

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ORTODONTIA

FERNANDA BRASIL BABONI, BDS.

**Influência do condensado de fumaça de cigarros na
formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida
albicans* em materiais ortodônticos**

CURITIBA

2008

FERNANDA BRASIL BABONI, BDS.

**Influência do condensado de fumaça de cigarros na
formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida
albicans* em materiais ortodônticos**

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

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Co-orientadores: Prof. Dr. Odilon Guariza Filho
Profa. Dra. Andréa Novais Moreno

CURITIBA
2008

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

À Deus, por todas as graças a mim concedidas e por sempre iluminar o meu caminho.

À Nossa Senhora e São Marcelinho Champagnat, por terem me ajudado a vencer mais essa etapa.

Aos meus pais Danti e Leila, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Que sempre me incentivaram e animaram durante todas as fases da minha vida com amor, carinho e compreensão.

Ao meu irmão Fernando, pela sua amizade, carinho, incentivo e por todas as formas de apoio. Tenho muito orgulho de você.

Aos meus avós Edson, Elza, Leduina e Paulo Atilio (*in memoriam*), mesmo distantes, mas sempre presentes em todas as etapas da minha vida, torcendo para que eu conseguisse concretizar meus sonhos e minhas conquistas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, por ter aceitado o desafio de me orientar, mesmo sabendo que eu era uma principiante em pesquisa. Obrigada por ter depositado sua confiança e por me mostrar que os caminhos são traçados ao longo da caminhada. Agradeço pelo período de convivência e aprendizado. Sua sábia orientação e apoio em todos os momentos foram essenciais.

A paixão com que você se dedica à pesquisa é sem dúvida um exemplo.

Tenho uma enorme admiração por você!

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado e pela bolsa de estudo concedida.

Ao Diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sérgio Roberto Vieira, pela amizade e apoio.

Ao Diretor do Curso de Graduação em Odontologia, Prof. Monir Tacla, pelo incentivo, por ser um exemplo de seriedade e profissionalismo.

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Odilon Guariza Filho e Profa. Dra. Andréa Novais Moreno, pela credibilidade e pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional, além da grande amizade. O meu sincero agradecimento por todos os ensinamentos, carinho, e principalmente pela disponibilidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, Prof. Dr. Hiroshi Maruo e Prof. Dr. Orlando Tanaka, pelo acolhimento, valiosos ensinamentos, conselhos, compreensão e colaboração sempre que precisei. Aprendi muito com vocês. Obrigada por tudo!

À Rosimeire Takaki Rosa e toda a equipe do Laboratório de Estomatologia, por compartilharem conhecimento, tempo, materiais e equipamentos para a confecção deste trabalho. Agradeço também pela amizade dedicada à mim.

À Alessandra de Paula e Carvalho, pelo imenso incentivo e ajuda.

À todos os meus amigos de mestrado, Bruno, Jucienne, Luciana, Luégya, Luis Filipe, Marcos, Mariana, Raul, Ricardo, Saulo e Tais pela convivência e pela ajuda em algumas dificuldades. Sou muita grata a todos vocês pelas contribuições e experiências trocadas durante todo o mestrado.

À secretária do Programa de Pós-Graduação Neide Reis Borges, por toda a ajuda, atenção e momentos de alegria.

Aos funcionários da Clínica de Odontologia, pelo apoio, incentivo e dedicação.

Ao Prof. Sérgio Aparecido Ignácio, pela grande ajuda nas análises estatísticas. Muito obrigada!

Aos professores de Odontologia, em especial, Prof. Alaor Jason Brenner, Prof. Antônio Carlos Pinto Jachinoski, Prof. Eduardo Karan Saltori e Prof. Ernesto Josué Schmitt, pelos conhecimentos transmitidos, por contribuírem na minha formação profissional e pela grande amizade.

Aos funcionários da Biblioteca pela colaboração e pela presteza de seus serviços.

Aos meus amigos e familiares pela compreensão e incentivo incondicional.

Aos voluntários que fizeram parte deste estudo.

À todos vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE SIGLAS..... | 2 |
| 1- ARTIGO EM PORTUGUÊS..... | 3 |
| PÁGINA TÍTULO..... | 4 |
| RESUMO..... | 5 |
| INTRODUÇÃO..... | 6 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 7 |
| Microorganismos..... | 7 |
| Coleta de saliva estimulada..... | 7 |
| Coleta do condensado de fumaça de cigarro (CFC)..... | 8 |
| Interferência do CFC na adesão microbiana às superfícies..... | 9 |
| Interferência do CFC na formação de biofilmes..... | 10 |
| Estatística..... | 12 |
| RESULTADOS..... | 12 |
| DISCUSSÃO..... | 15 |
| CONCLUSÕES..... | 19 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 20 |
| FIGURAS..... | 25 |
| | |
| 2- ARTIGO EM INGLÊS..... | 30 |
| TITLE PAGE..... | 31 |
| ABSTRACT..... | 32 |
| INTRODUCTION..... | 33 |
| MATERIAL AND METHODS..... | 34 |
| Microorganisms..... | 34 |
| Collection of stimulated saliva..... | 34 |
| Collection of cigarette smoke condensate (CSC)..... | 35 |
| Influence of CSC on microorganisms adhesion to the surfaces..... | 36 |
| Influence of CSC on biofilms formation..... | 37 |
| Statistics..... | 38 |
| RESULTS..... | 39 |
| DISCUSSION..... | 41 |
| CONCLUSIONS..... | 45 |
| REFERENCES..... | 46 |

| | |
|--|-----------|
| FIGURES..... | 51 |
| 3- ANEXOS..... | 56 |
| ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA..... | 57 |
| ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 58 |
| ANEXO 3 – MATERIAL E MÉTODOS..... | 60 |
| ANEXO 4 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS & DENTOFACIAL ORTHOPEDICS..... | 62 |

LISTA DE SIGLAS (em ordem de aparecimento no texto)

| | |
|-------------------------|---|
| CFC = | Condensado de fumaça de cigarro |
| p = | Nível de significância |
| YNB = | Yeast Nitrogen Base (Caldo base de nitrogênio para leveduras) |
| OD _{660nm} = | Densidade óptica em comprimento de onda de 660 nanômetros |
| OD _{590nm} = | Densidade óptica em comprimento de onda de 590 nanômetros |
| BHI = | Brain and heart infusion (Infuso de cérebro e coração) |
| mg/cig = | Miligrama por cigarro |
| MBT™ = | Preconizado por McLaughlin, Bennett e Trevisi (2002) |
| # = | Grupo |
| vs = | Versus |
| UFC/mL = | Unidade formadora de colônia por mililitro |
| pCO ₂ 10 % = | Pressão parcial de gás carbônico de 10% |
| CV = | Cristal violeta |
| U test = | Teste U de Mann-Whitney |
| t test = | Teste t de Student |

1- ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO

Influência do condensado de fumaça de cigarros na formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em materiais ortodônticos

Fernanda Brasil Baboni, BDS.
Mestranda em Odontologia - Área de Concentração em Ortodontia
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, PharmB, MSc, PhD.
Professor adjunto do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia
Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Odilon Guariza Filho, BDS, MSc, PhD.
Professor adjunto do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de
Concentração Ortodontia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Andréa Novais Moreno, BiolB, AdvDiplomMorphol, MSc, PhD.
Professora adjunta do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Rua Imaculada Conceição, 1155
Fone: 55 41 3271-1637 / Fax: 55 41 3271-1405
80.215-901 – Curitiba-PR – Brasil
e-mail: edvaldo.rosa@pucpr.br

RESUMO

Introdução: Analisamos experimentalmente a capacidade de aderência e de formação do biofilme de *Streptococcus mutans* 6715 e de *Candida albicans* SC5314 na superfície de materiais ortodônticos na presença do condensado de fumaça de cigarros (CFC). **Métodos:** *Brackets* metálicos, bandas, resina acrílica e anéis elásticos de poliuretano foram recobertos por saliva estimulada e submetidos à adesão e formação de biofilmes na ausência e na presença de CFC, em sistema dinâmico. **Resultados:** O CFC aumentou a adesão de *S. mutans* 6715 à película adquirida ($p<0,05$) nas bandas (4,08×), na resina acrílica (2,89×) e nos *brackets* (3,37×) e reduziu nos elásticos de poliuretano (2,66×; $p<0,05$). O biofilme de *S. mutans* 6715 somente foi incrementado pelo CFC em *brackets* (1,60×; $p<0,05$). Na presença de CFC, a adesão de *C. albicans* SC5314 foi aumentada ($p<0,05$) nas bandas (1,81×), nos *brackets* (9,61×), nos elásticos (29133×) e na resina (177×). Maior formação de biofilme de *C. albicans* SC5314 induzida por CFC ($p<0,05$) foi observada em resina acrílica (2,13×) e em *brackets* (2,32×). **Conclusão:** Nossos resultados, quando analisados em conjunto, apontam que o consumo de cigarros de tabaco pode interferir nas propriedades de adesão e formação de biofilme desses microrganismos aos diversos materiais ortodônticos.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, Materiais ortodônticos, Tabagismo, Adesão, Biofilme.

INTRODUÇÃO

A cárie dental é um dos efeitos indesejáveis da terapia ortodôntica e que pode acometer até 50 % dos pacientes.¹⁻³ O *Streptococcus mutans* é a bactéria mais comumente associada ao desenvolvimento das cavitações e apresenta boa capacidade de adesão e crescimento sobre superfícies de materiais ortodônticos.^{4,5}

Embora não haja um consenso,⁶ existem indícios, ainda que experimentais, de que a *Candida albicans* também possa participar de processos cariosos.⁷ Apesar da polêmica que cerca o tema, sabe-se que a implantação de aparelhos ortodônticos fixos altera os parâmetros ecológicos orais com subsequente elevação nas contagens de *Candida spp.*^{8,9}

Apesar de alguns grupos terem investigado a adesão de microrganismos e formação de biofilme em bandas,¹⁰ *brackets*,⁴ elásticos de poliuretano³ e componentes acrílicos,¹¹ nenhum estudo avaliou a influência da fumaça de cigarro nesses fatores de virulência.

Dentre os diversos microrganismos que colonizam a boca e que podem fazer parte dos biofilmes formados sobre materiais ortodônticos, neste estudo, o *S. mutans* e a *C. albicans* foram avaliados quanto as suas capacidades de adesão e de formação do biofilme frente à presença de condensado de fumaça de cigarros, por serem entidades implicitamente associadas a algumas doenças orais.

O objetivo deste estudo foi analisar experimentalmente a capacidade de aderência e de formação do biofilme de *Streptococcus mutans* 6715 e *Candida*

albicans SC5314 na superfície de materiais ortodônticos na presença do condensado de fumaça de cigarros (CFC).

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

A cepa SC5314 de *Candida albicans* foi crescida em 50 mL de caldo YNB - Yeast Nitrogen Base® (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) a 37 °C, 100 rpm e normóxia. Após 24 h, as células foram centrifugadas e lavadas com solução salina estéril. As células foram ressuspensas até uma OD_{660nm} de 0,8 (Ultrospec™ 1100-*pro*, Amersham Biosciences®, Buckinghamshire, UK).¹² De forma análoga, a cepa 6715 de *Streptococcus mutans* foi crescida em 50 mL de infuso de cérebro e coração - caldo BHI (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) a 37 °C, 100 rpm e pCO₂ 10 %. Após 24 h, as células foram centrifugadas, lavadas com salina estéril e ressuspensas até uma OD_{660nm} de 1,0.¹³

Coleta de saliva estimulada

A participação dos voluntários foi condicionada à assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido, em concordância com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. As alíquotas de saliva (10 mL) foram coletadas de três voluntários adultos (28,7±10,7 anos) e sem qualquer doença sistêmica, que foram orientados a não se alimentar ou escovar os dentes por pelo menos duas horas antes das coletas. Tais coletas foram sempre conduzidas as 9:00 h a fim de minimizar os efeitos da variabilidade circadiana na composição da saliva.¹⁴ A estimulação salivar foi conduzida mecanicamente pela mastigação de secção de

tubos de silicone de 1 cm estéreis, por 5 min, após descarte da saliva residual secretada no primeiro minuto. As alíquotas foram misturadas para que a película fosse composta por um maior número de receptores.¹⁵ Logo após a coleta, a amostra foi resfriada em gelo e purificada por centrifugação ($10000 \times g$, 4 °C, 20 min) para remover as impurezas, como bactérias e restos de comida, e foi imediatamente usada.¹⁶

Coleta do condensado de fumaça de cigarro (CFC)

A coleta dos produtos voláteis resultantes contidos no CFC foi realizada pela lavagem da fumaça obtida da queima total de cinco cigarros com 10 mg/cig de alcatrão, 0,8 mg/cig de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono (Marlboro[®] KS Box, Philip Morris Ltd., Santa Cruz do Sul, Brazil), em uma *smoking machine*¹⁷ (Figura 1) contendo 100 mL de água destilada. A quantidade de cigarros e o volume de água foram determinados arbitrariamente a partir da presunção de que um tabagista consuma vinte cigarros num período de vigília de 16 h, com exclusão de 2,5 h. Os ensaios de adesão e de formação de biofilme foram conduzidos com concentração constante de CFC, dada a dificuldade experimental de mimetizar variações de concentração na saliva residual dos tabagistas de forma confiável. A escolha da marca de cigarro usada neste estudo foi baseada no fato de que tal marca é amplamente consumida em diversos países.¹⁸

A água contendo o CFC foi filtrada em membrana de poros 0,44 µm (Millipore, São Paulo, Brasil) imediatamente após a combustão dos cigarros. O filtrado foi fracionado em frascos estéreis que receberam iguais volumes de caldos YNB e BHI (concentrações duplas e estéreis). Uma parte do filtrado que não foi misturada aos caldos foi reservada para testes de aderência.

Interferência do CFC na adesão microbiana às superfícies

Diferentes materiais ortodônticos foram empregados na avaliação da aderência: (1) *brackets* de aço inoxidável, *slot* de 0.022" × 0.028", prescrição MBT™ para incisivo central superior direito (TP Orthodontics Inc., LaPort, IN); (2) secções de bandas de aço inoxidável GripTite Molar Bands® recortadas em secções de 0,10 × 3,80 × 7,00 mm (TP Orthodontics Inc., LaPort, IN); (3) ligaduras elásticas do tipo modular Super Slick® (TP Orthodontics Inc., LaPort, IN) e (4) tiras de resina acrílica Jet® de 0,10 × 4,00 × 7,00 mm (Artigos Odontológicos Clássico Ltda, São Paulo, Brazil). As dimensões reais de todos os materiais foram confirmadas com captura de imagem em microscópio de medição Nikon MM-40 com objetiva de 50 aumentos (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) e programa QC-4000 para Windows (Automation and Metrology Inc., Painesville, OH).

Os ensaios foram conduzidos com a realização de quatro tratamentos experimentais nos materiais: #1A) *S. mutans* 6715 vs CFC, #2A) *S. mutans* 6715 vs água destilada, #3A) *C. albicans* SC5314 vs CFC, e #4A) *C. albicans* SC5314 vs água destilada. Cada tratamento foi conduzido com quatro espécimes por material, em seis repetições independentes, perfazendo vinte e quatro testes. Os *blanks* foram constituídos de materiais recobertos por película adquirida que foram submetidos às mesmas condições experimentais, sem, contudo, receber os microrganismos.

Em placas de microtitulação fundo-chato de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), os diferentes materiais foram imersos em mistura de saliva clarificada por

10 min.¹⁵ Esses materiais foram lavados duas vezes com NaCl 145 mM estéril afim de remover a saliva que não formou película adquirida.

Nos tratamentos #1A e #2A, os materiais recobertos por película foram deixados em contato com a suspensão de *S. mutans* 6715 contendo 10^8 UFC/mL¹³ por 2 h, 37 °C, pCO₂ 10 % e 100 rpm.¹⁶ Para os tratamentos #3A e #4A, uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *C. albicans* SC5314 foi mantida em contato com os materiais,¹³ seguindo os mesmos parâmetros de incubação usados com *S. mutans* 6715.

As células aderidas foram fixadas com metanol 99% (Merck GmbH, Darmstadt, Alemanha) por 15 min. Os materiais foram secos ao ar e imersos em cristal violeta (CV) 0,5 % (Isofar Ltd., Rio de Janeiro, Brazil) por 20 min. O excesso de CV foi removido imergindo duas vezes os materiais em água destilada. Finalmente, o CV impregnado foi liberado pela adição de 250 µL de ácido acético 33 % (Merck GmbH, Darmstadt, Alemanha) e a OD_{590nm} foi determinada. Os valores de absorbância dos *blanks* foram subtraídos dos valores obtidos nos tratamentos para eliminar resultados espúrios decorrentes de interferência de fundo.¹⁹

Interferência do CFC na formação de biofilmes

Os ensaios de interferência na formação de biofilmes foram conduzidos com os materiais ortodônticos descritos anteriormente e submetidos a quatro tratamentos: #1B) *S. mutans* 6715 vs BHI-CFC, #2B) *S. mutans* 6715 vs BHI, #3B) *C. albicans* SC5314 vs YNB-CFC, e #4B) *C. albicans* SC5314 vs YNB. Cada tratamento foi conduzido com quatro espécimes por material, em seis repetições independentes, perfazendo vinte e quatro testes. Os *blanks* foram constituídos de

materiais recobertos por película adquirida que foram submetidos às mesmas condições experimentais, sem, contudo, receber os microrganismos.

Em placas de microtitulação fundo-chato de 96 poços os diferentes materiais recobertos por película adquirida¹⁵ foram deixados em contato com a suspensão de *S. mutans* 6715 contendo 10^8 UFC/mL¹³ por 2 h, 37 °C, pCO₂ 10 % e 100 rpm (tratamentos #1B e #2B).¹⁶ Para os tratamentos #3B e #4B, uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *C. albicans* SC5314 foi mantida em contato com os materiais,¹³ seguindo os mesmos parâmetros de incubação com *S. mutans*. Decorridos os tempos necessários para a adesão microbiana, os espécimes foram cuidadosamente lavados com NaCl 145 mM estéril e transferidos para poços de outra placa de microtitulação fundo-chato de 96 poços. Os poços foram preenchidos com caldo BHI-CFC (#1B), BHI (#2B), YNB-CFC (#3B) ou YNB (#4B). Os biofilmes foram formados em pCO₂ 10 % por 72 h, com cuidadosa troca dos caldos a cada 24 h.¹² Os caldos BHI e BHI-CFC não receberam adição de sacarose ou de qualquer outro açúcar para refletir uma realidade na qual o paciente não apresenta tais açúcares solubilizados na saliva de forma constante.

Os biofilmes formados após 72 h foram lavados duas vezes com NaCl 145 mM estéril.¹² Para a fixação, os materiais foram imersos em metanol 99% por 15 min. Os materiais foram secos ao ar e imersos em CV 0,5% por 20 minutos. O excesso de CV foi removido imergindo duas vezes os materiais em água destilada. Finalmente, o CV impregnado foi liberado pela adição de 250 µL de ácido acético 33 % e a OD_{590nm} foi determinada. Os valores de absorbância dos *blanks* foram subtraídos dos valores obtidos nos tratamentos para eliminar resultados espúrios decorrentes de interferência de fundo.¹⁹

Estatística

Os dados numéricos obtidos foram tabulados em planilhas eletrônicas Microsoft Excel[®] (Microsoft Co., Redmond, WA) e transferidos para a interface do pacote SPSS[®] 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Para se testar a hipótese nula de que quaisquer diferenças encontradas na adesão e na formação dos biofilmes eram decorrentes do acaso, esses dados foram testados quanto à sua normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à igualdade de variâncias pelo teste de Levene. Quando os pares “com e sem CFC” apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de Student; em casos de distribuição não-normal, foi empregado o teste *U* de Mann-Whitney. O valor *p* de 0,05 foi considerado limítrofe para a determinação de diferenças estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Para se avaliar o nível de interferência do CFC na adesão e na formação de biofilmes nas espécies em questão, as comparações entre os grupos experimentais (com CFC) e os controles (sem CFC) foram realizadas aos pares, de forma individualizada, por material. Não foram realizadas análises múltiplas simultâneas entre diferentes materiais. O desenho experimental proporcionou a obtenção de vinte e quatro resultados individuais oriundos das quadruplicatas ensaiadas em seis diferentes momentos. Entretanto, se buscou uma avaliação mais ampla, que foi concebida pela compilação dos dados obtidos nos diferentes materiais.

A adesão de *S. mutans* 6715 à película adquirida foi incrementada significativamente na presença do CFC ($p < 0,05$) para banda ($4,08 \times$), resina acrílica ($2,89 \times$) e *bracket* ($3,37 \times$) (figura 2); mas não para elástico, onde o CFC promoveu redução de adesão ($2,66 \times$) ($p = 0,03411$). Quando os dados são compilados, independentemente da natureza ou topografia do material, é perceptível o incremento nas médias das taxas de adesão ($p < 0,00001$). Quando os valores médios são comparados, se constata que eles são relativamente maiores para banda e resina acrílica. A somatória das áreas das faces livres para adesão nos espécimes de banda (média de 5 espécimes) e de resina acrílica (média de 5 espécimes) apresentava $27,6 \pm 0,8 \text{ mm}^2$, ao passo que os *brackets* (média de 5 espécimes) tinham $21,4 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ de área exposta total e os elásticos apresentavam $6,7 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ (média de 5 espécimes). Como a área dos *brackets* era menor que a das bandas e a da resina, é possível declarar que os maiores valores de adesão nesses últimos foram decorrentes de maiores superfícies para a adesão.

De maneira diversa à adesão, a exposição continuada ao CFC durante a formação de biofilme de *S. mutans* 6715 levou a um maior crescimento populacional somente nas superfícies de *brackets* ($1,60 \times$; $p = 0,02727$) (Figura 3). Os biofilmes formados sobre as superfícies livres em banda, em resina acrílica e em elástico não mostraram discrepâncias em relação à presença ou não de CFC ($p > 0,05$). A análise pós-compilação dos dados mostrou que o CFC tende a participar positivamente na formação de biofilme de *S. mutans* 6715 ($p = 0,00638$); contudo, há que se ressaltar que tal fenômeno foi influenciado diretamente pela

formação de biofilme nos *brackets*, uma vez que os valores p para bandas e elásticos foram iguais ou maiores que 0,17386 e, portanto, não devem ter tomado parte como influentes.

A figura 4 mostra que o CFC deve ser um facilitador para a adesão de *C. albicans* SC5314 aos diversos materiais analisados. A análise dos dados compilados revelou que em média, ocorreu um aumento na taxa de adesão de 618,99 % ($p < 0.00001$). As taxas de incremento na adesão foram de 1,81 \times para banda ($p = 0,00489$); 9,61 \times para *bracket* ($p < 0.00001$); 29133 \times para elástico ($p < 0.00001$) e 177 \times para resina acrílica ($p < 0.00001$).

O CFC promoveu maior formação de biofilme de *C. albicans* SC5314 em resina acrílica (2,13 \times ; $p = 0,00513$) e em *brackets* (2,32 \times ; $p = 0,00031$) (Figura 5). Como a formação de biofilmes na presença de CFC se mostrou, presumidamente, não dependente da extensão superficial dos materiais, foi conduzida a análise empregando o teste U de Mann-Whitney, onde foram comparados os diferentes materiais sob mesma influência ambiental. Os resultados revelaram que os biofilmes dos *brackets* expostos ao CFC se mostraram mais densamente colonizados que aqueles das bandas e dos espécimes de elástico ($p \leq 0,03891$), mas não em relação à resina acrílica ($p = 0,1967$). Os resultados para biofilmes de *C. albicans* SC5314 formados sem influência do CFC se apresentaram menos variáveis ($p \geq 0,79632$).

Embora não existam evidências da influência do CFC no incremento de biofilme fúngico sobre superfícies de banda e de elástico ($p \geq 0,06275$), quando

compilados, os resultados mostram que o CFC é um interferente a ser considerado.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que o CFC, e conseqüentemente, o tabagismo, exercem influência nos perfis de colonização e de formação de biofilme das duas entidades analisadas sobre materiais ortodônticos. Essa influência pode ser tanto positiva, como observada para a maioria dos materiais, quanto negativa, como na adesão de *S. mutans* 6715 em elásticos de poliuretano e formação de biofilme em resina acrílica; contudo, quando da generalização dos resultados, é clara a observação de que o CFC modula positivamente esses atributos de virulência.

De nosso conhecimento, não existe qualquer publicação na qual se tenha avaliado o papel do tabaco na adesão de bactérias às superfícies abióticas orais, o que torna nosso estudo pioneiro nesse tópico. Os estudos publicados prospectaram a influência da fumaça de cigarros e da nicotina na adesão aos tecidos moles.^{20,21} A observação do incremento na adesão de *S. mutans* 6715 em *brackets* e bandas é preocupante, pois esses dispositivos permanecem em íntimo contato com as superfícies de esmalte. Além disso, em um paciente que apresenta alta densidade de colonização salivar por cocos cariogênicos, com $\geq 10^6$ UFC/mL, implicaria em desequilíbrio na competição com bactérias não-cariogênicas por sítios de ligação, com significativa elevação no risco de cárie.²²

A constatação de que o *S. mutans*, além de ter sua adesão facilitada, também tende a formar um biofilme mais colonizado nas superfícies de *brackets*

sob influência do CFC, piora o prognóstico, principalmente se o paciente tiver uma dieta rica em carboidratos fermentáveis, que aumentará sua competitividade frente a outros colonizadores.²² Os *brackets*, com sua arquitetura complexa⁵ e nichos retentivos¹ podem reduzir, ou mesmo, anular a *shear force* (“força de lixiviamento”) hidrodinâmica, o que favorece a maior formação de biofilme.²³ Neste microcosmo, componentes do CFC, tais como a nicotina, atuam em colônias da bactéria que tiveram seus diâmetros aumentados quando em atmosfera repleta por fumaça de cigarro, como recentemente demonstrado.²⁴ Embora a nicotina e seu principal metabólito, a cotinina, não incrementem o crescimento de estreptococos colonizadores primários²⁵, é sabido que esse alcalóide, em determinadas concentrações, pode estimular o processo de divisão celular de estreptococos do grupo mutans²⁶ e é plausível que tal fato pode estar intimamente associado ao aumento populacional nos biofilmes aqui analisados.

Por outro lado, não é possível tratar tal fenômeno como unanimidade, uma vez que a taxa de adesão não necessariamente esteve implicada em maior ou menor formação de biofilme sobre todos os materiais ortodônticos. Em resina acrílica, o padrão de crescimento do biofilme não refletiu um esperado incremento em função da adesão diferenciada; tampouco em elástico e banda. Nós postulamos que a topografia lisa desses materiais pode ser determinante para a falta de estabilização da densidade celular dos biofilmes, não importando se estão ou não sob influência do CFC.

A inclusão de *C. albicans* neste estudo se deu pelo fato de que, embora a mesma pareça não estar diretamente envolvida na etiologia da cárie dental, tampouco, a presença de aparelhos ortodônticos seja fator de predisposição à

candidose, estes poderiam servir como reservatórios para o fungo. A favor dessa premissa, é sabido que durante o período de contenção ortodôntica, a presença de resina acrílica é fator determinante para a elevação nas populações fúngicas na boca.²⁷

O CFC incrementou a adesão de *C. albicans* SC5314 em todos os materiais ($p \leq 0,00489$), sendo que em materiais não metálicos esse incremento foi muito significativo. Existem indícios de que a película adquirida formada sobre superfícies rígidas intra-orais possa interferir negativamente na adesão de *Candida* spp.²⁸ Nossos resultados corroboram com tal observação, principalmente em resina acrílica e em elástico. É possível que o CFC tenha cancelado as forças repulsivas existentes na película ou que tenha alterado propriedades da parede celular da *C. albicans* SC5314, tornando-a menos hidrofóbica e, conseqüentemente, mais apta à adesão nessas superfícies condicionadas. Essa constatação ganha importância quando estabelecemos que os diferentes materiais ortodônticos permanecem recobertos por película adquirida durante todo tempo de uso e que o consumo de cigarros pode subverter a inabilidade de adesão da levedura, como visto em não fumantes.

Ainda que sem significância estatística, uma vez que as células dos grupos sem CFC tenham aderido às superfícies condicionadas e encontrado condições ambientais favoráveis e similares, os biofilmes de *C. albicans* SC5314 se desenvolvem e atingem densidades celulares proporcionais às áreas disponíveis nos substratos, o que indica tendência de uniformidade de crescimento, diferente daquele visto para *S. mutans* 6715. É possível que tal uniformidade seja parcialmente decorrente das variações morfológicas encontradas no interior de

biofilmes formados sobre superfícies abióticas com aparecimento de hifas e pseudohifas em meio a matriz polimérica extracelular.²⁹ Essa arquitetura mais complexa que aquela dos biofilmes bacterianos pode ser responsável por uma maior resistência a *shear force* hidrodinâmica, resultando em biofilmes de crescimento mais constante. As taxas de desenvolvimento do biofilme na presença de CFC seguem padrão mais variado, sendo maiores em *brackets* e em resina acrílica ($p \leq 0,00513$). É plausível que o aumento nas densidades celulares dos biofilmes formados nesses dois materiais pode ser decorrência dos maiores valores de adesão obtidos em *brackets* e em resina acrílica, respectivamente.

Do ponto de vista clínico, a possibilidade dos diferentes materiais ortodônticos servirem como reservatórios para *Candida* spp. é alvo de discussão.³⁰⁻³² Os resultados alusivos à interferência do CFC nas propriedades de adesão e de formação de biofilme fúngico aqui reportados vem a contribuir, mostrando que o tabagismo pode exercer efeito aditivo na persistência das leveduras.

Alguns pontos dos experimentos podem ter influenciado de forma diversa a realidade e devem ser apresentados. (1) Os biofilmes avaliados neste estudo são monoespecíficos e certamente não refletem fielmente a realidade do microcosmo da microbiota oral; mas, permitem analisar o comportamento individualizado de dois microrganismos com características muito distintas e que são determinantes para o desenvolvimento de doenças. Estudos posteriores envolvendo biofilmes multiespecíficos e que permitam a coagregação de espécies devem ser levados a termo para se aprofundar no entendimento da dinâmica de formação dos biofilmes, sua fisiologia e seu subsequente papel etiopatogênico. (2) As amostras

de saliva aqui empregadas são provenientes de voluntários não-tabagistas. É perfeitamente possível que isso reflita na composição ou nas propriedades de recobrimento por película adquirida. Contudo, de nosso conhecimento, não existem estudos que suportem diferenças entre películas adquiridas de tabagistas e não-tabagistas. Assim como estabelecido acima, posteriormente, salivas de tabagistas devem ser utilizadas num experimento-espelho a fim de se confirmar ou refutar a hipótese de que isso é um viés a ser considerado. (3) O dispositivo construído para a coleta do CFC pode não ter coletado toda a fumaça resultante da queima dos cigarros; contudo, acreditamos que isso não deva ser relevante, pois mesmo na boca a saliva não retém a totalidade de fumaça inalada. (4) Não houve qualquer condicionamento celular com sub-cultivos prévios na presença de CFC. Embora tal presunção possa ser pertinente, acreditamos que as adaptações fenotípicas decorrentes podem também ocorrer durante a exposição momentânea ao CFC. Experimentos posteriores que respeitem tal pressuposto podem elucidar a importância da adaptação fenotípica. (5) Cabe enfatizar que esses resultados foram obtidos exclusivamente por experimentos laboratoriais e estudos que avaliem esses mesmos parâmetros devem ser conduzidos, a partir de bactérias e leveduras isoladas de voluntários tabagistas crônicos.

CONCLUSÕES

Nossos resultados, quando analisados em conjunto, indicam que a fumaça de cigarro que entra em contato com células de *S. mutans* e *C. albicans* pode interferir nas propriedades de adesão e formação do biofilme desses microrganismos aos diversos materiais que compõem o arsenal ortodôntico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahn SJ, Lim BS, Yang HC, Chang YI. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *Angle Orthod* 2005; 75:666-71.
2. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007; 131:736-41.
3. Magno AFF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Faria G, Nelso-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133:104-9.
4. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod* 2007; 77:1090-5.
5. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133:882-8.
6. Maijala M, Rautemaa R, Järvensivu A, Richardson M, Salo T, Tjäderhane L. *Candida albicans* does not invade carious human dentine. *Oral Dis* 2007; 13:279-84.
7. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, Setijanto D, Hamada T. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; 46:471-8.

8. Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. *Eur J Orthod* 2004; 26:623-9.
9. Arslan SG, Akpolat N, Kama JD, Ozer T, Hamamci O. One-year follow-up of the effect of fixed orthodontic treatment on colonization by oral *Candida*. *J Oral Pathol Med* 2008; 37:26-9.
10. Menzaghi N, Saletta M, Garattini G, Brambilla E, Strohmer L. Changes in the yeast oral flora in patients in orthodontic treatment. *Prev Assist Dent* 1991; 17:26-30.
11. Maruo IT, Rosa EAR, Maruo H, Tanaka O, Guariza Filho O, Ignácio AS, Camargo ES. Effect of chlorhexidine mouth rinse on streptococci counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthod Craniofac Res* 2008; 11:136-42.
12. Mendes A, Mores AU, Carvalho AL, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EAR. *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30:1813-15.
13. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008; 72:157-65.
14. Ahn SJ, Lim BS, Lee YK, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic adhesives. *Angle Orthod* 2006; 76:869-75.

15. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DL. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 1986; 52:555-61.
16. Teixeira EH, Napimoga MH, Carneiro VA, Oliveira TM, Cunha RMS, Havt A, Martins JL, Pinto VPT, Gonçalves RB, Cavada BS. In vitro inhibition of streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *J Appl Microbiol* 2006; 101:111-16.
17. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13915-20.
18. Melikian AA, Mirjana VD, Chen S, Richie J, Stellma SD. Effect of delivered dosage of cigarette smoke toxins on the levels of urinary biomarkers of exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:1408-15.
19. Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, Ducan MJ, Smith DJ. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4586-92.
20. Teughels W, Van Eldere J, Van Steenberghe D, Cassiman JJ, Fives-Taylor P, Quirynen M. Influence of nicotine and cotinine on epithelial colonization by periodontopathogens. *J Periodontol* 2005; 76:1314-22.
21. Ozlu T, Celik I, Oztuna F, Bulbul Y, Ozsu S. *Streptococcus pneumoniae* adherence in rats under different degrees and durations of cigarette smoke. *Respiration* 2008; 75:339-44.

22. Kreth J, Merritt J, Zhu L, Shi W, Qi F. Cell density- and ComE-dependent expression of a group of mutacin and mutacin-like genes in *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett 2006; 265:11-7.
23. Liu Y, Tay JH. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. Water Res 2002; 36:1653-65.
24. Zonuz AT, Rahmati A, Mortazavi H, Khashabi E, Farahani RM. Effect of cigarette smoke exposure on the growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. Nicotine Tob Res 2008; 10:63-7.
25. Cogo K, Montan MF, Bergamaschi C de C, D Andrade E, Rosalen PL, Groppo FC. In vitro evaluation of the effect of nicotine, cotinine, and caffeine on oral microorganisms. Can J Microbiol 2008; 54:501-8.
26. Keene K, Johnson RB. The effect of nicotine on growth of *Streptococcus mutans*. Miss Dent Assoc J 1999; 55:38-9.
27. Arendorf T, Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. J Clin Periodontol 1985; 12:360-8.
28. Jones DS, McGovern JG, Adair CG, Woolfson AD, Gorman SP. Conditioning film and environmental effects on the adherence of *Candida* spp. to silicone and poly (vinylchloride) biomaterials. J Mater Sci Mater Med 2001; 12:399-405.
29. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun 1994; 62:915-21.

30. Addy M, Shaw WC, Hansford P, Hopkins M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *Br J Orthod* 1982; 9:158-63.
31. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod* 2007; 77:331-6.
32. Lee W, Low BK, Samaranayake LP, Hagg U. Genotypic variation of *Candida albicans* during orthodontic therapy. *Front Biosci* 2008; 13:3814-24.

FIGURAS

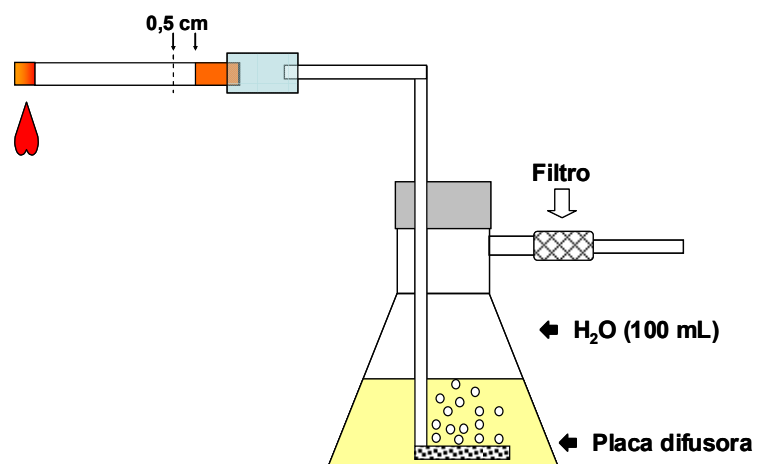


Figura 1. Esquema da *smoking-machine* utilizada.

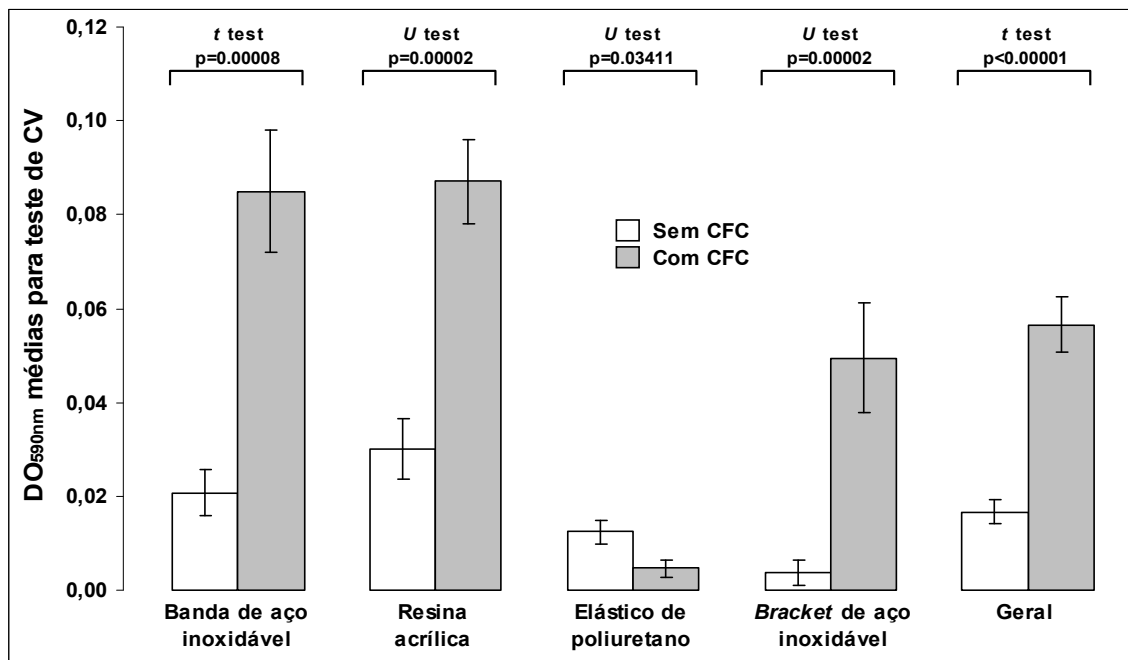


Figura 2. Adesão diferencial de *S. mutans* 6715 em materiais ortodônticos recobertos por película adquirida em presença de condensado de fumaça de cigarros (CFC).

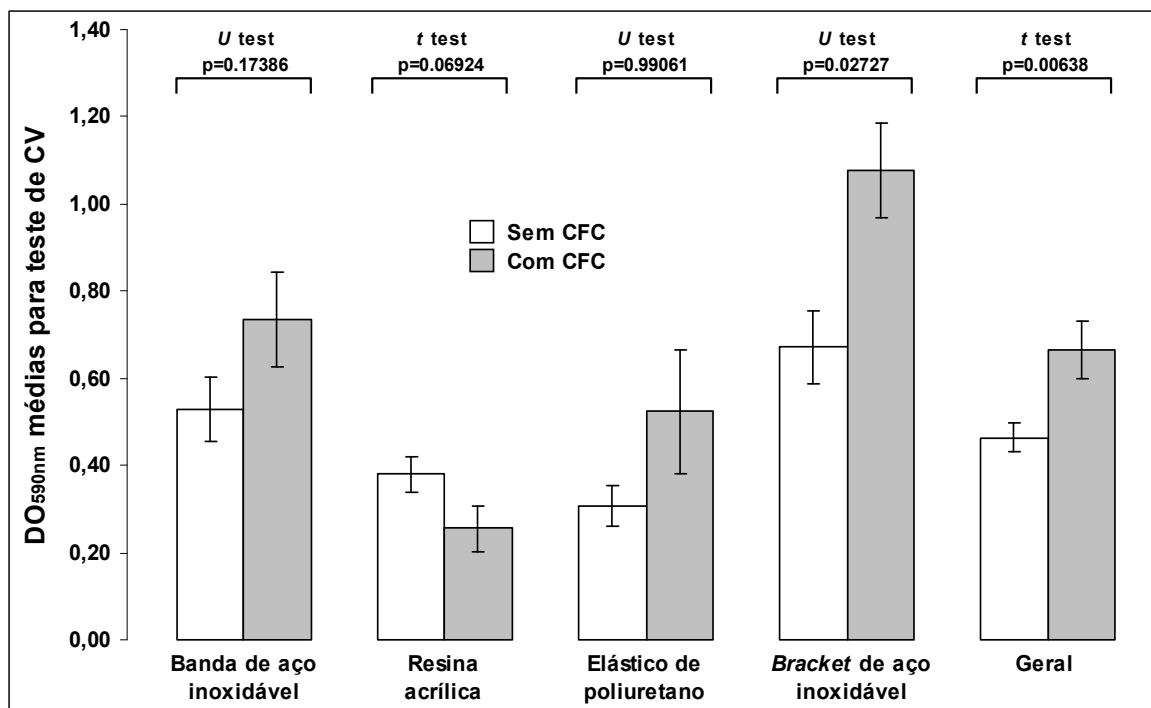


Figura 3. Formação diferencial de biofilme de *S. mutans* 6715 em materiais ortodônticos recobertos por película adquirida em presença de condensado de fumaça de cigarros (CFC).

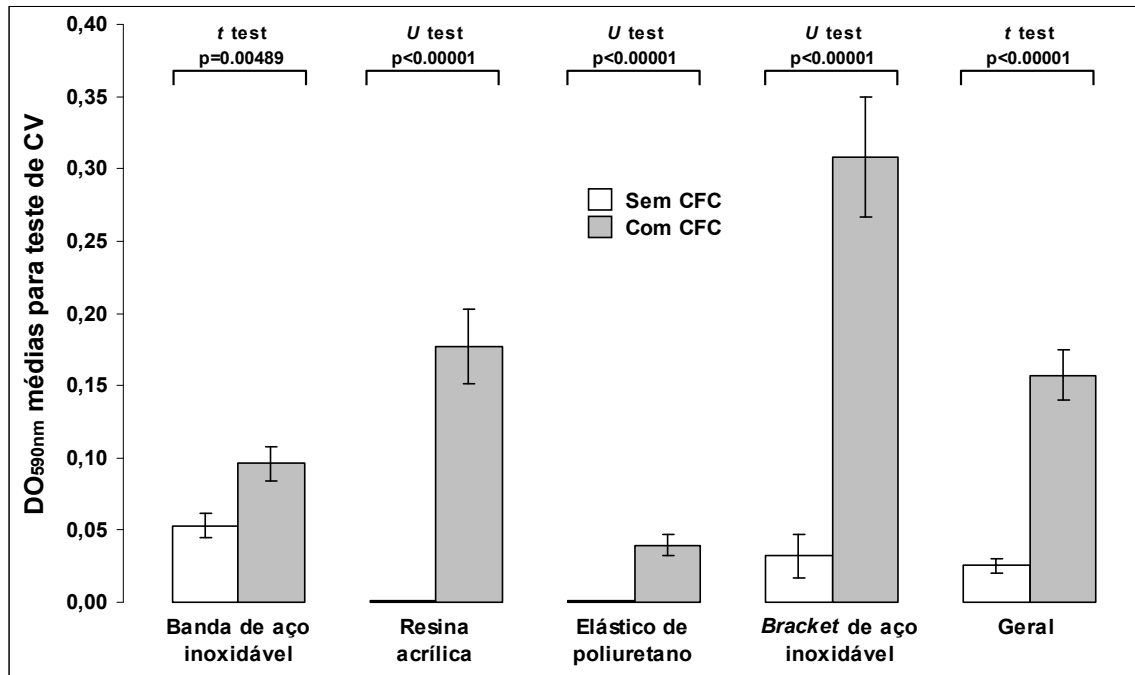


Figura 4. Adesão diferencial de *C. albicans* SC5314 em materiais ortodônticos recobertos por película adquirida em presença de condensado de fumaça de cigarros (CFC).

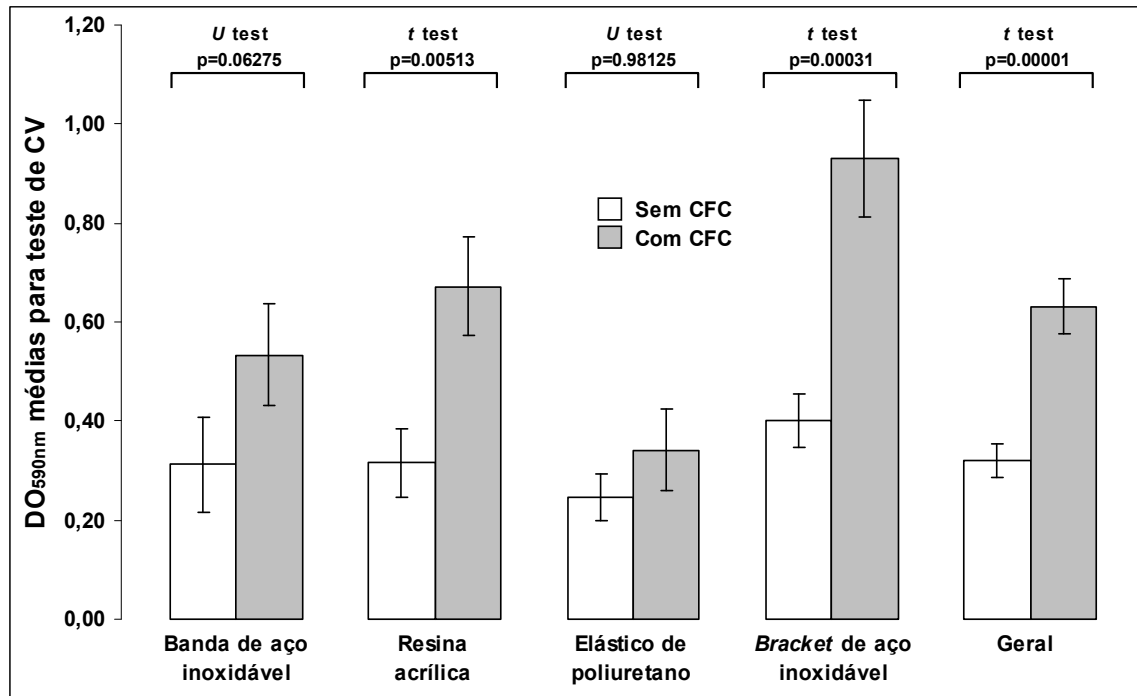


Figura 5. Formação diferencial de biofilme de *C. albicans* SC5314 em materiais ortodônticos recobertos por película adquirida em presença de condensado de fumaça de cigarros (CFC).

2- ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation upon orthodontic materials.

Fernanda Brasil Baboni, BDS.
Graduate Program in Dentistry – Orthodontics
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, PharmB, MSc, PhD.
Senior Professor, Graduate Program in Dentistry – Oral Biosciences
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Odilon Guariza Filho, BDS, MSc, PhD.
Associate Professor, Graduate Program in Dentistry – Orthodontics
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Andréa Novais Moreno, BiolB, AdvDiplomMorphol, MSc, PhD.
Associate Professor, Graduate Program in Health Sciences
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Corresponding author:

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, PharmB, MSc, PhD.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, CCBS.
Rua Imaculada Conceição, 1155
80.215-901 – Curitiba-PR – Brasil
Fone: 55 41 3271-1637 / Fax: 55 41 3271-1405
e-mail: edvaldo.rosa@pucpr.br

ABSTRACT

Introduction: An experimental analysis was made in order to quantify the adherence rates and biofilm formation capacity of *Streptococcus mutans* 6715 and *Candida albicans* SC5314 on orthodontic material surfaces in the presence of cigarette smoke condensate (CSC). **Methods:** Metal brackets, bands, acrylic resin and polyurethane elastic rings were coated with stimulated saliva and submitted to adhesion and biofilm formation tests in the absence and presence of CSC in a dynamic system. **Results:** The CSC increased *S. mutans* 6715 adhesion to the acquired pellicle ($p<0.05$) for bands (4.08×), acrylic resin (2.89×) and brackets (3.37×) and reduced it in polyurethane elastic (2.66×; $p<0.05$). *S. mutans* 6715 biofilm biomass was only increased by CSC on brackets (1.60×; $p<0.05$). In the presence of CSC, *C. albicans* SC5314 adhesion increased ($p<0.05$) on bands (1.81×), brackets (9.61×), elastics (29133×) and acrylic resin (177×). Greater *C. albicans* SC5314 biofilm formation induced by CSC ($p<0.05$) was observed on acrylic resin (2.13×) and brackets (2.32×). **Conclusion:** When the results of the present study were analyzed in conjunction, they indicated that cigarette tobacco smoke is capable of interfering on the adhesion and biofilm formation of these microorganisms to various orthodontic materials.

Key Words: *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, Orthodontic materials, Tobacco smoking, Adhesion, Biofilm.

INTRODUCTION

Dental caries is one of the undesirable effects of orthodontic therapy, and can affect up to 50 % of patients.¹⁻³ *Streptococcus mutans* is the bacterium most commonly associated with the development of cavities and presents good capacity for adhesion and growth on orthodontic material surfaces.^{4, 5}

Although there is no consensus,⁶ there are indications, albeit experimental, that *Candida albicans* may also participate in carious processes.⁷ In spite of the polemic surrounding the subject, it is known that the insertion of fixed orthodontic appliances alters the oral ecological parameters with subsequent elevation in the *Candida* spp. counts.^{8,9}

Although some groups have investigated the adhesion of microorganisms and biofilm formation on bands,¹⁰ brackets,⁴ polyurethane elastics³ and acrylic components,¹¹ no study has evaluated the influence of cigarette smoke on these virulence factors.

Among the various microorganisms that can take part on biofilms formed on orthodontic materials, in this study, *S. mutans* and *C. albicans* were evaluated with regard to their adhesion and biofilm formation capacities in the presence of cigarette smoke condensate, because they are entities implicitly associated with several oral diseases.

The aim of this study was to make an experimental analysis of the adherence and biofilm formation capacity of *Streptococcus mutans* 6715 and *Candida albicans* SC5314 on orthodontic material surfaces in the presence of cigarette smoke condensate (CSC).

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

Candida albicans SC5314 was grown in 50 mL of Yeast Nitrogen Base[®] (YNB) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) at 37 °C, 100 rpm and normoxic conditions. After 24 h, the cells were centrifuged and washed in sterile 145 mM NaCl. The cells were re-suspended up to an OD_{660nm} of 0.8 (Ultrospec™ 1100-*pro*, Amersham Biosciences[®], Buckinghamshire, UK).¹² In a similar manner, *Streptococcus mutans* 6715 was grown in 50 mL of brain heart infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) at 37 °C, 100 rpm and pCO₂ 10 %. After 24 h, the cells were centrifuged, washed with sterile 145 mM NaCl, and re-suspended up to an OD_{660nm} of 1.0.¹³

Collection of stimulated saliva

The volunteers' participation in the project was subject to signing a term of free and informed consent, in accordance with the guidelines of the Ethics Committee on Research in Human Beings of the Pontifical Catholic University of Paraná. The aliquots of saliva (10 mL) were collected from three adult volunteers (28.7±10.7 years), without any systemic disease, who were instructed not to eat or brush their teeth for at least two hours before the collections. These collections were always made at 9:00 h in order to minimize the effects of circadian variability on saliva composition.¹⁴ Salivary stimulation was conducted mechanically by chewing 1 cm sections of sterile silicone tubes for 5 min, after discarding the residual saliva secreted in the first minute. The aliquots were mixed to form an acquired pellicle with a greater number of receptors.¹⁵ Right after collections, the

samples were cooled on ice and purified by centrifugation ($10000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min) to remove the impurities, such as bacteria and food remainders, and were used immediately.¹⁶

Collection of cigarette smoke condensate (CSC)

The collection of the resultant volatile products contained in the CSC was performed by washing the smoke obtained from the complete burn of five cigarettes with 10 mg/cig of tar, 0.8 mg/cig of nicotine and 10 mg of carbon monoxide (Marlboro[®] KS Box, Philip Morris Ltd., Santa Cruz do Sul, Brazil), in an in house smoking machine¹⁷ (Figure 1) containing 100 mL of distilled water. The quantity of cigarettes and the volume of water were determined arbitrarily on the assumption that a smoker consumes twenty cigarettes in a 16 h period of being awake, excluding 2.5 h. The adhesion and biofilm formation tests were conducted with a constant concentration of CSC, given the experimental difficulty of reliably mimicking variations of concentration in the residual saliva of smokers. The choice of the brand of cigarette used in this study was based on the fact that it is widely smoked worldwide.¹⁸

The water containing the CSC was filtered through a $0.44\text{ }\mu\text{m}$ pore membrane (Millipore, São Paulo, Brazil) immediately after the cigarettes were burned. The filtrate was fractioned into sterile flasks that received equal volumes of sterile YNB and BHI doubled concentrated. One part of the filtrate was not mixed with the broths, and was reserved for the adherence tests.

Influence of CSC on microorganisms adhesion to the surfaces

Different orthodontic materials were used to evaluate adherence: (1) stainless steel brackets, 0.022" × 0.028" slot, prescription MBT for maxillary right central incisor (TP Orthodontics Inc., LaPort, IN); (2) strips of stainless steel GripTite Molar Bands[®] cut into sections of 0.10 × 3.80 × 7.00 mm (TP Orthodontics Inc., LaPort, IN); (3) elastic ligatures of the modular Super Slick[®] type (TP Orthodontics Inc., LaPort, IN) and (4) strips of Jet[®] acrylic resin measuring 0.10 × 4.00 × 7.00 mm (Classico Ltd, São Paulo, Brazil). The real dimensions of all materials were confirmed after image capturing using a Nikon MM-40 measuring microscope (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) under 50-fold magnification. The images were processed by the metronics software QC-4000 for Windows (Automation and Metrology Inc., Painesville, OH).

The tests were conducted by performing four experimental treatments on the materials: #1A) *S. mutans* 6715 vs CSC, #2A) *S. mutans* 6715 vs distilled water, #3A) *C. albicans* SC5314 vs CSC, and #4A) *C. albicans* SC5314 vs distilled water. Each treatment was conducted with four specimens per material, in six independent repetitions, totaling twenty-four tests. Blanks consisted of materials covered solely by acquired pellicle, which were submitted to the same experimental conditions, however, without receiving the microorganisms.

On flat-bottomed 96-well microtitration plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) the different materials were immersed in a mixture of clarified saliva

for 10 min.¹⁵ The materials were washed twice with sterile 145 mM NaCl in order to remove the excesses of saliva that did not take part on acquired pellicle formation.

In treatments #1A and #2A, the film-coated materials were left in contact with the suspension of *S. mutans* 6715 containing 10^8 CFU/mL¹³ for 2 h, 37 °C, pCO₂ 10 % and 100 rpm.¹⁶ For treatments #3A and #4A, a suspension containing 10^7 CFU/mL of *C. albicans* SC5314 was kept in contact with the materials,¹³ following the same incubation parameters as those used for *S. mutans* 6715.

The adhered cells were fixed with 99% methanol (Merck GmBh, Darmstadt, Germany) for 15 minutes. The materials were air dried and immersed in crystal violet (CV) 0.5 % (Isofar Ltd., Rio de Janeiro, Brazil) for 20 minutes. The excess CV was removed by immersing the materials in distilled water twice. Finally, the impregnated CV was released by the addition of 250 µL of 33 % acetic acid (Merck GmBh, Darmstadt, Germany) and the OD_{590nm} was determined. The absorbance values of the blanks were subtracted from the values obtained in the treatment in order to eliminate spurious results derived from background interference.¹⁹

Interference of CSC on biofilm formation

The tests for interference in biofilm formation were conducted with the previously described orthodontic materials, submitted to four treatments: #1B) *S. mutans* 6715 vs BHI-CSC, #2B) *S. mutans* 6715 vs BHI, #3B) *C. albicans* SC5314 vs YNB-CSC, and #4B) *C. albicans* SC5314 vs YNB. Each treatment was conducted with four specimens per material, in six independent repetitions, totaling twenty-four tests. Blanks consisted of materials covered by acquired pellicle, which

were submitted to the same experimental conditions, however, without receiving the microbial loadings.

On flat-bottomed 96-well microtitration plates the different materials covered by acquired pellicle¹⁵ were left in contact with the suspension of *S. mutans* 6715 containing 10^8 CFU/mL¹³ for 2 h, 37 °C, pCO₂ 10 % and 100 rpm (treatments #1B and #2B).¹⁶ For treatments #3B and #4B, a suspension containing 10^7 CFU/mL of *C. albicans* SC5314 was kept in contact with the materials,¹³ following the same incubation parameters as those for *S. mutans*. After the time required for microbial adhesion had elapsed, the specimens were carefully washed with sterile 145 mM NaCl and transferred to wells on another flat-bottomed 96-well microtitration plate. The wells were filled with BHI-CSC (#1B), BHI (#2B), YNB-CSC (#3B) or YNB (#4B) broth. The biofilms were formed in pCO₂ 10 % for 72 h, with careful changes of broth every 24 h.¹² The BHI and BHI-CSC broths did not receive the addition of sucrose or any other sugar, to reflect a reality in which the patient does not constantly present such sugars in the saliva.

The biofilms formed after 72 h were washed twice with sterile 145 mM NaCl.¹² The materials were immersed in 99% methanol for 15 min. The materials were air dried and immersed in 0.5% CV for 20 min. The excess of CV was removed by immersing the materials in distilled water twice. Finally, the impregnated CV was released by the addition of 250 µL of 33 % acetic acid and the OD_{590nm} was determined. The absorbance values of the blanks were subtracted from the values obtained in the treatment in order to eliminate spurious results derived from background interference.¹⁹

Statistics

The numerical data obtained were tabulated in Microsoft Excel[®] spreadsheets (Microsoft Co., Redmond, WA) and transferred to the SPSS[®] 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) package interface. The results were tested regarding to the normality of distribution by Kolmogorov-Smirnov test, and the equality of variances, by Levene test. When the pairs “with and without CSC” presented normal distribution, the Student *t* test was used; in cases of non-normal distribution, the Mann-Whitney *U*-test was employed. The *p* value of 0.05 was considered the threshold for determining statistically significant differences.

RESULTS

To evaluate the level of interference of CSC in the adhesion and biofilm formation by the microorganisms here studied, the comparisons between the experimental groups (with CSC) and controls (without CSC) were performed in pairs, individually, by material. No simultaneous, multiple analyses were performed between different materials. A broader evaluation was intended and conceived by compiling the data obtained for the different materials.

The adhesion of *S. mutans* 6715 to acquired pellicle was significantly incremented in the presence of CSC ($p < 0.05$) for band (4.08 ×), acrylic resin (2.89 ×), and bracket (3.37 ×) (Figure 2); but not for polyurethane elastic, in which CSC promoted a reduction in adhesion (2.66 ×) ($p = 0.03411$). When the data were compiled, independently the nature or topography of the material, there is a perceptible increment in the mean rates of adhesion ($p < 0.00001$). When the mean values were compared, it was possible to observe that they were relatively

higher for band and acrylic resin. The total area of the surfaces free for adhesion of bands (mean of 5 specimens) and acrylic resin stripes (mean of 5 specimens) presented $27.6 \pm 0.8 \text{ mm}^2$, whereas the brackets (mean of 5 specimens) had a total exposed area of $21.4 \pm 1.3 \text{ mm}^2$, and the polyurethane elastic had $6.7 \pm 0.6 \text{ mm}^2$ (mean of 5 specimens). As the brackets had a smaller area compared to bands and resin, it is possible to state that the higher adhesion values in the last two were the result of larger surfaces for adhesion.

In other hand, the continued exposure of *S. mutans* 6715 to CSC lead to a greater biofilm growth on the bracket surfaces ($1.60 \times$; $p = 0.02727$) (Figure 3). The biofilms formed on bands, acrylic resin stripes, and polyurethane elastic showed no discrepancies whether there was presence of CSC or not ($p > 0.05$). Post-compilation analysis of the data showed that CSC tended to participate positively in the biofilm formation of *S. mutans* 6715 ($p = 0.00638$); however, the phenomenon was directly influenced by biofilm formation on brackets, since p values for bands and polyurethane elastics were equal or greater than 0.17386, and therefore, must not have participated as influencing factors.

Figure 4 shows that CSC must be an enhancer for *C. albicans* SC5314 adhesion to the different evaluated materials. Analysis of the compiled data revealed that in average, an increase of 618.99 % ($p < 0.00001$) occurred in the adhesion rate. The rates of increment in adhesion were 1.81 higher (band; $p = 0.00489$); 9.61 higher (bracket; $p < 0.00001$); 29133 higher (elastic; $p < 0.00001$), and 177 higher (acrylic resin; $p < 0.00001$).

CSC promoted greater enhancement on candidal biofilm formation on acrylic resin ($2.13 \times$; $p = 0.00513$) and brackets ($2.32 \times$; $p = 0.00031$) (Figure 5). As biofilm formation in the presence of CSC was, presumably, not dependent on the extent of the material surfaces, analyses were performed, using the Mann-Whitney *U*-test, in which the different materials were compared under the same environmental influence. The results showed that the biofilms of the brackets exposed to CSC were more densely colonized than bands and elastic specimens ($p \leq 0.03891$), but not in comparison with acrylic resin ($p = 0.1967$). The results for biofilms of *C. albicans* SC5314 formed without the influence of CSC were less variable ($p \geq 0.79632$).

Although there are no statistical significance to the role of CSC on the increment of fungal biofilm on band and elastic surfaces ($p \geq 0.06275$), when compiled, the results showed that CSC is an interferer to be considered.

DISCUSSION

The results of this study showed that CSC, and consequently, the habit of smoking have a dual influence on the profiles of adhesion and biofilm formation on orthodontic materials for the two entities analyzed. This influence may be positive as observed for the most materials, or negative as for streptococcal adhesion to polyurethane elastic and biofilm formation on acrylic resin. However, when overall data is analyzed it is clearly observed that CSC positively modulates these attributes of virulence.

To our knowledge, this is the first report of enhancement of microbial adhesion to abiotic oral surfaces mediated by tobacco. Previous published studies have only prospected the influence of cigarette smoke and nicotine on adhesion to soft tissues.^{20,21} The increment in adhesion of *S. mutans* 6715 to brackets and bands is worry worthy, since these devices remain in close contact with the teeth enamel surfaces. In patients undergoing a salivary density of cariogenic cocci $\geq 10^6$ CFU/mL it would involve an imbalance in the competition with non-cariogenic bacteria for binding sites, with significant rise in caries risk.²²

The evidence that *S. mutans* adhesion is not only facilitated, but also tends to form more colonized biofilms on bracket surfaces under the influence of CSC, aggravates the prognosis, specially if the patient's diet is rich in fermentable carbohydrates, which increases its competitiveness with other colonizers.²² Brackets, with their complex architecture⁵ and retentive niches¹ may reduce, or even annul the hydrodynamic shear forces favoring a greater biofilm formation.²³ As recently demonstrated for a closely related species, CSC components (e.g. nicotine) may act on colony microcosm promoting the increase of its diameter.²⁴ Although nicotine and its main metabolite, cotinine, do not increase the growth rates of early colonizer streptococci,²⁵ it is also known that at certain concentrations, nicotine can stimulate the cell division process of mutans streptococci²⁶ and it is plausible to propose that this could be closely associated with the population increment in biofilms here analyzed.

On the other hand, it is not possible to assume that this phenomenon is unanimous, since the adhesion rate was not necessarily involved in the greater or smaller biofilm formation on all the orthodontic materials. For acrylic resin stripes,

polyurethane elastics, and bands the patterns of biofilm growth did not reflect any expected decline or increment resulting from adhesion. We postulated that the smooth topography of these materials may be determinant for the lack of stabilization in biofilm cell densities, independently whether they are under the CSC influence, or not.

Despite *C. albicans* may not be directly involved in the etiology of dental caries, and orthodontic therapy is not a predisposing factor to candidosis, we decided to include it due to the possibility of orthodontic appliances serve as reservoirs for this fungus. In favor of this premise, it is known that during the period of orthodontic contention, the presence of acrylic resin is a determinant factor for the elevation of fungal population in the mouth.²⁷

CSC incremented the adhesion of *C. albicans* SC5314 on all materials ($p \leq 0.00489$), especially on surfaces of non-metal materials. Evidences show that acquired pellicle formed on rigid intra-oral surfaces may interfere negatively in the adhesion of *Candida* spp.²⁸ The results here reported corroborate to this observation, particularly for acrylic resin and polyurethane elastic. It is possible that CSC cancels the repulsive forces in the pellicle, or alters cell wall properties of *C. albicans*, making it less hydrophobic, and consequently more apt to adhere to conditioned surfaces. This finding gains importance because orthodontic materials remain covered by acquired pellicle through the treatment and cigarette smoking can subvert the yeast weak adherent ability, as seen in non-smokers.

Since the candidal cells adhered to conditioned surfaces without CSC and found environmental conditions similar to where CSC was present, the biofilms achieved cell densities proportional to the available areas on the substrates. This

indicates a trend towards growth uniformity, different from that seen for *S. mutans* 6715. It is possible that such uniformity might be partially resultant from morphological variations found inner the biofilms formed on abiotic surfaces with hyphae and pseudohyphae inside an extracellular polymeric matrix.²⁹ Such architecture more complex than those found in bacterial biofilms may be implicated in a greater resistance to hydrodynamic shear force, resulting in biofilms with more constant growth rates. In other hand, the rates of biofilm development in the presence of CSC followed a more variable pattern, higher on brackets and acrylic resin ($p \leq 0.00513$). It is plausible that the increase in cell densities of biofilms formed on these materials may be a response to the greater values obtained for adhesion on brackets and acrylic resin, respectively.

For clinical purposes, the possibility of orthodontic materials serving as reservoirs for *Candida* spp. is an object for discussion.³⁰⁻³² The results regarding to the role of CSC in fungal adhesion and biofilm formation show that smoking may exert an additive effect on the persistence of yeasts.

Some points may have biased the results and must be reported. (1) The mono-specific biofilms evaluated in this study certainly do not reflect the reality of oral microbiota microcosm; but they do allow to analyze the individualized behavior of two pathogens with distinct characteristics determinant for the development of diseases. Further studies involving multi-specific biofilms with co-aggregation of species should be conducted to broaden the understanding of dynamics of biofilms formation, their physiology and their subsequent etiopathogenic roles. (2) The samples of saliva here used were obtained from non-smoker volunteers. It is perfectly possible that this reflects on the composition of acquired pellicle.

However, to our knowledge, there are no studies that state differences between acquired pellicles from smokers and non-smokers. As established, saliva from smokers should be used in a similar experiment in order to confirm or to refute the hypothesis that this is a bias to be considered. (3) The smoking-machine used to collect the CSC may not have collected the whole smoke resulting from the burning cigarettes; however, we believe that this may not be relevant, because even in the mouth, saliva does not retain the whole smoke inhaled. (4) The cells were not previously sub-cultivated in the presence of CSC. Although this presumption may be pertinent, we believe that the resulting phenotypic adaptations may also occur during punctual exposure to CSC. Future experiments that respect this presupposition may elucidate the importance of the phenotypic adaptation. (5) It should be emphasized that these results were obtained exclusively by laboratory experiments and studies that evaluate these same parameters must be conducted with bacteria and yeasts isolated from chronic smoker volunteers.

CONCLUSIONS

When our results are compiled, they indicate that cigarette smoke in contact with *S. mutans* and *C. albicans* cells can interfere in the adhesion and biofilm formation on several orthodontic materials.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are in debt with Rosimeire T. Rosa for the technical assistance, Prof. Elisa S. Camargo, Vinicius A. Tramontina, and Marcelo H. Napimoga for the text review, and with Ilana S. Lima for the English review assistance. This study was

part of the master's dissertation of F.B.B. This study was conducted with intra-mural grants.

The authors declare that have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ahn SJ, Lim BS, Yang HC, Chang YI. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *Angle Orthod* 2005; 75:666-71.
2. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007; 131:736-41.
3. Magno AFF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Faria G, Nelso-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastometric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133:104-9.
4. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod* 2007; 77:1090-5.
5. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133:882-8.

6. Maijala M, Rautemaa R, Järvensivu A, Richardson M, Salo T, Tjäderhane L. *Candida albicans* does not invade carious human dentine. *Oral Dis* 2007; 13:279-84.
7. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, Setijanto D, Hamada T. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; 46:471-8.
8. Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. *Eur J Orthod* 2004; 26:623-9.
9. Arslan SG, Akpolat N, Kama JD, Ozer T, Hamamci O. One-year follow-up of the effect of fixed orthodontic treatment on colonization by oral *Candida*. *J Oral Pathol Med* 2008; 37:26-9.
10. Menzaghi N, Saletta M, Garattini G, Brambilla E, Strohmer L. Changes in the yeast oral flora in patients in orthodontic treatment. *Prev Assist Dent* 1991; 17:26-30.
11. Maruo IT, Rosa EAR, Maruo H, Tanaka O, Guariza Filho O, Ignácio AS, Camargo ES. Effect of chlorhexidine mouth rinse on streptococci counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthod Craniofac Res* 2008; 11:136-42.
12. Mendes A, Mores AU, Carvalho AL, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EAR. *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30:1813-15.

13. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008; 72:157-65.
14. Ahn SJ, Lim BS, Lee YK, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic adhesives. *Angle Orthod* 2006; 76:869-75.
15. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DL. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 1986; 52:555-61.
16. Teixeira EH, Napimoga MH, Carneiro VA, Oliveira TM, Cunha RMS, Havt A, Martins JL, Pinto VPT, Gonçalves RB, Cavada BS. In vitro inhibition of streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *J Appl Microbiol* 2006; 101:111-16.
17. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13915-20.
18. Melikian AA, Mirjana VD, Chen S, Richie J, Stellma SD. Effect of delivered dosage of cigarette smoke toxins on the levels of urinary biomarkers of exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:1408-15.
19. Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, Ducan MJ, Smith DJ. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4586-92.

20. Teughels W, Van Eldere J, Van Steenberghe D, Cassiman JJ, Fives-Taylor P, Quirynen M. Influence of nicotine and cotinine on epithelial colonization by periodontopathogens. *J Periodontol* 2005; 76:1314-22.
21. Ozlu T, Celik I, Oztuna F, Bulbul Y, Ozsu S. *Streptococcus pneumoniae* adherence in rats under different degrees and durations of cigarette smoke. *Respiration* 2008; 75:339-44.
22. Kreth J, Merritt J, Zhu L, Shi W, Qi F. Cell density- and ComE-dependent expression of a group of mutacin and mutacin-like genes in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 265:11-7.
23. Liu Y, Tay JH. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res* 2002; 36:1653-65.
24. Zonuz AT, Rahmati A, Mortazavi H, Khashabi E, Farahani RM. Effect of cigarette smoke exposure on the growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. *Nicotine Tob Res* 2008; 10:63-7.
25. Cogo K, Montan MF, Bergamaschi C de C, D Andrade E, Rosalen PL, Groppo FC. In vitro evaluation of the effect of nicotine, cotinine, and caffeine on oral microorganisms. *Can J Microbiol* 2008; 54:501-8.
26. Keene K, Johnson RB. The effect of nicotine on growth of *Streptococcus mutans*. *Miss Dent Assoc J* 1999; 55:38-9.
27. Arendorf T, Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. *J Clin Periodontol* 1985; 12:360-8.
28. Jones DS, McGovern JG, Adair CG, Woolfson AD, Gorman SP. Conditioning film and environmental effects on the adherence of *Candida*

- spp. to silicone and poly (vinylchloride) biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12:399-405.
29. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 1994; 62:915-21.
30. Addy M, Shaw WC, Hansford P, Hopkins M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *Br J Orthod* 1982; 9:158-63.
31. Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod* 2007; 77:331-6.
32. Lee W, Low BK, Samaranayake LP, Hagg U. Genotypic variation of *Candida albicans* during orthodontic therapy. *Front Biosci* 2008; 13:3814-24.

FIGURES

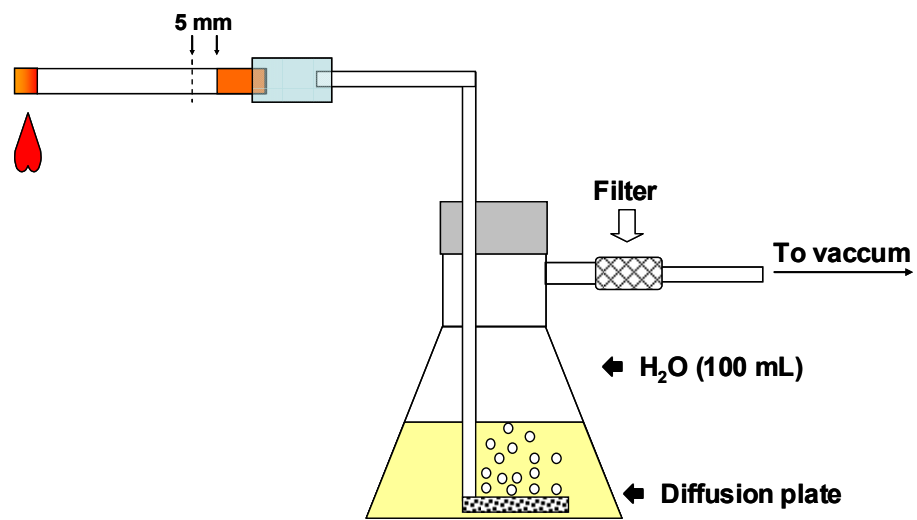


Figure 1. Smoking-machine device.

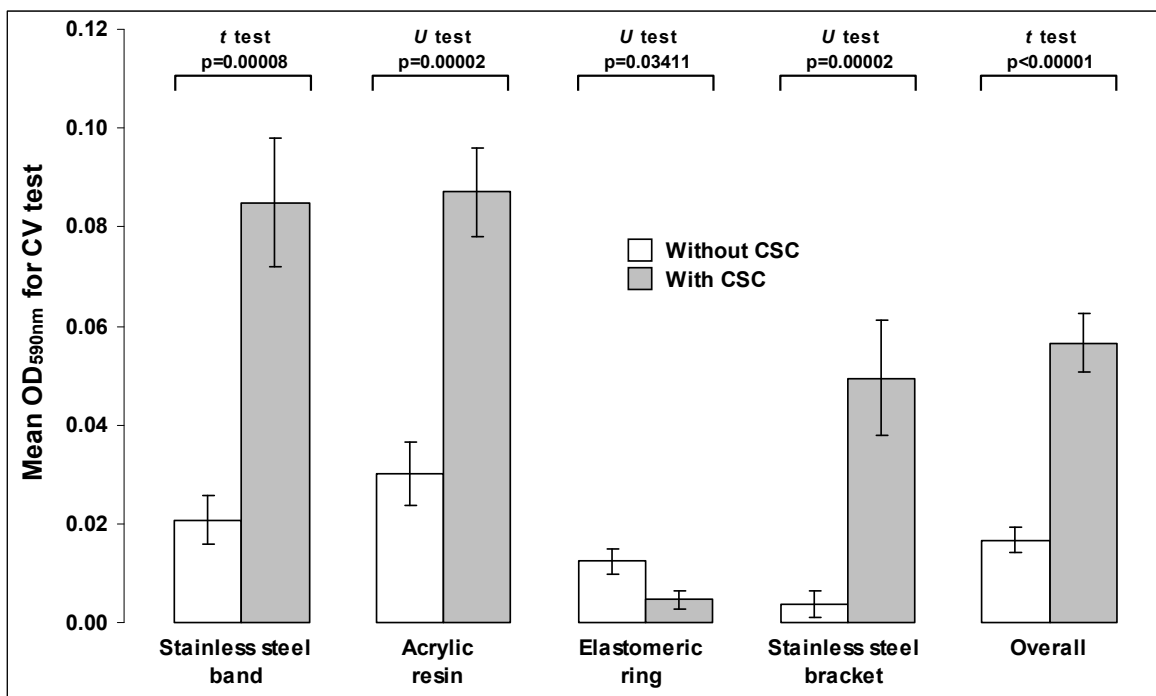


Figure 2. Differential adhesion of *S. mutans* 6715 on selected orthodontic materials conditioned with acquired pellicle in the presence of cigarette smoke condensate (CSC).

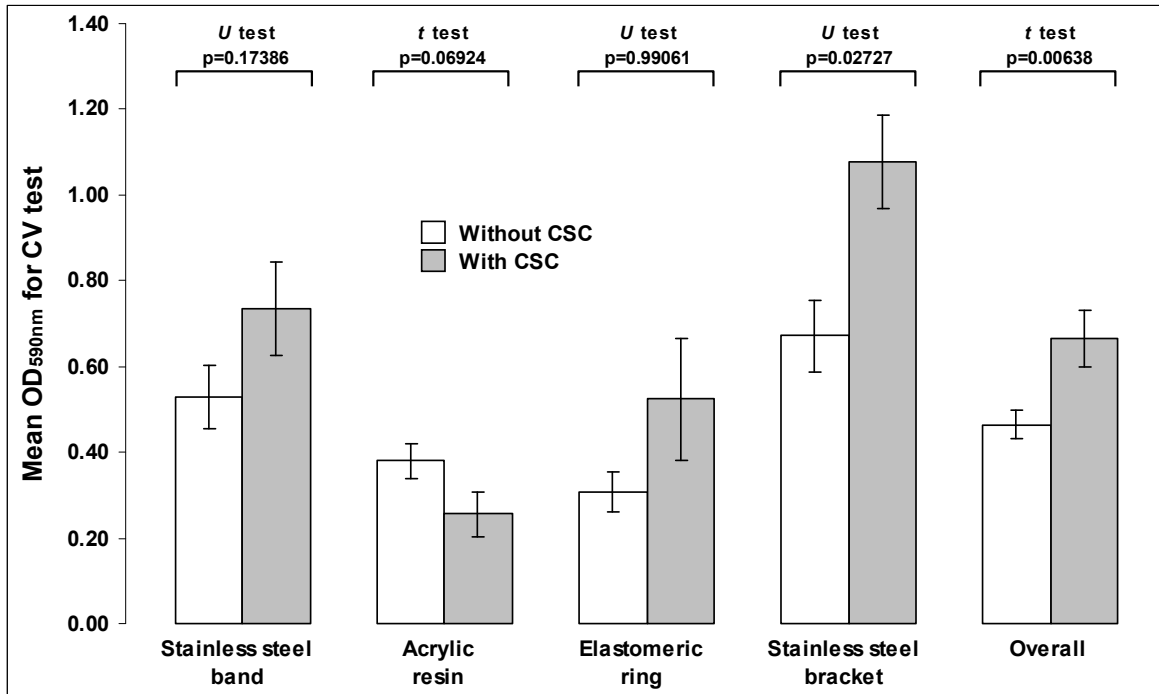


Figure 3. Differential biofilm formation of *S. mutans* 6715 on selected orthodontic materials conditioned with acquired pellicle in the presence of cigarette smoke condensate (CSC).

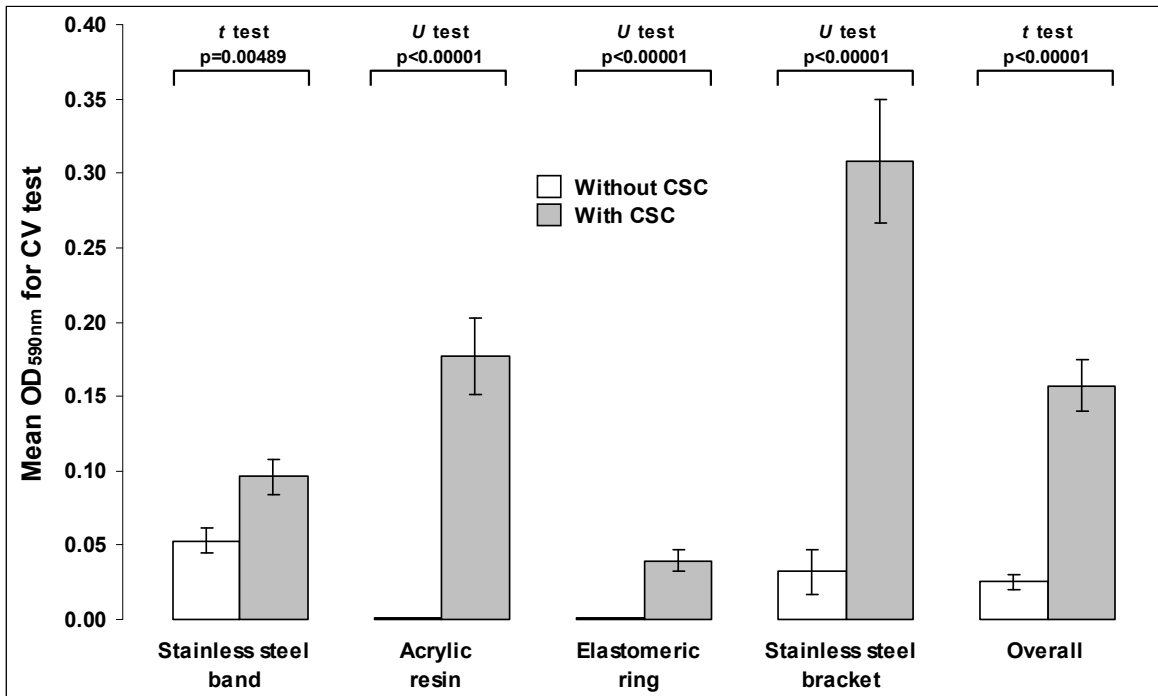


Figure 4. Differential adhesion of *C. albicans* SC5315 on selected orthodontic materials conditioned with acquired pellicle in the presence of cigarette smoke condensate (CSC).

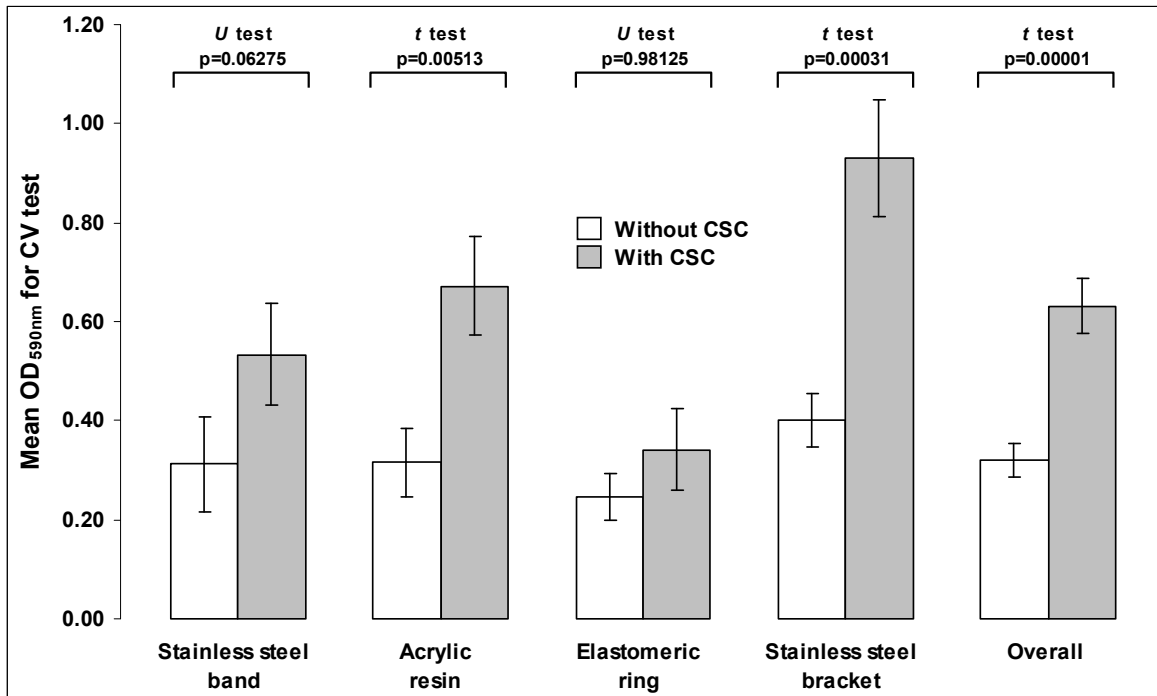


Figure 5. Differential biofilm formation of *C. albicans* SC5315 on selected orthodontic materials conditioned with acquired pellicle in the presence of cigarette smoke condensate (CSC).

3- ANEXOS

ANEXO 1- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Você já pode submeter o seu projeto em qualquer versão via internet.

Accesse o endereço:
<http://www.pucpr.br/cep>



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

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0001956/08**

Protocolo CEP Nº **2589**

Título do projeto **INFLUÊNCIA DO TABACO NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS EM MATERIAIS ORTODÔNTICOS**

Grupo
Versão **1**

Protocolo CONEP **0364008400008**

Pesquisador responsável **ODILON GUARIZA FILHO**

Instituição **PUCPR-CCBS - Curitiba**

Objetivos

OBJETIVO(S) GERAL(IS)

O objetivo deste trabalho é analisar quantitativamente a capacidade de formação do biofilme e a aderência "in vitro", de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície de materiais ortodônticos, isoladamente e associados, na presença de produtos da combustão de cigarros de tabaco (PCCTs).

OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S)

Analisar a capacidade de formação de biofilme e aderência "in vitro", de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície de brackets metálicos, bandas, elásticos e resina acrílica, na presença de produtos da combustão de cigarros de tabaco (PCCTs).

Comentários

O projeto visa levantar a formação de biofilme e de placas em prteses dentários em fumantes e não fumantes

Considerações

O projeto apresenta metodologia e delineamentos adequados.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Adequado, sem ressalvas de ordem ética.



ANEXO 1- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (cont.)

Processo Nº **0001956/08**

Protocolo CEP Nº **2589**

Título do projeto **INFLUÊNCIA DO TABACO NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME
POR MICROORGANISMOS PATOGENICOS EM MATERIAIS ORTODONTICOS**

Grupo
Versão 1

Protocolo CONEP **0364008400008**

Pesquisador responsável **ODILON GUARIZA FILHO**

Instituição **PUCPR-CCBS - Curitiba**

Conclusões

O projeto está de acordo com os preceitos da RES. 196/96 do CNS.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais regulamentações a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **03/09/2008**, manifestou-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 modificada 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 assinado 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, 03 de Setembro de 2008.


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



ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____
 _____ estou sendo convidado a participar do estudo denominado: **“Influência do tabaco na adesão e formação de biofilme por microrganismos patogênicos em materiais ortodônticos”**.

Caso aceite participar desta pesquisa, o voluntário estará de acordo com a coleta da sua saliva (10mL). Esta coleta será realizada através de estimulação por um pedaço de base de goma de mascar estéril de aproximadamente 1,5 grama. A saliva estimulada inicial será deglutida e a partir desse momento (T_0) será tomado o tempo de 5 minutos (T_5), quando então toda a saliva produzida será colhida em um tubo graduado, com o auxílio de um funil. Esse processo é indolor, e os voluntários serão orientados a não se alimentar ou escovar os dentes por pelo menos duas horas antes do período da coleta.

A sua privacidade será respeitada, ou seja, o seu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo.

O indivíduo está ciente de que não receberá ressarcimento financeiro pela participação e poderá se recusar a participar do estudo, ou retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo são: o Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa e a pós-graduanda Fernanda Brasil Baboni do Mestrado de Odontologia - Área de Concentração em Ortodontia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. A qualquer momento os pesquisadores poderão ser contatados pelos telefones (41)-3271-1637/ (41)-8849-7419

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 _____.

 Assinatura do responsável pelo sujeito de pesquisa

 Assinatura do pesquisador

ANEXO 3 – Material e Métodos



Figura 1. A) Kitasato contendo água destilada; B) Kitasato contendo água destilada com o condensado de fumaça de cigarro (CFC).

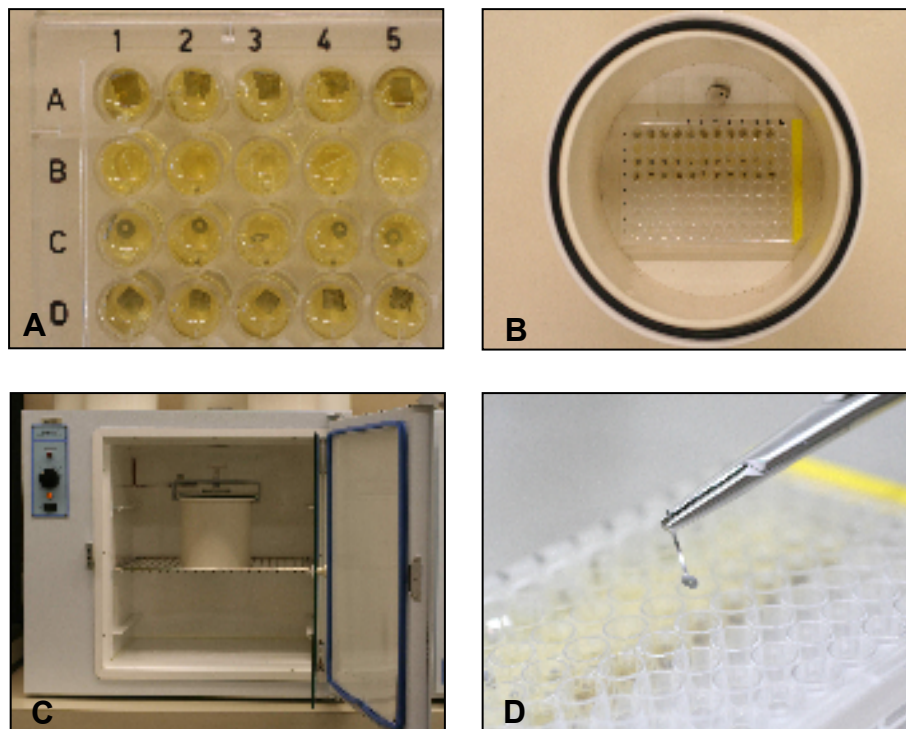


Figura 2. A) Placa de microtitulação com diferentes materiais ortodônticos imersos em caldo BHI contendo CFC; B) e C) Placas incubadas em tensão pCO₂ 10 %, para a formação de biofilme; D) Recolhimento de espécime recoberto por biofilme.

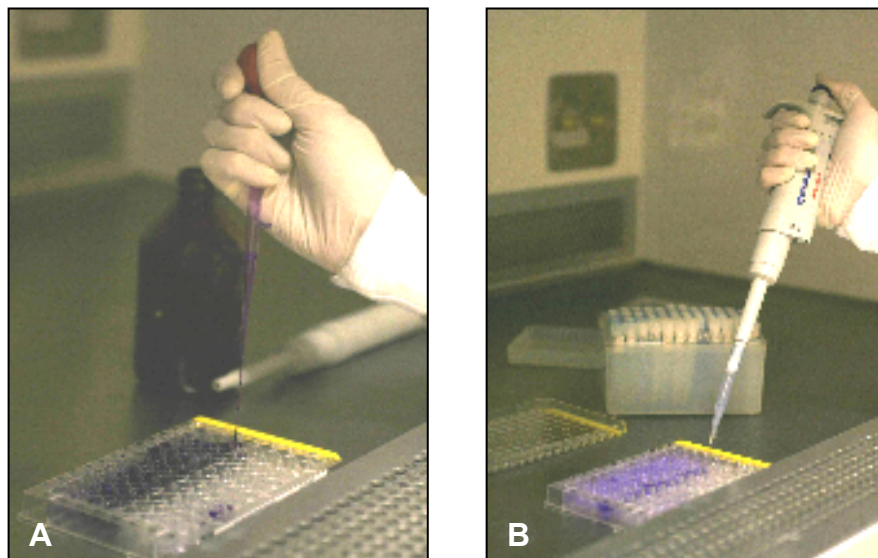
ANEXO 3 – Material e Métodos (cont.)

Figura 3. A) Imersão dos materiais em cristal violeta (CV) 0,5%; B) Aplicação de ácido acético 33%.

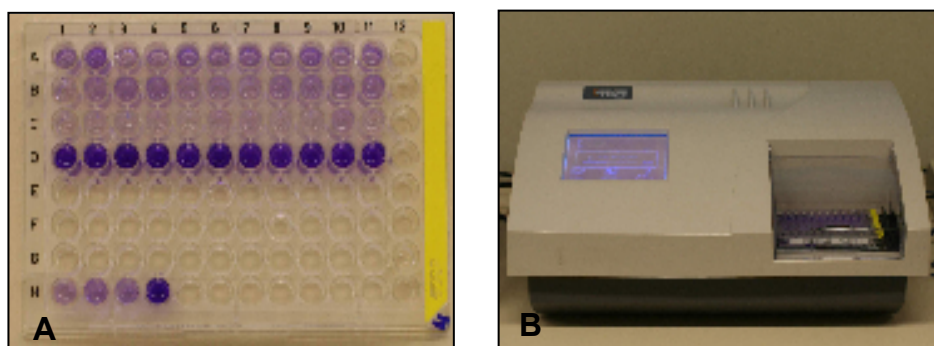


Figura 4. A) Placa de microtitulação com CV liberado e pronto para leitura. B) Leitora de microplacas TP-Reader® (Thermoplate, USA).

ANEXO 4 - Normas para publicação no American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* now uses *Editorial Manager*, 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 Fax (206)221-5467
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.

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 high quality manuscript will include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, alternatives, progress, and results; and discussion. The submitted figures should include extra oral 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

