumentou a biomassa durante
25 o intervalo da 6^a e da 12^a hora de desafio com glucose, pode ter

1 contrabalanceado a perda celular induzida pelos demais íons, resultando em
2 manutenção da biomassa de biofilme formado sob influência da mistura de
3 íons.

4 A avaliação dos íons metálicos de forma independente revelou que
5 alguns deles exerceram influência no metabolismo da glucose aumentando seu
6 consumo quando o desafio se prolongou por 12 h. Contudo, a estequiometria
7 do consumo de glucose e da produção de lactato indica que o consumo da
8 hexose não foi totalmente dirigido para fins energéticos, como se poderia
9 supor. Três possibilidades para explicar o gasto de glucose são apontadas,
10 sendo que as três devem ter ocorrido simultaneamente. (i) Parte da glucose
11 pode ter sido convertida até piruvato e, a partir daí, ocorreu fermentação
12 homoláctica e, em menor proporção, heteroláctica; (ii) Como o *S. mutans* é
13 deficiente em α -cetoglutarato desidrogenase, o ciclo de Krebs se torna
14 incompleto (Cvitkovitch *et al.*, 1997) e parte do piruvato produzido pode ter sido
15 convertido em aminoácidos para formação de biomassa; (iii) As células da
16 bactéria secretaram glicosiltransferases (gtfs) de ação extracelular que
17 certamente transformaram a glucose circundante em matriz extrapolimérica
18 para formação dos biofilmes.

19 Existem indícios de que o *S. mutans* internalize somente a forma ferrosa
20 do ferro (Fe^{+2}) (Evans *et al.*, 1986), que pode ser formada no ambiente
21 anaeróbico e redutor do interior de biofilmes pela acessibilidade parcial do
22 oxigênio (de Beer *et al.*, 1994; Borriello *et al.*, 2004) ou pela ação de
23 substâncias redutoras provenientes do metabolismo da glucose, possivelmente
24 via flavoproteino-desidrogenases (Evans *et al.*, 1986). A forma reduzida Fe^{+2}
25 que se encontra na membrana pode agora ser internalizada nas células. Em

1 *Lactobacillus casei*, foi demonstrado que íons divalentes como Fe^{+2} e Ni^{+2}
2 podem atuar como ativadores da lactato desidrogenase, incrementando a
3 conversão de piruvato em lactato 1,78 e 2,34 vezes, respectivamente (Holland
4 & Pritchard, 1975). Os nossos resultados apontam para uma possibilidade de
5 concordância com esses indícios previamente publicados, o que pode explicar,
6 ao menos em parte, as elevações proporcionais observadas nas taxas de
7 secreção de lactato induzidas pelos íons (Figura 2). Contudo, há que se
8 considerar que tal efeito deve ser concentração-dependente, pois a exposição
9 do *S. mutans* a concentrações de ordem nanomolar de íons estimula o
10 crescimento e a atividade metabólica (Strachan *et al.*, 1982), o que está em
11 concordância com nossos resultados. Por outro lado, concentrações
12 micromolares ou superiores desses íons levam a diminuição desses
13 parâmetros (Aranha *et al.*, 1982; Pecharki *et al.*, 2005).

14 Sob a perspectiva clínica, os dados aqui apresentados apontam para
15 uma possibilidade de íons metálicos oriundos de aparelhos ortodônticos
16 incrementarem fatores de virulência muito importantes do *S. mutans* e que
17 estão diretamente associados à capacidade da bactéria em provocar cáries.
18 Tal achado é digno de atenção por parte do ortodontista na orientação ao
19 paciente da excelência da manutenção de sua higiene oral. Este estudo deve
20 servir como incentivador para a condução de outros subsequentes que
21 prospectem a modulação da virulência e da patogenicidade de bactérias
22 cariogênicas em uma população tão particular de pacientes que são aqueles
23 sob terapia ortodôntica.

CONCLUSÃO

Foi demonstrado que os íons metálicos aqui analisados em concentrações compatíveis com aquelas obtidas de pacientes sob intervenção ortodôntica podem interferir no desempenho fisiológico de *S. mutans* ao longo de 12 h de desafio com glucose reduzindo a biomassa (Ni^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3}), elevando as taxas de metabolismo do açúcar (Ni^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3}) e de secreção de lactato (Ni^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} e mix).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard specification for reagent water. Document D1193-91. Philadelphia, Pennsylvania: ASTM. 1991.
2. Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res.* 2008;1:51-56.
3. Aranha H, Strachan RC, Arceneaux JE, Byers BR. Effect of trace metals on growth of *Streptococcus mutans* in a teflon chemostat. *Infect Immun.* 1982;35:456-60.
4. Arirachakaran P, Luengpailin S, Banas JA, Mazurkiewicz JE, Benjavongkulchai E. Effects of manganese on *Streptococcus mutans* planktonic and biofilm growth. *Caries Res.* 2007;41:497-502.
5. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2659-64.
6. Chen PM, Chen JY, Chia JS. Differential regulation of *Streptococcus mutans* gtfBCD genes in response to copper ions. *Arch Microbiol.* 2006;185:127-35.

7. Cvitkovitch DG, Gutierrez JA, Bleiweis AS. Role of the citrate pathway in glutamate biosynthesis by *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 1997;179:650-655.
8. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. Biotechnol Bioeng. 1994;43:1131-1138.
9. Eliades T, Athanasiou AE. In vivo aging of orthodontic alloys: implications for corrosion potential, nickel release, and biocompatibility. Angle Orthod. 2002;72:222-237
10. Evans SL, Arceneaux JE, Byers BR, Martin ME, Aranha H. Ferrous iron transport in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 1986;168:1096-9.
11. Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances. Eur J Orthod. 2006;28: 292-297.
12. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3, 5-Dichloro- 2-hydroxybenzenesulfonic Acid/4-Aminophenazone Chromogenic System in Direct Enzymic Assay of Uric Acid in Serum and Urine. Clin Chem. 1980;26:227-231.
13. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DL. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. Infect Immun. 1986;52:555-561.
14. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A. Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. Scand J Dent Res. 1993;101:229-31.
15. Gürsoy S, Acar AG, Se_ en C. Comparison of metal release from new and recycled bracket-archwire combinations. Angle Orthod. 2004;75: 92-94.
16. He G, Pearce EI, Sissons CH. Inhibitory effect of ZnCl(2) on glycolysis in human oral microbes. Arch Oral Biol. 2002;47:117-29.

17. Holland R, Pritchard GG. Regulation of the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* by fructose-1,6-diphosphate and metal ions. J Bacteriol. 1975;121:777-84.
18. Iijima M, Endo K, Yuasa T, Ohno H, Hayashi K, Kakizaki M, Mizoguchi I. Galvanic corrosion behavior of orthodontic archwire alloys coupled to bracket alloys. Angle Orthod. 2006;76: 705-711.
19. Kerosuo H, Moe G, Kleven E. In vitro release of nickel and chromium from different types of simulated orthodontic appliances. Angle Orthod. 1995;65:111-116.
20. Lott JA, Turner K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. Clin Chem. 1975;21:1754-1760.
21. Marquis RE. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. J Ind Microbiol. 1995;15:198-207.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS. 1997.
23. Oliveira MR, Napimoga MH, Cogo K, Gonçalves RB, Macedo ML, Freire MG, Groppo FC. Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. J Oral Sci. 2007;49:141-145.
24. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. Caries Res. 2005;39:123-9.
25. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2008;72:157-165.
26. Strachan RC, Aranha H, Lodge JS, Arceneaux JE, Byers BR. Teflon chemostat for studies of trace metal metabolism in *Streptococcus mutans* and other bacteria. Appl Environ Microbiol. 1982;43:257-60.

27. Sturr MG, Marquis RE. Inhibition of proton-translocating ATPases of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* by fluoride and aluminum. Arch Microbiol. 1990;155:22-7.

TABELAS

Tabela 1. Biomassas de biofilmes de 72 h crescidos na presença/ausência de íons metálicos seguido de desafios com glucose 5% por 6h/12h.

Tempo de incubação	Biomassa [retenção CV (ΔDO_{540nm})] \pm dp					
	Controle	Ni ⁺² *	Fe ⁺³	Cr ⁺³ *	Co ⁺² *	Mistura *
6 h	1,488 \pm 0,295 ac	1,414 \pm 0,298 a	1,819 \pm 0,766 b	1,756 \pm 0,374 c	1,540 \pm 0,456 ac	1,420 \pm 0,380 a
12 h	1,685 \pm 0,326 A	1,048 \pm 0,326 B	1,414 \pm 0,470 C	1,302 \pm 0,494 C	1,774 \pm 0,355 A	1,676 \pm 0,339 A

* Diferenças de resultados em função do tempo de incubação (6 h/12 h) com glucose 5% (Games-Howell; $p < 0,05$). Letras diferentes após valores numéricos indicam diferenças estatísticas (Games-Howell; $p < 0,05$) entre diferentes tratamentos, para um mesmo tempo de desafio.

Tabela 2. Taxas de metabolismo de glucose por biofilmes de 72 h crescidos na presença/ausência de íons metálicos seguido de desafios com glucose 5% por 6h/12h.

Tempo de incubação	Taxa de metabolismo de glucose $\{[(\mu\text{mol.L}^{-1}).\text{min}^{-1}].\text{biomassa}^{-1}]\} \pm$ dp					
	Controle	Ni ⁺² *	Fe ⁺³	Cr ⁺³ *	Co ⁺²	Mistura
6 h	42,123 \pm 3,811 ab	43,396 \pm 7,315 a	34,293 \pm 12,481 b	35,587 \pm 10,223 b	40,933 \pm 9,564 ab	43,116 \pm 9,086 ab
12 h	36,891 \pm 5,604 A	57,962 \pm 17,735 B	44,081 \pm 12,431 C	46,114 \pm 13,756 BC	34,429 \pm 4,868 A	36,429 \pm 5,467 A

* Diferenças de resultados em função do tempo de incubação (6 h/12 h) com glucose 5% (Games-Howell; $p < 0,05$). Letras diferentes após valores numéricos indicam diferenças estatísticas (Games-Howell; $p < 0,05$) entre diferentes tratamentos, para um mesmo tempo de desafio.

Tabela 3. Taxas de secreção de lactato por biofilmes de 72 h crescidos na presença/ausência de íons metálicos seguido de desafios com glucose 5% por 6h/12h.

Tempo de incubação	Taxa de secreção de lactato $\{[(\mu\text{mol.L}^{-1}).\text{min}^{-1}].\text{biomassa}^{-1}]\} \pm$ dp					
	Controle *	Ni ⁺²	Fe ⁺³ *	Cr ⁺³	Co ⁺²	Mistura *
6 h	9,991 \pm 3,627 ab	4,636 \pm 1,022 a	15,354 \pm 5,838 b	2,935 \pm 0,507 a	3,553 \pm 2,917 a	7,299 \pm 2,814 a
12 h	0,351 \pm 0,069 A	6,139 \pm 2,880 B	4,015 \pm 1,473 C	2,761 \pm 0,454 C	0,308 \pm 0,052 A	1,602 \pm 0,194 D

* Diferenças de resultados em função do tempo de incubação (6 h/12 h) com glucose 5% (Games-Howell; $p < 0,05$). Letras diferentes após valores numéricos indicam diferenças estatísticas (Games-Howell; $p < 0,05$) entre diferentes tratamentos, para um mesmo tempo de desafio.

FIGURAS

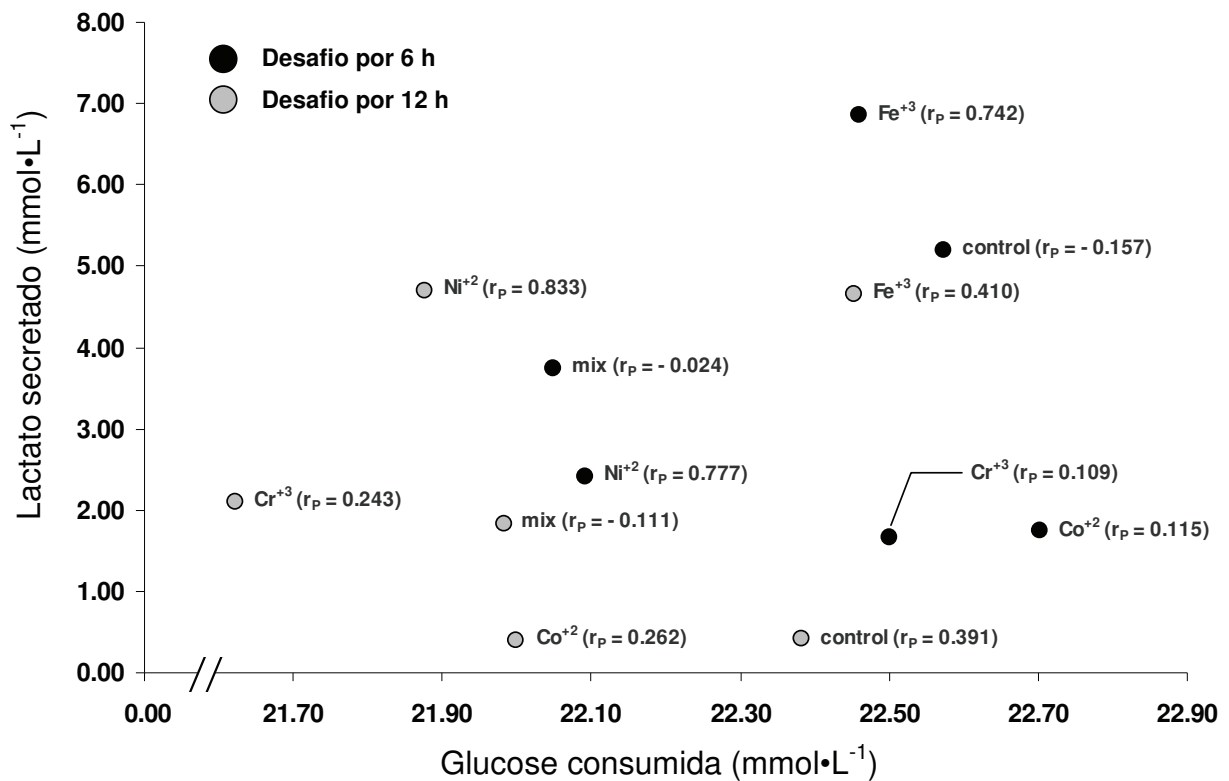


Figura 1. Escatergrama representativo da dispersão de pontos resultantes das combinações cartesianas de valores nominais de lactato secretado (mmol·L⁻¹) por glucose consumida (mmol·L⁻¹).

Cada ponto representa a média aritmética das 24 repetições. Os valores r_p representam os coeficientes de correlação de Pearson para as combinações lactato vs glucose.

FIGURAS (cont.)

2

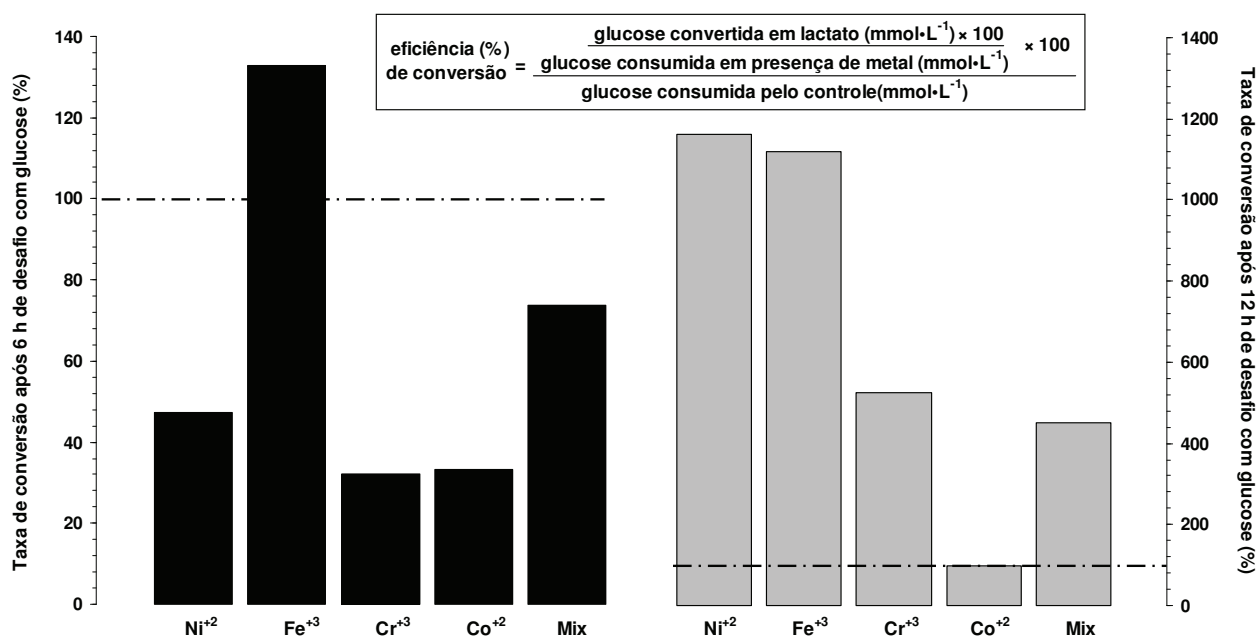


Figura 2. Histograma representativo da eficiência de conversão de glucose em lactato (%), influenciada pelos íons metálicos em estudo.

As linhas pontilhadas perpendiculares aos eixos y representam os controles arbitrariamente considerados como 100%.

FIGURAS (cont.)

2

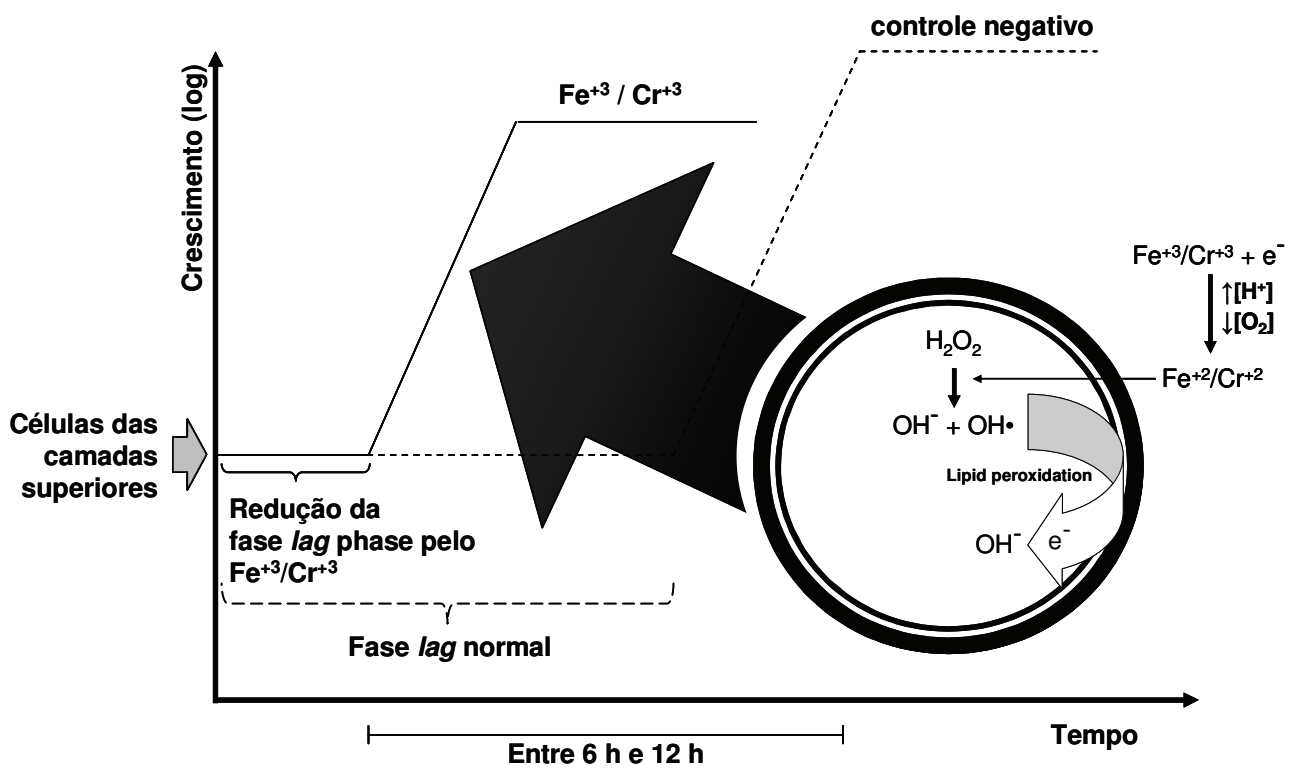


Figura 3. Proposição de mecanismo de interferência no crescimento das células das camadas externas de biofilme de *S. mutans* por íons metálicos. No detalhe, a reação de Fenton e a peroxidação de lipídios são indicados.

2. ARTIGO EM INGLÊS

**VIRULENCE MODULATION OF *Streptococcus mutans* BIOFILMS BY
METAL ÍONS RELEASED FROM ORTHODONTIC APPLIANCES**

1 **ABSTRACT**

2 **Introduction:** Metal ions are continuously released from orthodontic appliance
3 alloys. However, the effect of these ions on the virulence of *Streptococcus*
4 *mutans* biofilms is unknown. In the present study, we evaluated the impact of
5 metal ions commonly shed from orthodontic appliances on the virulence of *S.*
6 *mutans* ATCC®25175™ biofilms. **Methods:** Bacterium was grown in the
7 presence of Ni²⁺, Fe³⁺, Cr³⁺, Co²⁺ or a mixture of these metal ions (Mix) at
8 concentrations similar to those released in saliva of orthodontic patients.
9 Microtiter plate wells were conditioned with saliva and adherent bacterial cells,
10 and then biofilms were formed for 72 h in the presence or absence of metal ions
11 and treated for up to 12 h with 5% glucose. **Results:** Physiological
12 concentrations of ions interfered with the growth of *S. mutans* by reducing its
13 biomass (Ni²⁺, Fe³⁺, Cr³⁺), raising its rates of sugar metabolism (Ni²⁺, Fe³⁺, Cr³⁺)
14 and raising its secretion of lactate (Ni²⁺, Fe³⁺, Cr³⁺, mix). **Conclusion:** The
15 examined metal ions reduced the virulence of *S. mutans* and should be taken
16 into account when assessing the risk of caries in patients undergoing
17 orthodontic therapy.

18

19

20 **Key words:** *Streptococcus mutans*, orthodontic appliances, metal ions,
21 virulence

1 INTRODUCTION

2 Orthodontic appliances such as brackets, archwires, and bands are
3 usually made from metal alloys such as stainless steel, cobalt-chromium-nickel
4 (CoCrNi), nickel-titanium (NiTi), alloy of β -titanium (β -Ti) and pure titanium due
5 to the mechanical properties of these metals.¹ Once in the mouth, metallic
6 orthodontic appliances become prone to corrosion due to dynamic stress²,
7 fatigue³ and acids from the diet or from lactic fermentation by adjacent
8 microbiota. This degradation leads to an increase in the salivary concentration
9 of metal ions,^{4,5} and continued exposure of oral microorganisms to these metal
10 ions likely induces some degree of physiological change in these organisms.
11 *Streptococcus mutans*, one of the most acidogenic amongst oral microbiota, is
12 an organism whose physiology is known to be affected by metal ions such as
13 Zn^{2+} ,⁶ Al^{3+} ,⁷ Mn^{2+} ,⁸ and Fe^{2+} .⁹ Moreover, *S. mutans* produces a glucan-rich
14 extra-polymeric matrix that retains metal ions to considerably higher
15 concentrations within the plaque than in the surrounding environment.¹⁰

16 In drinking water, the ability of metal ions to interfere with the growth of *S.*
17 *mutans* has previously been investigated.¹¹ However, little is known about
18 changes in the physiology of this species induced by ions from orthodontic
19 appliances. Two studies stand out of the few performed investigating this
20 question: an investigation of the inhibitory effect intrinsic to orthodontic
21 appliances¹² and a quantification of Ni^{2+} in the dental plaque of orthodontic
22 patients.¹³

23 Although it is known that metal ions are continuously released into the
24 oral cavity of patients undergoing orthodontic therapy, the virulence-modulating
25 ability of these metal ions on the cariogenic microbiota is unknown. Studies to

1 test the hypothesis that metal ions from orthodontic accessories can interfere
2 with these microorganisms, favoring or hindering the development of caries, are
3 needed.

4 The objective of this study was to experimentally evaluate the influence
5 of metal ions released from orthodontic appliances on the virulence of *S.*
6 *mutans* ATCC[®]25175[™] biofilms *in vitro*.

7

8 **MATERIAL AND METHODS**

9 **Collection of stimulated saliva**

10 Stimulated saliva (10-mL aliquots) was collected from three healthy
11 volunteer donors, aged 20-45 years, who were not on drug therapy, were not
12 undergoing orthodontic treatment, and did not have amalgam fillings and/or
13 metal prostheses. Donor participation was conditional upon giving written
14 informed consent in accordance with the guidelines of the Ethics Committee on
15 Human Research (Protocol 5410; Approval term 3588/09) at the Pontifical
16 Catholic University of Paraná.

17 These donors were instructed not to eat or brush their teeth for at least
18 two hours before the collection period. Collections were performed by patients
19 chewing a silicone tube that had been sterilized in autoclave. Saliva aliquots
20 were mixed in order to ensure formation of pellicles with more receptors.¹⁴ Right
21 after collection, samples were cooled on ice and purified by centrifugation
22 (10,000 × *g*, 4 °C, 20 min) and were then immediately used.

23 **Microorganism**

24 Type-strain *S. mutans* ATCC[®]25175[™] was grown in 50 mL of Brain
25 Heart Infusion (BHI) (Difco, Detroit, MI) at 37 °C with agitation at 100 rpm and

1 10% pCO₂. After 24 h, cells were centrifuged and washed with sterile 145 mM
2 NaCl. Cells were then resuspended in 145 mM NaCl to an OD₆₆₀ of 1.00.

3 **Preparation of metal containing broths**

4 BHI containing different metal ions was prepared using metal ion at the
5 same concentrations found in saliva from orthodontic patients.^{4,5} The ions and
6 their concentrations were as follows: 10 ng/mL (170 nM) divalent nickel
7 (Ni²⁺), 6.77 ng/mL (121 nM) trivalent iron (Fe³⁺), 4.5 ng/mL (86.5 nM) trivalent
8 chromium (Cr³⁺), and 0.44 ng/mL (7.46 nM) divalent cobalt (Co²⁺). The
9 bacterium was also treated with a mixture of ions (Mix) dissolved in BHI at the
10 combined concentrations above. Because of their increased solubility, high-
11 purity metal nitrates were used (Merck Chemicals Co., Sao Paulo, Brazil). The
12 negative control was grown in culture broth without any added metal ions. The
13 solvent used for the manufacture of culture broths and “challenge glucose
14 solutions” (CGS) was Type II reagent water with specific resistivity above 2
15 Mohm/cm.^{15,16}

16 Two hundred microliters of a standardized suspension of *S. mutans*
17 ATCC[®]25175[™] was added to these broth (1 mL) and incubated at 37 °C with
18 agitation at 100 rpm and 10% pCO₂. This step is important to allow the cells to
19 adapt to the presence of the metal ions. After 24 h, cells were centrifuged and
20 washed with sterile 145 mM NaCl. The cells were resuspended in 145 mM NaCl
21 to an OD₆₆₀ of 1.00.

22 **Biofilm forming**

23 Biofilms were grown following the protocols of Oliveira *et al.* 2007¹⁷ using
24 24-well polystyrene plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). One-hundred
25 microliter aliquots of clarified saliva were transferred to wells and aerobically

1 incubated for 2 h at 37 °C and 100 rpm, to form acquired pellicle. Wells were
2 washed twice with sterile 145 mM NaCl to remove exceeding saliva.

3 One milliliter of standardized cell suspension (OD_{660} 1.00) were added to
4 each well and incubated at 37 °C, 100 rpm and 10% pCO₂. After 2 h, the
5 culture was removed and the wells were washed twice with sterile 145 mM
6 NaCl to remove weakly adhering and planktonic cells. The control wells
7 received 1 mL of BHI and the experimental groups received 1 mL of BHI plus
8 ions. The plates were statically incubated at 37 °C and 10% pCO₂, for 72 h, and
9 the media were replaced with fresh broth with or without metal ions every 24 h.

10 **Quantification of glycolytic rate**

11 The rate of glucose uptake was determined using cells from intact
12 biofilms. After 72 h of growth, each culture well was gently washed twice with
13 sterile 145 mM NaCl. One milliliter of CGS containing 5 mg/mL (27.77 mmol/L)
14 glucose with/without metal ions was then added to each well, and the cells were
15 incubated at 37 °C with 10% pCO₂ and shaking at 90 rpm. At 6 h and 12 h, 10-
16 µL aliquots were collected and mixed with 1 mL of enzyme reagent containing
17 glucose oxidase.¹⁸ The subsequent analytical steps were performed according
18 to the manufacturer's recommendations (Laborlab Inc., Sao Paulo, Brazil). The
19 values were originally expressed in mg/dL and were converted into mmol/L and
20 subtracted from 27.77 mmol/L to obtain the rate of glucose consumed. The
21 values obtained were divided by time (min) and subsequently by biomass
22 (quantified by absorbance) to obtain metabolic rates expressed as
23 (µm/L)/min/biomass.

24 **Quantification of lactate production**

1 Two-microliter aliquots of the CGS prepared above were collected and
2 mixed with 200 μ L of enzyme reagent containing lactate oxidase¹⁹. The
3 subsequent analytical steps were performed according to the manufacturer's
4 recommendations (Biotechnica Ltd., Varginha, Brazil). The values were originally
5 expressed in mg/dL and were converted into mmol/L and divided by time (min).
6 Subsequently, values were divided by biomass (quantified by absorbance) to
7 obtain lactate secretion rates expressed as (μ mol/L)/min/biomass.

8 **Biomass estimation by crystal violet (CV) retention**

9 Biofilms grown for 72 h and challenged by 6 h or 12 h with CGS were
10 thoroughly washed twice with sterile 145 mM NaCl, and the cells were fixed in
11 99% methanol for 15 min. After evaporation of the methanol via forced air using
12 a hair dryer, the cells were incubated in 1 mL of 0.02% CV for 20 min. Excess
13 CV was removed by washing four times with distilled water. The incorporated
14 CV was released by incubation for 10 min in 1 mL of 33% acetic acid, and the
15 OD₅₄₀ was then determined.²⁰ The values of blanks were subtracted from the
16 values obtained after treatment to eliminate background interference.

17 **Statistics**

18 Six replicates of each experiment were conducted in four separate
19 moments. All data were assessed for homogeneity of variance using the
20 Levene index and analyzed by the one-way ANOVA test with a Games-Howell
21 multiple comparison test for heterogeneous variances using SPSS 18.0 (SPSS
22 Inc., Chicago, IL). A p value of $p < 0.05$ was considered as statistically
23 significant.

24

25 **RESULTS**

1 **Quantification of biofilm biomass**

2 The biomasses of biofilms grown for 72 h in the presence or absence of
3 metal ions were estimated after treatment with 5% glucose for 6 h and 12 h, as
4 shown in Table 1. After 6 h of treatment, increases in biomass were achieved
5 following the addition of Fe^{3+} to the broth ($p \leq 0.049$). The biomasses obtained
6 following treatment with Ni^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} and the ion mixture had means with
7 slight fluctuations, but these values did not reach statistical significance
8 compared to the control ($p \geq 0.506$).

9 When the cultures were continued for 12 h, the average biomass of the
10 controls had an absorbance of 1.685 ± 0.326 . Reductions ($p \leq 0.015$) in biomass
11 values were obtained for biofilms grown in the presence of Ni^{2+} (1.048 ± 0.326),
12 Fe^{3+} (1.414 ± 0.470), and Cr^{3+} (1.302 ± 0.494). The mixture of ions (1.676 ± 0.339)
13 and Co^{2+} (1.774 ± 0.355) produced biofilms with biomasses similar to that of the
14 control ($p \geq 0.419$).

15 Notably, the biomass values of groups grown with Ni^{2+} , Fe^{3+} , and Cr^{3+}
16 were reduced by glucose treatment for 12 h compared to their values following
17 treatment for 6 h. At first, this fact caused some concern; however, possible
18 methodological errors were not taken in account and we concluded that the
19 most plausible hypothesis is that the sharp drop in pH over 12 h caused the
20 ions became toxic, resulting in a reduction in cell viability. This hypothesis
21 should be tested in future studies.

22 **Quantifying the metabolic rate**

23 Metabolic rates were determined based on the amount of glucose
24 consumed per amount of biomass formed in the presence or absence of metal
25 ions and 5% glucose for 6 h and 12 h (Table 2). At the 6-h time point, none of

1 the experimental groups were different from the controls ($p \geq 0.657$), indicating
2 that the metal ions did not produce metabolic changes. However, after 12 h of
3 glucose challenge, we observed increases in the metabolic rate of biofilms
4 grown in the presence of Ni^{2+} , Fe^{3+} , and Cr^{3+} ($p \leq 0.033$).

5 **Quantifying the lactate production rate**

6 Although there were substantial variations between the results of
7 different ion-treated groups (*e.g.*, Fe^{3+} ions vs. other ions) in 6-h cultures, these
8 lactate production results were not significantly different from the control
9 ($p \geq 0.065$). The secretion of lactate after 12 h of glucose treatment was
10 increased in the presence of Ni^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , and mixed ions ($p \leq 0.046$; Table 3).

11 **Stoichiometry**

12 Figure 1 shows the distribution of the average consumption of glucose
13 (mmol/L) vs. lactate secretion (mmol/L). This scatterplot was built to
14 demonstrate the influence of metal ions on the relationship between the use of
15 glucose and the consequent secretion of acid. However, the distribution of the
16 means did not generate clusters for a given ion or for the duration of treatment
17 (6 h and 12 h).

18 Correlation analysis using Pearson's coefficient (r_P) revealed that after 6
19 h of glucose treatment, the controls showed a weak negative correlation
20 between glucose consumption and lactate secretion that was not significant
21 ($r_P = -0.157$, $p > 0.05$). The mixture of ions also resulted in a weak negative
22 correlation ($r_P = -0.024$, $p > 0.05$). Strong positive correlations were obtained for
23 Ni^{2+} ($r_P = 0.777$, $p < 0.05$) and Fe^{3+} ($r_P = 0.742$, $p < 0.05$). After 12 h of treatment, the
24 correlation coefficients were positive for all groups except for the mixture of ions

1 ($r_p = -0.111$, $p > 0.05$). The results using Ni^{2+} were particularly noteworthy,
2 demonstrating a strong positive correlation ($r_p = 0.833$, $p < 0.05$).

3 To determine the influence of metal ions on the efficiency of the
4 conversion of glucose to lactate, a simplified homolactic fermentation equation
5 (1 glucose \rightarrow 2 lactate) with no other metabolic deviation (*e.g.*, heterolactic
6 fermentation) was considered. The lactate concentration values (in mmol/L)
7 were divided by two to obtain the amount of glucose converted to lactate. The
8 ratios obtained were multiplied by 100 and divided by the total concentration of
9 glucose consumed. These calculated ratios were again multiplied by 100 and
10 divided by the average values of the controls for each time point. Thus, the
11 values of the controls were arbitrarily considered to be 100%. At this threshold,
12 the percentages of conversion of glucose to lactate by biofilms under different
13 treatments were recalculated (Figure 2). The results for the 6-h treatment
14 showed that only Fe^{3+} was able to increase the conversion rate above the mean
15 control value (32.83% increase). The remaining ions reduced the conversion
16 rate by about 52.69% (Ni^{2+}), 66.85% (Cr^{3+}), 66.77% (Co^{2+}), and 26.20% (mix).
17 In contrast, glucose treatment for 12 h produced conversion rates in the ion-
18 treated groups that were much higher than the control, with increases ranging
19 from 351.47% (mix) to 1064.01% (Ni^{2+}). The exception was the Co^{2+} -treated
20 group, which showed a reduction of 3.35%.

21

22 **DISCUSSION**

23 In terms of methodology, our treatment of biofilms with glucose for up to
24 12 h could be regarded as being too long and thus not physiologically relevant.
25 However, we opted to include this treatment time because patients (and in

1 certain instances, their parents) commonly report the consumption of sugar
2 throughout the waking period, even in multiple doses per day. Nevertheless, the
3 choice to assess these biofilms over 72 h is based on the clinical observation
4 that some patients are not collaborative and conduct oral hygiene far below the
5 desirable level.

6 We also observed that treatment with some metal ions, particularly Fe^{3+}
7 and Cr^{3+} , increased the biomass of biofilms during the early hours of treatment
8 with glucose compared to the control. However, these same ions did not
9 maintain this effect when the treatment was extended. It is possible that these
10 ions acted during the lag phase of biofilm growth over 72 h caused by the
11 addition of glucose and promoted its shortening. Figure 3 graphically illustrates
12 this possibility. However, because *S. mutans* lacks catalase to detoxify reactive
13 oxygen species (ROS), it is also possible that the trivalent ions were reduced to
14 Fe^{2+} and Cr^{2+} due to the acidity of the biofilm and the low availability of
15 molecular oxygen.²¹ These reduced ions, once internalized by the bacterial
16 cells, might have begun to catalyze the Fenton reaction and the subsequent
17 production of hydroxyl radicals, which are strong oxidizing agents that affect
18 cellular functions. At the level of microbial populations, the presence of ROS
19 would have killed cells of outer layers of biofilm, as well as internal layer cells in
20 lesser extent, resulting in lower biomass after 12 h of treatment.

21 Based on the above hypothesis, it would be expected that the mixture of
22 ions would also induce an increase in biomass in the first six hours of treatment,
23 followed by a reduction when the treatment is extended to 12 h. In fact, the
24 mixture of ions induced an increase in biomass after 12 h. Although exposure to
25 Ni^{2+} , Cr^{3+} and Fe^{3+} caused a reduction in final biomass, Co^{2+} , which promoted

1 an increase in biomass during the interval between the 6- and 12-h glucose
2 treatments, may have counteracted the cell loss induced by other ions, resulting
3 in the maintenance of biofilm biomass during treatment with the ion mixture.

4 The evaluation of metal ions individually revealed that some were able to
5 influence glucose metabolism by increasing consumption when the treatment
6 was prolonged to 12 h. However, the stoichiometry of glucose consumption and
7 lactate production indicated that the hexose was not fully digested for energy
8 purposes, as could be thought. Three possible scenarios, which may have
9 occurred simultaneously, could explain the observed pattern of glucose
10 expenditure. First, some of the glucose may have been converted to pyruvate
11 and used for homolactic fermentation; heterolactic fermentation may have also
12 occurred, but to a lesser extent. Second, because *S. mutans* is deficient in α -
13 ketoglutarate dehydrogenase, its Krebs cycle is incomplete.²² Thus, some of the
14 pyruvate produced may have been converted into amino acids for biomass
15 formation. Third, the bacterium may have secreted extracellular
16 glycosyltransferases (GTFs) to transform the surrounding glucose into an extra-
17 polymeric matrix for biofilm formation.

18 Previous studies have found that *S. mutans* internalizes only the ferrous
19 form of iron (Fe^{2+}),⁹ which can be formed in the anaerobic and reducing
20 environment of the biofilm interior either due to partial oxygen accessibility^{23,24}
21 or due to the action of reducing substances from glucose metabolism, possibly
22 via flavoprotein-dehydrogenase.⁹ Once Fe^{2+} enters the membrane, it can be
23 internalized into cells. In *Lactobacillus casei*, it has been shown that divalent
24 ions such as Fe^{2+} and Ni^{2+} can act as activators of lactate dehydrogenase,
25 increasing the conversion of pyruvate to lactate by 1.78 and 2.34 times,

1 respectively.²⁵ Our results are in agreement with this previously published
2 evidence, which may at least partially explain the observed increases in the
3 lactate secretion rate induced by ions (Figure 2). However, this effect is likely
4 concentration dependent because exposure of *S. mutans* to ion concentrations
5 in the nanomolar range stimulates microbial growth and metabolic activity,²⁶ in
6 agreement with our results. Moreover, micromolar or greater concentrations of
7 these ions lead to decreases in these.^{11,27}

8 From a clinical perspective, the data presented here suggest that metal
9 ions from orthodontic appliances stimulate important virulence factors of *S.*
10 *mutans* that are directly associated with the bacterial ability to cause caries.
11 This behavior deserves special attention by orthodontists when educating their
12 patients about the importance of maintaining excellent oral hygiene. Future
13 studies should aim to further investigate of the effect of orthodontic therapy on
14 the virulence and pathogenicity of cariogenic bacteria.

16 **CONCLUSIONS**

17 We have demonstrated that metal ions in concentrations similar to those
18 obtained from patients undergoing orthodontic intervention may interfere with
19 the physiological response of *S. mutans* during 12 h of treatment with glucose,
20 reducing biomass (Ni^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+}), raising the rates of sugar metabolism (Ni^{2+} ,
21 Fe^{3+} , Cr^{3+}) and increasing lactate secretion (Ni^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} and ion mixture).

REFERENCES

1. Iijima M, Endo K, Yuasa T, Ohno H, Hayashi K, Kakizaki M, Mizoguchi I. Galvanic corrosion behavior of orthodontic archwire alloys coupled to bracket alloys. *Angle Orthod.* 2006;76: 705-711.
2. Kerosuo H, Moe G, Kleven E. In vitro release of nickel and chromium from different types of simulated orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 1995;65:111-116.
3. Eliades T, Athanasiou AE. In vivo aging of orthodontic alloys: implications for corrosion potential, nickel release, and biocompatibility. *Angle Orthod.* 2002;72:222-237
4. Gürsoy S, Acar AG, Se_ en C. Comparison of metal release from new and recycled bracket-archwire combinations. *Angle Orthod.* 2004;75: 92-94.
5. Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res.* 2008;1:51-56.
6. He G, Pearce EI, Sissons CH. Inhibitory effect of ZnCl(2) on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol.* 2002;47:117-29.
7. Sturr MG, Marquis RE. Inhibition of proton-translocating ATPases of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* by fluoride and aluminum. *Arch Microbiol.* 1990;155:22-7.
8. Arirachakaran P, Luengpailin S, Banas JA, Mazurkiewicz JE, Benjavongkulchai E. Effects of manganese on *Streptococcus mutans* planktonic and biofilm growth. *Caries Res.* 2007;41:497-502.
9. Evans SL, Arceneaux JE, Byers BR, Martin ME, Aranha H. Ferrous iron transport in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 1986;168:1096-9.
10. Chen PM, Chen JY, Chia JS. Differential regulation of *Streptococcus mutans* gtfBCD genes in response to copper ions. *Arch Microbiol.* 2006;185:127-35.

11. Aranha H, Strachan RC, Arceneaux JE, Byers BR. Effect of trace metals on growth of *Streptococcus mutans* in a teflon chemostat. *Infect Immun.* 1982;35:456-60.
12. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A. Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. *Scand J Dent Res.* 1993;101:229-31.
13. Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances. *Eur J Orthod.* 2006;28: 292-297.
14. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DL. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun.* 1986;52:555-561.
15. American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard specification for reagent water. Document D1193-91. Philadelphia, Pennsylvania: ASTM. 1991.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS. 1997.
17. Oliveira MR, Napimoga MH, Cogo K, Gonçalves RB, Macedo ML, Freire MG, Groppo FC. Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. *J Oral Sci.* 2007;49:141-145.
18. Lott JA, Turner K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin Chem.* 1975;21:1754-1760.
19. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3, 5-Dichloro- 2-hydroxybenzenesulfonic Acid/4-Aminophenazone Chromogenic System in Direct Enzymic Assay of Uric Acid in Serum and Urine. *Clin Chem.* 1980;26:227-231.
20. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 2008;72:157-165.

21. Marquis RE. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J Ind Microbiol.* 1995;15:198-207
22. Cvitkovitch DG, Gutierrez JA, Bleiweis AS. Role of the citrate pathway in glutamate biosynthesis by *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 1997;179:650-655.
23. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng.* 1994;43:1131-1138
24. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2659-64.
25. Holland R, Pritchard GG. Regulation of the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* by fructose-1,6-diphosphate and metal ions. *J Bacteriol.* 1975;121:777-84.
26. Strachan RC, Aranha H, Lodge JS, Arceneaux JE, Byers BR. Teflon chemostat for studies of trace metal metabolism in *Streptococcus mutans* and other bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43:257-60.
27. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2005;39:123-9.

TABLES

Table 1. Biomasses achieved by 72 h-old biofilms grown in presence/absence of metallic cations followed by 6 h/12 h challenges with 5% glucose

Incubation time	Biomass [CV retention (ΔOD_{540nm})] \pm std dev					
	Control	Nickel	Iron	Chromium	Cobalt	Mixture
6 h	1.488 \pm 0.295 ^{ac}	1.414 \pm 0.298 ^a	1.819 \pm 0.766 ^b	1.756 \pm 0.374 ^c	1.540 \pm 0.456 ^{ac}	1.420 \pm 0.380 ^a
12 h	1.685 \pm 0.326 ^A	1.048 \pm 0.326 ^B	1.414 \pm 0.470 ^C	1.302 \pm 0.494 ^C	1.774 \pm 0.355 ^A	1.676 \pm 0.339 ^A

Dissimilar upper letters denote statistical significances (Games-Howell $p \leq 0.05$) among different treatments. No comparisons were made between treatments according to incubation (5% glucose challenges) time.

Table 2. Glucose metabolic rates of 72 h-old biofilms grown in presence/absence of metallic cations followed by 6 h/12 h challenges with 5% glucose

Incubation time	Glucose metabolic rate {[($\mu\text{mol.L}^{-1}$).min ⁻¹].biomass ⁻¹ } \pm std dev					
	Control	Nickel	Iron	Chromium	Cobalt	Mixture
6 h	42.123 \pm 3.811 ^{ab}	43.396 \pm 7.315 ^a	34.293 \pm 12.481 ^b	35.587 \pm 10.223 ^b	40.933 \pm 9.564 ^{ab}	43.116 \pm 9.086 ^{ab}
12 h	36.891 \pm 5.604 ^A	57.962 \pm 17.735 ^B	44.081 \pm 12.431 ^C	46.114 \pm 13.756 ^{BC}	34.429 \pm 4.868 ^A	36.429 \pm 5.467 ^A

Dissimilar upper letters denote statistical significances (Games-Howell $p \leq 0.05$) among different treatments. No comparisons were made between treatments according to incubation (5% glucose challenges) time.

Table 3. Lactate secretion rates of 72 h-old biofilms grown in presence/absence of metallic cations followed by 6 h/12 h challenges with 5% glucose

Incubation time	Lactate secretion rate {[($\mu\text{mol.L}^{-1}$).min ⁻¹].biomass ⁻¹ } \pm std dev					
	Control	Nickel	Iron	Chromium	Cobalt	Mixture
6 h	0.351 \pm 0.069 ^A	6.139 \pm 2.880 ^B	4.015 \pm 1.473 ^C	2.761 \pm 0.454 ^C	0.308 \pm 0.052 ^A	1.602 \pm 0.194 ^D
12 h	9.991 \pm 3.627 ^{ab}	4.636 \pm 1.022 ^a	15.354 \pm 5.838 ^b	2.935 \pm 0.507 ^a	3.553 \pm 2.917 ^a	7.299 \pm 2.814 ^a

Dissimilar upper letters denote statistical significances (Games-Howell $p \leq 0.05$) among different treatments. No comparisons were made between treatments according to incubation (5% glucose challenges) time.

FIGURES

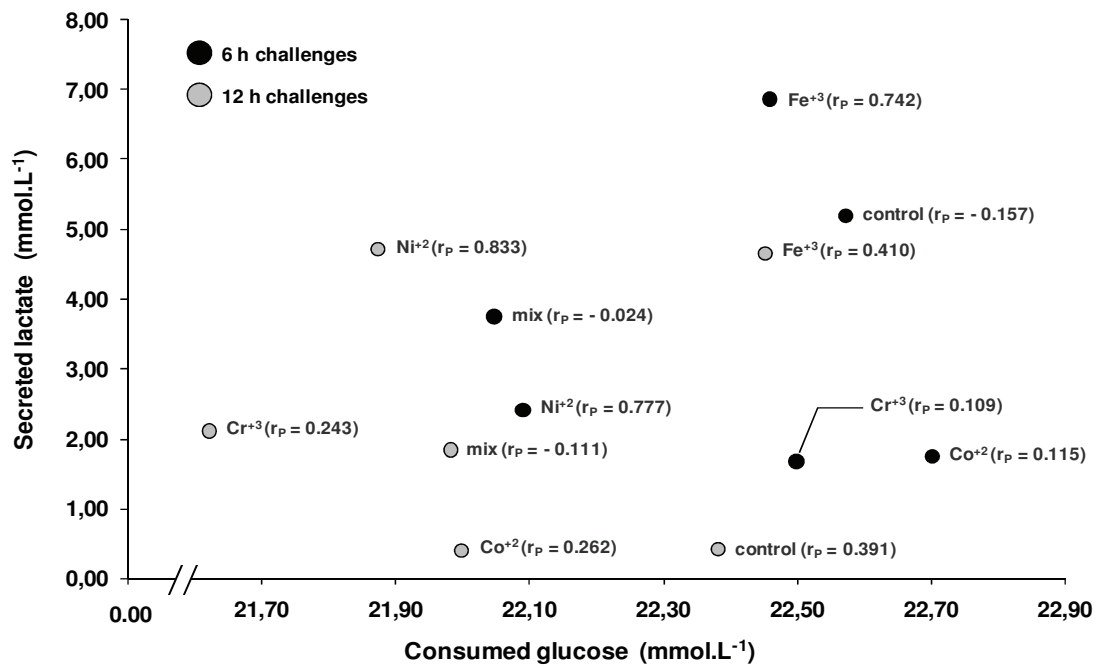


Figure 1. Scattergram of cartesian combinations of nominal secreted lactate values ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) by consumed glucose ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Each point represents the arithmetic average of 24 repetitions. r_p values represent the Pearson correlation coefficients for lactate vs glucose combinations.

FIGURES (cont.)

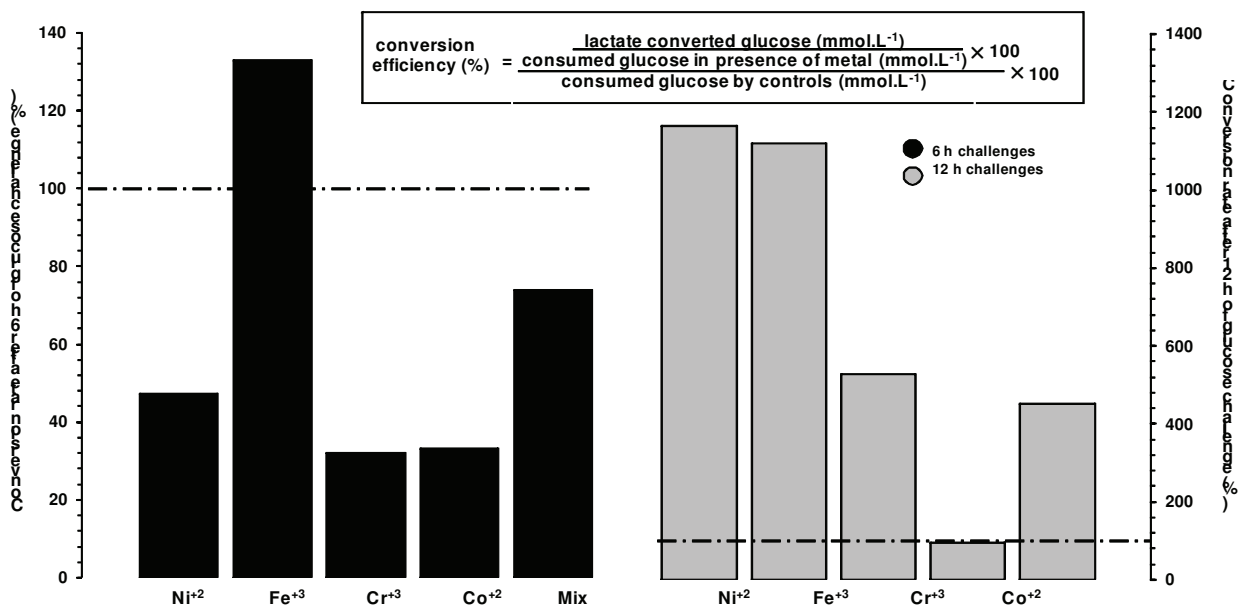


Figure 2. Bar diagram showing the efficiency (%) of glucose to lactate conversion modulated by metal ions.

Dashed lines perpendicular to y axis represent controls arbitrarily considered as been 100%.

FIGURES (cont.)

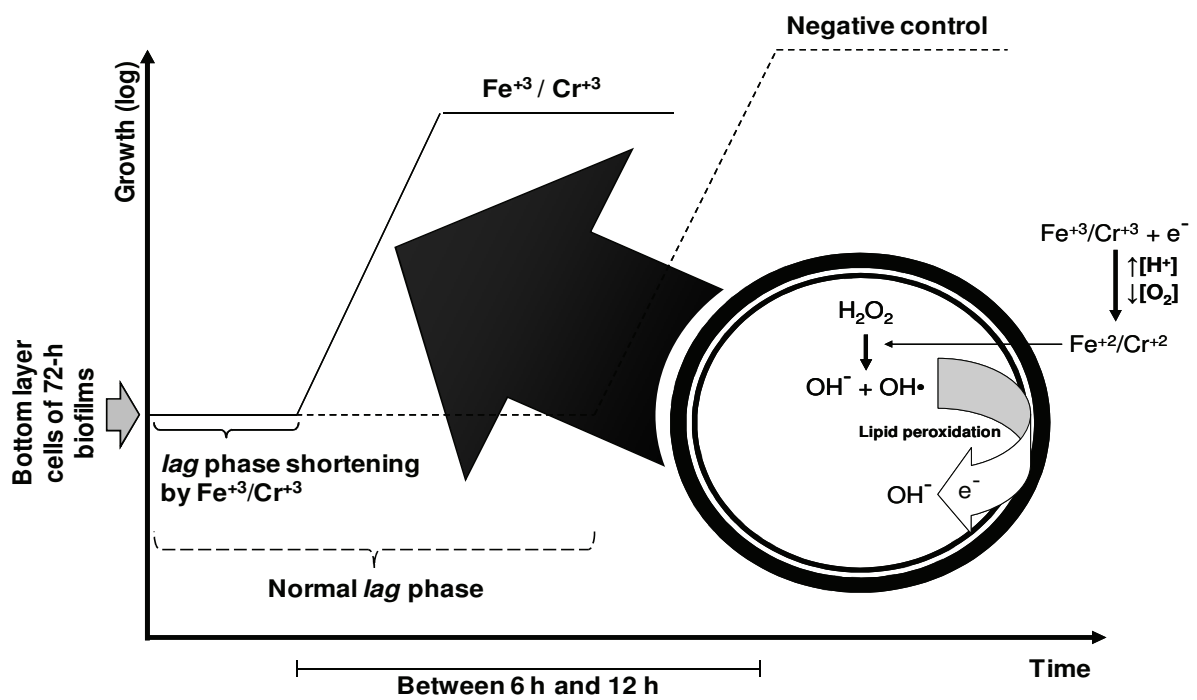


Figure 3. Proposed mechanism for growth interference of cells living within bottom layers of 72-h biofilms of *S. mutans* by metal ions.

In detail, Fenton reaction and lipide peroxidation are indicated.

10. ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, RG _____, estou sendo convidado a participar do estudo denominado: “Modulação de virulência de biofilme de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ por íons metálicos liberados de aparelhos ortodônticos”.

Caso aceite participar desta pesquisa, estarei de acordo com a coleta de minha saliva (20 mL). Esta coleta será realizada através de estimulação por um pedaço de tubo de silicone estéril de aproximadamente 1,5 g. A saliva estimulada inicial será deglutida e a partir desse momento será tomada toda a saliva produzida em um tubo graduado, com o auxílio de um funil. Esse processo é indolor. E, fui orientado a não se alimentar ou escovar os dentes por pelo menos duas horas antes do período da coleta.

A minha privacidade será respeitada, ou seja, o meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. Estou ciente de que não receberei ressarcimento financeiro pela participação e poderei me recusar a participar do estudo, ou retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo são Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa e Alinne Ulbrich Mores Rymovicz, do Curso de Pós Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. A qualquer momento os pesquisadores poderão ser contatados pelo telefone (41)3271-1497.

Li este termo, fui orientado quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Curitiba, ___ de _____ de 201__.

Assinatura do responsável pelo sujeito de pesquisa

Assinatura da pesquisadora Alinne Ulbrich Mores Rymovicz

Assinatura do pesquisador Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

ANEXO II

Parecer Nº 0003588/09

Protocolo CEP Nº 5410

Título do projeto **Modulação da virulência de biofilmes de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 por cátions metálicos liberados de aparelhos ortodônticos**

Grupo III
Versão 1

Protocolo CONEP 0519.0.084.000-09

Pesquisador responsável **Aline Ulbrich Mores**

Instituição

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **02/12/2009**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.


Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 02 de Dezembro de 2009.


Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUC PR



ANEXO II



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0003588/09**

Protocolo CEP Nº **5410**

Título do projeto **Modulação da virulência de biofilmes de Streptococcus mutans ATCC 25175 por cátions metálicos liberados de aparelhos ortodônticos**

Grupo **III**
Versão **1**

Protocolo CONEP **0519.0.084.000-09**

Pesquisador responsável **Alinne Ulbrich Mores**

Instituição

Objetivos

Pelo presente projeto se busca avaliar *in vitro* a modulação de virulência de biofilmes de Streptococcus mutans ATCC® 25175™ por alguns cátions metálicos comumente esfoliados de aparelhos ortodônticos.

Comentários e considerações

Para a realização deste projeto, os pesquisadores vão efetuar a coleta de saliva de três sujeitos de pesquisa, para a realização de teste *in vitro*.

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

TCLE adequado aos sujeitos de pesquisa

Conclusões

Aprovado sob o aspecto ético.



ANEXO III

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* uses the *Elsevier Editorial System (EES)*, an online manuscript submission and review system. To submit or review an article, please go to the **AJO-DO** Editorial Manager website: ees.elsevier.com/ajodo .

Send other correspondence to:

Dr David L. Turpin, DDS, MSD, Editor-in-Chief

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington

Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206)221-5413

E-mail: dlturpin@aol.com

General Information

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* publishes original research, reviews, case reports, clinical material, short communications, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.

Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and

consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the *Journal* nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via the online Editorial Manager: ees.elsevier.com/ajodo . Organize your submission as follows.

1. Title Page. Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.
2. Abstract. Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.
3. Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units whenever practical. Refer to teeth by their full

name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the *AMA Manual of Style*, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. Figures. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. Tables. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as text-based files (Word or Excel, for example) and not as graphic elements.

6. Model release and permission forms. Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

7. Copyright release. In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors: *"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material."* Scan the printed copyright release and submit it via the Editorial Manager, or submit it via fax or mail.

8. Conflict of interest statement. Report any commercial association that might pose a conflict of interest, such as ownership, stock holdings, equity interests and consultant activities, or patent-licensing situations. If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via Editorial Manager.

Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A highquality manuscript will include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, alternatives, progress, and results; and discussion. The submitted figures should include extraoral and intraoral photographs and dental models, panoramic radiographs and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention figures as appropriate.

Short Communications should not exceed 2000 words, including the bibliography, and should include a minimal number of figures or tables. Priority will be given to communications relating to primary research data, preferably clinical but also basic. This section permits time-sensitive material to be published within 6 months of submission.

Techno Bytes items report on emerging technological developments and products for use by orthodontists.

Litigation, Legislation, and Ethics items report legal and ethical issues of interest to orthodontists.

Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and Ask Us questions and answers appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse concerning the profession. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the letter, or fax or mail separately.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is occasionally published as a Guest Editorial or Special Article. Send Guest Editorials or Special Articles directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the editorial, or fax or mail separately.

Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending on their interest and value to subscribers. Send books to the Editor of Reviews and Abstracts, Dr Alex Jacobson, University of Alabama School of Dentistry, 1919 7th Ave S, Box 23, Birmingham, AL 35294. They will not be returned.

Checklist for authors

____Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint

requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address

____ Abstract

____ Article proper, including references and figure legends

____ Figures, in TIF or EPS format

____ Tables

____ Copyright release statement, signed by all authors

____ Photographic consent statement(s)

____ Conflict of interest statement

____ Permissions to reproduce previously published material

Updated June 2009