

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

MAIARA MEDEIROS RONSANI, BDS

**MODULAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE BIOFILMES DE
Candida albicans POR ÍONS METÁLICOS COMUMENTE
LIBERADOS DE APARELHOS ORTODÔNTICOS**

CURITIBA
2010

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

R774m
2010 Ronsani, Maiara Medeiros
Modulação da virulência de biofilmes de *Candida albicans* por íons metálicos comumente liberados de aparelhos ortodônticos / Maiara Medeiros Ronsani ; orientador, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. – 2010.
53 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2010
Inclui bibliografias

1. Ortodontia. 2. *Candida albicans*. 3. Aparelhos ortodônticos. 4. Íons metálicos. 5. Biofilme. I. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.643

MAIARA MEDEIROS RONSANI, BDS

MODULAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE BIOFILMES DE *Candida albicans* POR ÍONS METÁLICOS COMUMENTE LIBERADOS DE APARELHOS ORTODÔNTICOS

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

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

CURITIBA
2010

O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis.
(Dale Carnegie)

A Deus,

*Que me trouxe até aqui; que me inspira e se revela em cada passo meu;
que me guia e me transforma com seu eterno amor.*

A minha mãe Sônia Medeiros Ronsani,

*Por sua luta e coragem que me incentivam a sempre seguir em frente e
acreditar nos meus sonhos. Por me dar força nos momentos difíceis e conforto
durante os obstáculos. Por muitas vezes realizar meus sonhos ao invés dos
seus. Por suas orações pela minha vida e por todo o seu imensurável amor.
Amo infinitamente você.*

Ao meu pai Lindomar Ronsani,

*Por ser meu exemplo de caráter, honestidade e amor. Por doar-se e
batalhar dia-a-dia por nossa família. Pelo orgulho que você me faz sentir por
seu meu pai. Pela sua dedicação a mim e por todo seu imenso amor eu te
agradeço. Amo você infinito.*

Ao meu avô Valdir Medeiros,

Pela enorme saudade que nos deixou...

DEDICO.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

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

Por sua dedicação, confiança, parceria e grande incentivo. Pela paciência com meus primeiros passos no laboratório. Pelo seu otimismo que tornaram menores meus medos. Por se mostrar um excelente pesquisador, que ousa, que acredita em novas e diferentes possibilidades, que encontra convicção em meio às dúvidas da ciência, que percorre os mais inusitados caminhos em busca de evidências. Por ter me inspirado através desta pesquisa, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. **Orlando Tanaka,**

Que conseguiu direcionar uma bolsa de estudos a nossa área de concentração, permitindo que eu tivesse a oportunidade de realizar este curso que representa um dos meus sonhos. Pelo grande incentivo e exigência que nos ajudou a evoluirmos e, possivelmente, nos tornarmos grandes profissionais. Por sua dedicação admirável ao nosso curso, que é essencial para que tenhamos tamanha qualidade no ensino-aprendizagem. E, especialmente, por ter participado da minha banca de qualificação contribuindo muito para finalização deste trabalho.

À **Alinne Ulbrich Mores Rymovicz,**

Por estar ao meu lado desde o primeiro momento no laboratório, por me ajudar imensamente durante a execução deste trabalho. Por sua paciência, dedicação, amizade e companheirismo. Por me acolher em sua casa no início do Mestrado, a primeira pessoa com quem eu realmente pude contar verdadeiramente ao chegar a Curitiba. Sua contribuição com este trabalho e com a minha história se tornou inestimavelmente especial.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Thiago Martins Meira,

Meu amigo, companheiro, colega, namorado. Com quem dividi todos os momentos que me permitiram chegar à realização deste trabalho e também deste sonho por inteiro. Pela presença inspiradora em minha vida, que proporcionou a cada dia maior leveza, alegria... e amor.

À Máira Medeiros Ronsani e Merieli Medeiros Ronsani,

Minhas princesas, minhas amigas, minhas irmãs. Por toda força e incentivo que me trouxeram e por toda compreensão e cumplicidade que só existe entre irmãos que se amam verdadeiramente.

À minha avó querida Maria Martha de Abreu Medeiros,

Seu exemplo de luta, fé e perseverança me incentivaram durante toda minha vida. Seu apoio e força são fundamentais para acalmar meu coração. Sua presença e alegria fazem das minhas dificuldades uma inspiração para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado.

À CAPES, que através de uma bolsa de estudos permitiu a realização deste sonho.

*Ao Coordenador da Pós-graduação em Odontologia, Prof. **Dr. Sérgio Roberto Vieira**, meu reconhecimento pela competência e entusiasmo pela pesquisa científica.*

*À secretária da pós-graduação, **Neide Reis Borges**, uma pessoa realmente especial que além da enorme competência, nos ofereceu seu sorriso e simpatia em todos os momentos.*

*À **Rosimeire Takaki Rosa**, por sua amizade, gentileza, boa vontade e paciência durante a execução dos experimentos desde trabalho. Sua ajuda amenizou os momentos difíceis e alegrou nossas tardes.*

*À Prof. **Dra. Elisa Souza Camargo** por sua dedicação e amizade. Por nos ensinar a importância dos detalhes e da perfeição em tudo aquilo que fizemos. Pelas enormes contribuições para nossa formação como profissionais e como pessoas de valor.*

*Ao Prof. **Dr. Hiroshi Maruo**, por sua exigência e dedicação que culminaram em um grande aprendizado. Por nos ensinar que não basta sermos bons profissionais, mas que precisamos buscar ser excelentes através do pensamento crítico e reflexão sobre nossas próprias atitudes.*

*Ao Prof. **Dr. Odilon Guariza Filho**, por sua alegria, doçura e enorme paciência a nos ensinar desde os primeiros passos, as primeiras dobras. Por jamais subestimar nossas dúvidas e sim encher-se de boa vontade e didática nos mostrando suas inestimáveis explicações.*

Ao Prof. **José Vinícius Bolognese Maciel** por sua amizade, alegria e disponibilidade em vários momentos, contribuindo muito para o nosso conhecimento.

Ao Prof. **Dr. Sérgio Aparecido Ignácio**, pela enorme atenção e carinho dispensados durante a análise estatística.

À Prof^a. **Dra. Ana Maria Trindade Grégio**, pelas excelentes sugestões para este trabalho durante o exame de qualificação, por sua alegria, seu carinho e sua dedicação especial.

Aos meus colegas de turma, **Ana Leticia Rocha Avila, Cristina Hepp, Denise Odete Manarelli, Dolores Fatima Campos Navarro, Gabriela Pinto Molina da Silva, Ismael Signori, Lilian Mary Karakida e Maria Cecilia Galacini Añez** pelos bons e maus momentos compartilhados durante os intensos dois anos que convivemos juntos. Fomos fortes e guerreiros, e com certeza sozinhos não teríamos sido tanto quanto somos hoje.

À **Lourenço Cattani**, nosso inesquecível ex-colega de turma, que hoje serve à Aeronáutica. Sua alegria e suas “teorias” o tornaram único e jamais conseguiremos esquecer sua disposição e alegria.

À Prof^a **Patrícia Maria Stuelp Campelo**, Prof^a **Selene Elíbio Esposito**, Prof. **Luiz Fernando Pereira**, pelas conversas e momentos agradáveis de convívio no laboratório.

Aos **funcionários da PUCPR** e da Clínica de Ortodontia, que contribuíram de diversas maneiras para tornar nossos dias mais agradáveis.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho e pela constante luta durante toda caminhada.

E, finalmente, agradeço meus medos, dos quais originaram minha coragem. Meus desesperos, que aclararam minha fé. Minhas derrotas, que edificaram o meu chão. Minhas dificuldades, que fortaleceram minha esperança. E, merecidamente, meus sonhos, que me erguem o mais alto, mantendo-me longe do chão.

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS	2
PÁGINA TÍTULO	3
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO	11
CONCLUSÕES	15
REFERÊNCIAS	16
TABELA 1	22
FIGURA 1	23
2. ARTIGO EM INGLÊS	24
TITLE PAGE	25
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	27
MATERIAL AND METHODS	28
RESULTS	31
DISCUSSION	32
CONCLUSIONS	36
REFERENCES	37
TABLE I	43
FIGURE 1	44
ANEXO I – ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO <i>AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS</i>	48

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO

MODULAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE BIOFILMES DE *Candida albicans* POR ÍONS METÁLICOS COMUMENTE LIBERADOS DE APARELHOS ORTODÔNTICOS

Maiara Medeiros Ronsani

Cirurgiã-dentista, Mestranda em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Farmacêutico, Mestre em Ciências, Doutor em Ciências
Professor Titular do Programa de Pós-graduação em Odontologia,
Área de Concentração em Biociências

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Autor para correspondência:

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Unidade de Pesquisa com Xenobióticos
Rua Imaculada Conceição, 1155
CEP 80215 – 901, Curitiba, Paraná, Brasil
Fone: 55 (41) 3271 – 1497
Fax: 55 (41) 3271 – 1405
E-mail: edvaldo.rosa@pucpr.br

RESUMO

Introdução: A instalação de aparelhos ortodônticos metálicos conseqüentemente leva a um aumento na concentração salivar de íons metálicos e de *Candida* spp. Contudo, nenhuma relação entre ambas, em termos de virulência, foi anteriormente estudada. O objetivo deste estudo foi avaliar se ocorrem modulações de virulência fúngica por íons metálicos.

Métodos: Foram preparados meios de cultura contendo Ni^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} , Co^{+2} e mistura desses, em concentrações similares às liberadas em saliva. Biofilmes de *Candida albicans* SC5314 foram crescidos por 72 h e suas biomassas foram determinadas. Os sobrenadantes foram pesquisados em relação às atividades de aspartil-proteases (Sap) e hemolisinas. Para se ratificar as modulações na virulência por metais, as atividades proteolítica/hemolítica foram convertidas em atividades específicas. **Resultados:** Os resultados revelaram que todos os íons, com exceção do Co^{+2} , induziram incrementos na biomassa dos biofilmes. O Ni^{+2} induziu uma maior atividade de Sap e o Fe^{+3} , uma redução na atividade hemolítica. A mistura de íons não promoveu diferenças em relação ao controle para Sap e hemolisinas. **Conclusão:** De relevância clínica, os resultados obtidos indicam que os diferentes íons metálicos oriundos da esfoliação de aparelhos ortodônticos podem modular diferentes fatores de virulência de maneira variada.

Descritores: *Candida albicans*, aparelhos ortodônticos, íons metálicos, biofilmes, aspartil-proteases, hemolisinas.

INTRODUÇÃO

As condições do ambiente bucal, tais como temperatura, propriedades enzimáticas e microbiológicas, oferecem um meio ideal para biodegradação de metais; consequentemente, facilitando a liberação de íons metálicos que podem causar efeitos adversos.^{1,2} Estudos têm relatado que alguns desses metais podem levar a quadros de hipersensibilidade,^{3,4} dermatite alérgica,^{5,6} asma³ e, até mesmo, com possibilidade de efeitos mutagênicos.⁷

Dentre os materiais para fabricação de *brackets*, bandas e arcos ortodônticos, o aço inoxidável é o mais amplamente utilizado.^{8,9} A maioria desses acessórios contém de 8% a 12% de níquel, 17% a 22% de cromo e várias proporções de manganês, cobre, titânio e ferro¹⁰ na composição das ligas.

Apesar dos estudos relacionados à esfoliação de íons metálicos¹¹⁻¹³ os relacionarem à fenômenos de corrosão, algumas questões sobre a biocompatibilidade desses materiais permanecem ainda sem resposta, confirmando a necessidade de maior investigação sobre o tema. A possível relação de íons específicos liberados de aparelhos ortodônticos e a colonização e virulência de microrganismos que habitam a cavidade bucal permanece ainda um caminho inexplorado.

Aparelhos ortodônticos servem como diferentes “zonas de impacto” que modificam a aderência e colonização microbiana, agindo como possíveis fontes de infecção para diferentes patógenos,¹⁴ dentre eles *Candida* spp.

Candida spp. são patógenos oportunistas frequentemente encontrados em humanos e podem ser isoladas de 50% a 60% das cavidades bucais de adultos jovens.^{15,16} Até o momento, existe um limitado número de estudos

investigando o efeito do aparelho ortodôntico sobre a presença e densidade deste patógeno na cavidade bucal. Brusca et al¹⁴ estudaram o crescimento e a aderência de *C. albicans* em diferentes tipos de *brackets* e verificaram o aumento na aderência do fungo em *brackets* de policarbonato, enquanto em *brackets* metálicos ocorreu redução da população fúngica. Arslan et al¹⁷ e Hägg et al¹⁸ observaram que ocorre aumento no número de *Candida* spp. no início do tratamento ortodôntico. Contudo, a presença do aparelho ortodôntico parece não aumentar o número de indivíduos carreadores saudáveis.¹⁹

Nosso grupo tem investigado a possibilidade de modulação de virulência de *C. albicans* por xenobióticos diversos,²⁰⁻²² inclusive sobre adesão e formação de biofilme sobre materiais ortodônticos.²³

A despeito do papel oportunista que *Candida* spp., e em especial a *C. albicans* apresentam, a modulação da virulência mediada por íons metálicos permanece desconhecida.

O objetivo do presente estudo foi avaliar experimentalmente a influência que íons metálicos liberados de aparelhos ortodônticos exercem na modulação da virulência de biofilme de *Candida albicans* SC5314.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das soluções de íons metálicos. O caldo Base de Nitrogênio para Leveduras (Yeast Nitrogen Base[®] - YNB, Difco, Detroit, Mich.) contendo diferentes íons metálicos foi preparado de acordo com as quantidades liberadas de acessórios ortodônticos para saliva.^{1,24} Os íons elencados e suas respectivas concentrações foram níquel divalente (Ni^{+2}) 10 ng.mL⁻¹ (170 nM),

ferro trivalente (Fe^{+3}) $6,77 \text{ ng.mL}^{-1}$ (121 nM), cromo trivalente (Cr^{+3}) $4,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ (86,5 nM) e cobalto divalente (Co^{+2}) $0,44 \text{ ng.mL}^{-1}$ (7,46 nM). O fungo foi também desafiado com mistura dos íons (Mix) que foram dissolvidos em YNB, nas concentrações acima. Em função de suas maiores solubilidades, foram utilizados nitratos metálicos de alto grau de pureza (Merck Chemicals S.A.). O controle negativo continha meio de cultura sem a adição de qualquer íon metálico. O solvente empregado para a confecção dos meios de cultura e soluções foi a água reagente tipo II com resistividade específica maior que 2 Mohm.cm^{-1} .^{25,26}

Microrganismo e crescimento em biofilme. A cepa *C. albicans* SC5314 foi escolhida para a condução do estudo devido ao fato de que ela é uma boa formadora de biofilmes, inclusive em condições adversas.²⁷ A cepa foi crescida aerobicamente em tubos contendo YNB a 37 °C, para adaptação ao meio. Após 24 h, as células foram centrifugadas e lavadas com NaCl 145 mM estéril. As células foram resuspendidas em NaCl 145 mM até atingirem a concentração de c.a. 3×10^7 blastoporos. mL^{-1} (OD_{600} de 0,5), para padronizar o número de células em cada amostra. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram transferidas para os poços em placa de poliestireno para cultura de células de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), para cada grupo. As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C. Após 2 h, as suspensões foram drenadas e os poços foram lavados duas vezes com NaCl 145 mM estéril para remover as células planctônicas e as células fracamente aderidas. Os poços receberam alíquotas de 1 mL de YNB para o grupo controle e YNB mais íons para os grupos experimentais. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 h. A cada 24

h, os poços eram drenados e os caldos com/sem íons metálicos eram substituídos.

Estimativa da biomassa por retenção do cristal violeta (CV). Os sobrenadantes dos biofilmes formados após 72 h foram separados por aspiração e transferidos para tubos estéreis para determinação da atividade de Sap. A biomassa foi cuidadosamente lavada duas vezes com 145 mM de NaCl estéril. Os poços receberam metanol 99% durante 15 min, para fixar as células. Em seguida, o metanol foi evaporado por ventilação forçada usando um secador de cabelos. Os poços receberam 1 mL de CV 0,02% e permaneceram estáticos por 20 min. Os excessos de CV foram removidos lavando-se quatro vezes com água destilada estéril. O impregnado de CV foi liberado pela adição de 1 mL de ácido acético 33% (10 min) e as OD₅₄₀ foram determinadas.²⁰ Os valores dos *blanks* foram subtraídos dos valores obtidos no tratamento a fim de eliminar resultados espúrios que poderiam derivar da interferência do fundo.

Determinação da Atividade de Protease (Sap). A atividade de Sap nos sobrenadantes foi determinada utilizando o azocaseína como substrato.²⁰ Não foi utilizado nenhum inibidor de protease para confirmar que somente a atividade de aspartil-protease (Sap) era avaliada. Isso porque, outras peptidases estão presentes no sobrenadante em baixas concentrações^{28,29} ou exigem extração do citoplasma celular.³⁰ Rapidamente, os sobrenadantes (150 µL) foram transferidos para tubos de vidro contendo 250 µL de azocaseína 1% (em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 4,8), e as reações foram incubadas durante 60 min a 37 °C. As reações foram paradas com adição de 400 µL de ácido tricloroacético 10% e incubadas por mais 10 min em temperatura ambiente, seguidas pela centrifugação a 1000×g, durante 10 min. Setenta e cinco

microlitros desses sobrenadantes foram misturados com igual volume de NaOH 500 mM e incubados por 15 min. A OD₄₄₀ foi usada para avaliar o desenvolvimento de cor. Um ensaio controle, sem o sobrenadante na mistura da reação, foi utilizado como *blank* em todas as medidas colorimétricas. Uma unidade de atividade de Sap foi definida como a quantidade de enzima que aumenta em 0,001 unidades de absorbância a 440 nm, por minuto de digestão.³¹ A razão entre unidades de atividade de Sap por absorbância de retenção do CV foi considerada como sendo a atividade específica de proteases (AEP).

Quantificação da atividade hemolítica. O teste para quantificação da atividade hemolítica foi baseado no proposto por Frey e Nicolet,³² com pequenas modificações. Aliquotas de 500 µL de sobrenadantes de cultura microbiana foram misturadas com alíquotas de 500 µL de eritrócitos de carneiro 1% [em Tris-HCl 10 mM contendo NaCl 145 mM (pH 7,5)] e incubadas a 37 °C em agitação de 50 rpm. Após 120 min de incubação, as suspensões foram sedimentadas a 5 °C, por 15 h. As OD₅₄₀ dos sobrenadantes foram determinadas. Os controles negativos continham iguais volumes de tampão e suspensões de eritrócitos. Uma unidade hemolítica foi arbitrariamente definida como a quantidade de hemolisina que aumenta em 0,001 unidades de absorbância a 540 nm, por minuto de incubação a 37 °C. A razão entre unidades hemolíticas por absorbância de retenção do CV foi considerada como sendo a atividade específica de hemolisinas (AEH).

Estatística. Os experimentos foram conduzidos em sextuplicata, em quatro momentos distintos. Todos os dados foram avaliados em relação à homogeneidade de variância pelo Teste de Levene e analisados pelos testes

ANOVA a um critério e teste de comparações múltiplas de Games-Howell para variâncias heterogêneas, utilizando o pacote estatístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago IL., EUA). Um valor de $p < 0,05$ foi assumido como o ponto limítrofe para estabelecimento de diferenças.

RESULTADOS

As médias dos valores de biomassas, atividades específicas de Sap e atividades específicas de hemolisinas para biofilmes de 72 h de *C. albicans* SC5314 são mostrados na Tabela 1.

Biomassa. Para os desafios com Ni^{+2} ($\text{OD} = 0,452 \pm 0,061$), Fe^{+3} ($\text{OD} = 0,425 \pm 0,065$), Cr^{+3} ($\text{OD} = 0,427 \pm 0,091$) e Mix ($\text{OD} = 0,430 \pm 0,051$), os incrementos de biomassa foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,018$) em relação ao controle ($\text{OD} = 0,351 \pm 0,086$). Os valores médios de biomassa de biofilmes crescidos em presença de Co^{+2} ($\text{OD} = 0,405 \pm 0,064$) não diferiram estatisticamente de nenhum dos outros grupos.

Atividade específica de proteases (AEP). Para se verificar se variações na taxa de secreção de proteases apresentavam independência em relação às biomassas dos biofilmes, optamos por utilizar valores de atividade específica de Sap, que são produtos da divisão dos valores nominais de proteases por biomassa. Dessa forma, incrementos observados em qualquer tratamento, em relação ao controle, seriam devidos à elevação induzida pelo tratamento e não pela maior biomassa. Com exceção do Cr^{+3} ($\text{AEP} = 0,139 \pm 0,051$) e do mix ($\text{AEP} = 0,132 \pm 0,052$), a média da AEP para Ni^{+2}

($AEP=0,183\pm0,012$) se mostrou superior às dos demais grupos experimentais e do controle ($p\leq0,033$). As médias dos tratamentos com Fe^{+3} ($AEP=0,106\pm0,037$) e Co^{+2} ($AEP=0,105\pm0,022$) se mostraram inferiores a do controle ($AEP=0,125\pm0,047$), sem, contudo, apresentar significância estatística ($p\geq0,160$).

Atividade específica de hemolisinas (AEH). Da mesma forma que anteriormente, para se verificar se variações na taxa de secreção de hemolisinas apresentavam independência em relação às biomassas dos biofilmes, optamos por utilizar valores de atividade específica de hemolisinas, que são produtos da divisão dos valores nominais de hemolisinas totais por biomassa. A secreção proporcional de hemolisinas no tratamento com mistura de íons ($AEH=0,312\pm0,071$), embora numericamente superior ao controle ($AEH=0,241\pm0,084$) e Cr^{+3} ($AEH=0,264\pm0,035$), não diferiu estatisticamente ($p\geq0,072$) desses; contudo, foi superior aos demais tratamentos ($p\leq0,001$). De forma significativa, o Fe^{+3} levou a obtenção de valores para AHE ($AEH=0,163\pm0,088$) inferiores aos demais tratamentos e ao controle ($p\leq0,011$).

DISCUSSÃO

Com raras exceções, estudos que buscaram relacionar colonização por *Candida* spp. e implantação de terapia ortodôntica com aparelhos metálicos fixos tiveram suas publicações concentradas na última década.^{14,17-19,33} Existe um consenso de que as elevações observadas nas populações fúngicas devem decorrer do acúmulo de biofilme de difícil remoção, bem como de alterações

ambientais que favorecem tais aumentos.³⁴ A esfoliação dos aparelhos ortodônticos eleva as concentrações salivares de íons metálicos, que invariavelmente, chegam às células microbianas.

A princípio, foi especulado que alguns íons poderiam exercer efeitos deletérios sobre as células fúngicas, uma vez que o Cr^{+3} pode causar perda da função de barreira da membrana citoplasmática, resultando em extravasamento de moléculas de baixa massa molar.³⁵ Contudo, as concentrações salivares dos íons são muito inferiores às necessárias para inibir o crescimento de *C. albicans*³⁶ ou de outras espécies,³⁷ bem como para bloquear transições levedura-hifa.³⁸ A menor disponibilidade de íons metálicos, somada a elevação intrínseca da resistência conferida pelos biofilmes de *Candida* spp. deve reduzir significativamente a ocorrência de fenômenos deletérios tipo reações de Fenton, características de íons de Cu, Ni e Fe, que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), tóxicas para as células.³⁸

Na realidade, fungos podem internalizar íons metálicos com relativa facilidade.³⁹ Em especial, *Candida* spp. podem acumular elevadas quantidades de Ni^{+2} , se em condições ácidas.⁴⁰ Como os aparelhos ortodônticos são passíveis de colonização por microbiota cariogênica,⁴¹ tendem a sofrer contínua esfoliação iônica em microcosmos acídicos. De forma adversa à inicialmente imaginada, essa exposição aos íons não inibiu o crescimento celular, mas aumentou as biomassas dos biofilmes. Tal achado vem a contribuir com aqueles obtidos por Hägg et al,¹⁸ que estabeleceram uma relação causal entre aumentos nas contagens de *Candida* spp. após a implantação de aparelhos ortodônticos fixos em função da geração de áreas estagnantes que favorecem a retenção de substrato e microbiana. Em posse

dessa informação, propomos que deva existir uma relação sinérgica entre a retenção mecânica e a modulação de crescimento de biofilmes pelos íons metálicos oriundos dos aparelhos ortodônticos metálicos fixos.

Foi observado que o Ni^{+2} tende a incrementar a secreção de proteases de forma independente da biomassa. É sabido que após a internalização do Ni^{+2} , o íon é encaminhado para vacúolos para detoxificação,⁴² muito provavelmente pela via da fosfatidilinositol 3-quinase Vps34p (PI-3kinase Vps34p). Esse fato é bastante interessante, pois em organismos eucarióticos, ocorrem transduções de sinal mediadas por fosfoinositídeos.^{43,44} A PI-3kinase Vps34p também está envolvida na secreção enzimática, provavelmente regulando o transporte vesicular e/ou a exocitose das Sap em *C. albicans* SC5314.⁴⁵ Desta forma, na tentativa de transportar o Ni^{+2} para detoxificação, a *C. albicans* deve, concomitantemente, aumentar a mobilidade de proteases, que implica em maior secreção. A figura 1, setor #1, ilustra esse provável mecanismo de incremento na secreção de Sap, intermediada por Ni^{+2} . Do ponto de vista da virulência, esse fenômeno é deveras importante, pois diferentes Sap estão diretamente envolvidas na adesão às células epiteliais e na hidrólise de proteínas do hospedeiro, incluindo colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina salivar, imunoglobulinas, interleucina-1 β , lactoperoxidase, fatores do complemento e da coagulação.⁴⁶

Entretanto, como outros íons sustentaram a manutenção da secreção específica de Sap no patamar do controle, acreditamos que tenha ocorrido um “efeito diluidor” na virulência incrementada mediada pelo Ni^{+2} . Dessa forma, mesmo o Ni^{+2} parcialmente conferindo elevações na secreção, os demais íons devem ter interferido de alguma forma na secreção total das enzimas. Algumas

hipóteses levantadas fazem alusão à possibilidade de competição por sítios de ligação, repressão dos genes *SAP* pelos demais íons ou desvios nas vias de secreção. Tais hipóteses carecem de verificação experimental *a posteriori*.

A utilização da atividade específica de Sap é um recurso útil para se avaliar modulação da secreção de proteases por quantidade de células microbianas. Do ponto de vista da patogenicidade, contudo, taxas nominais de secreção são mais relevantes, pois indicam se os tecidos vizinhos ao biofilme sofrerão maior ou menor agressão. O Ni^{+2} induziu secreção de Sap, cuja média foi quase duas vezes maior que a do controle sem íons (1.383 ± 0.030 mU vs 0.733 ± 0.05 mU, respectivamente). Essa maior secreção de proteases certamente confere um pior prognóstico em termos de destruição de tecidos moles e de persistência no meio intrabucal.

Nossos resultados mostraram que o crescimento de biofilmes de *C. albicans* em presença de Fe^{+3} levou a uma redução da atividade hemolítica. Durante o processo infeccioso, o fungo pode buscar ferro complexado em moléculas como hemoglobina ou hemina.⁴⁷ Contudo, existem indícios de que o ferro iônico é mais rapidamente internalizado que ferro complexado. Particularmente no caso da *C. albicans*, a cinética de internalização de Fe^{+3} ocorre de forma mais rápida que a de ferro complexado em hemoglobina, que requer desenvolvimento de receptores específicos.⁴⁸ Redutases presentes na superfície celular fúngicas reduzir o Fe^{+3} para Fe^{+2} , facilitando a absorção do metal.⁴⁹ Com base nesses apontamentos, propomos que na presença de Fe^{+3} , oriundo de aparelhos ortodônticos metálicos, o fungo passa a internalizar o íon, em detrimento da secreção de fatores hemolíticos, que se mostram menos eficazes na aquisição de ferro. O setor #2 da figura 1 ilustra tal hipótese. Tal

pressuposto aponta para uma ambiguidade de comportamento virulento; se, por um lado, o fungo ataca com menor intensidade os eritrócitos na busca de hemoglobina, por outro lado, incorpora mais rapidamente ferro iônico, com consequentes elevações da taxa de divisões celulares, de adesão às células de mucosa bucal e à formação de tubos germinativos.⁵⁰

Contudo, assim como ocorrido para o Ni^{+2} em relação as Sap, a participação do Fe^{+3} como redutor de hemólise na mistura de íons, parece ter sido balanceada pela manutenção ou elevação de atividade hemolítica induzida pelos outros íons metálicos.

No paciente, os desafios com íons metálicos derivam de uma miríade de possibilidades que variam desde o tipo de liga metálica empregada na construção do aparelho ortodôntico e grau de corrosão até co-colonização por microbiota acidogênica. Apesar dessa forte possibilidade de interação, de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que prospectou a possibilidade de modulação de virulência de um organismo bucal por tais íons, mimetizando uma condição próxima àquela onde aparelhos ortodônticos estão envolvidos. Contudo, outros fatores, como variações sialométricas e sialoquímicas,³³ tabagismo,^{22,23} imunocomprometimento, dieta rica em açúcares e higiene deficitária, também devem ser considerados como contribuintes para a formação de biofilmes de *Candida* spp.

CONCLUSÕES

De relevância clínica, os resultados aqui obtidos indicam que os diferentes íons metálicos oriundos da esfoliação de aparelhos ortodônticos

podem modular diferentes fatores de virulência de maneira variada. Fatores como aspartil-proteases e hemolisinas podem ser mais ou menos manifestados, de acordo com o íon em questão, ao passo que, todos os íons ensaiados promoveram incrementos consideráveis na biomassa dos biofilmes de *C. albicans*. Contudo, o clínico deve ter em mente que outras variáveis dependentes do hospedeiro (status de salivação, imunocompetência, medicação e tipo de dieta) devem ser consideradas.

REFERÊNCIAS

1. 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;11:51-6.
2. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:687-93; discussion 693-4.
3. Burrows D. Hypersensitivity to mercury, nickel and chromium in relation to dental materials. *Int Dent J* 1986;36:30-4.
4. Dunlap CL, Vincent SK, Barker BF. Allergic reaction to orthodontic wire: report of case. *J Am Dent Assoc* 1989;118:449-50.
5. Hensten-Pettersen A. Casting alloys: side-effects. *Adv Dent Res* 1992;6:38-43.
6. Brendlinger DL, Tarsitano JJ. Generalized dermatitis due to sensitivity to a chrome cobalt removable partial denture. *J Am Dent Assoc* 1970;81:392-4.
7. Ağaoğlu G, Arun T, Izgi B, Yarat A. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2001;71:375-9.

8. Gottlieb EL, Nelson AH, Vogels DS 3rd. 1996 JCO Study of Orthodontic Diagnosis and Treatment Procedures. Part 1. Results and trends. J Clin Orthod 1996;30:615-29.
9. Hwang CJ, Shin JS, Cha JY. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2001;120:383-91.
10. Kerosuo H, Moe G, Hensten-Pettersen A. Salivary nickel and chromium in subjects with different types of fixed orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1997;111:595-8.
11. Bhaskar V, Subba Reddy VV. Biodegradation of nickel and chromium from space maintainers: an in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2010;28:6-12.
12. Kuhta M, Pavlin D, Slaj M, Varga S, Lapter-Varga M, Slaj M. Type of archwire and level of acidity: effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. Angle Orthod 2009;79:102-10.
13. Eliades T, Pratsinis H, Kleetsas D, Eliades G, Makou M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloys. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;125:24-9.
14. 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.
15. Atack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. J Periodontol 1996;67:78-85.
16. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. J Am Acad Dermatol 1994;31(3 Pt 2):S2-5.
17. 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.

18. 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.
19. Lee W, Low BK, Samaranayake LP, Hagg U. Genotypic variation of *Candida albicans* during orthodontic therapy. *Front Biosci* 2008;13:3814-24.
20. Carvalho AP, Gursky LC, Rosa RT, Rymovicz AU, Campelo PM, Grégio AM, Koga-Ito CY, Samaranayake LP, Rosa EA. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may modulate the protease activity of *Candida albicans*. *Microb Pathog* 2010;49:315-22.
21. Mores AU, Souza RD, Cavalca L, de Paula E, Carvalho A, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of Secretory Aspartyl Protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses* 2009 Oct 28. [Epub ahead of print]
22. Baboni FB, Barp D, Izidoro AC, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. *Mycopathologia* 2009;168:227-35.
23. Baboni FB, Guariza Filho O, Moreno AN, Rosa EA. Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:427-34.
24. Gürsoy S, Acar AG, Seşen C. Comparison of metal release from new and recycled bracket-archwire combinations. *Angle Orthod* 2005;75:92-4.
25. American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard specification for reagent water. Document D 1193-91. Philadelphia, Pennsylvania: ASTM. 1991.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS. 1997.

27. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol. 2007;52:761-7.
28. de Brito Costa EM, dos Santos AL, Cardoso AS, Portela MB, Abreu CM, Alviano CS, Hagler AN, de Araújo Soares RM. Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;38:173-80.
29. dos Santos AL, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, Alviano CS, de Araújo Soares RM. Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;46:209-20.
30. Imbert C, Imbert-Bouyer S, Kauffmann-Lacroix C, Daniault G, Rodier MH. Effect of azoles on the secretion of a *Candida albicans* metalloproteinase. Mycopathologia 2006;161:147-52.
31. De Bernardis F, Mondello F, San Millán R, Pontón J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1999;37:3481-6.
32. Frey J, Nicolet J. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca^{2+} . Infect Immun 1988;56:2570-5.
33. Hibino K, Samaranayake LP, Hägg U, Wong RW, Lee W. The role of salivary factors in persistent oral carriage of *Candida* in humans. Arch Oral Biol 2009;54:678-83.
34. Hibino K, Wong RW, Hägg U, Samaranayake LP. The effects of orthodontic appliances on *Candida* in the human mouth. Int J Paediatr Dent. 2009;19:301-8.
35. Pesti M, Gazdag Z, Belágyi J. In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane, as revealed by EPR spectroscopy. FEMS Microbiol Lett 2000;182:375-80.

36. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Rabiei M, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:4940-9.
37. Harrison JJ, Rabiei M, Turner RJ, Badry EA, Sproule KM, Ceri H. Metal resistance in *Candida* biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 2006;55:479-91.
38. Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:928-38.
39. Acosta I, Rodríguez X, Gutiérrez C, Moctezuma M de G. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions onto fungal biomass. *Bioinorg Chem Appl* 2004;1-7.
40. Dönmez G, Aksu Z. Bioaccumulation of copper(II) and nickel(II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water Res* 2001;35:1425-34.
41. Al Mulla AH, Kharsa SA, Kjellberg H, Birkhed D. Caries risk profiles in orthodontic patients at follow-up using Cariogram. *Angle Orthod.* 2009 Mar;79:323-30.
42. Nishimura K, Igarashi K, Kakinuma Y. Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1998;180:1962-4.
43. DeCamilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. and Novick, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 1996;271:1533–9.
44. Toker A, Cantley LC. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997;387:673–676.
45. Kitanovic A, Nguyen M, Vogl G, Hartmann A, Günther J, Würzner R, Künkel W, Wölfl S, Eck R. Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34 of *Candida albicans* is involved in filamentous growth, secretion of aspartic proteases, and intracellular detoxification. *FEMS Yeast Res* 2005;5:431-9.
46. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 2009;56:211-24.

47. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M, Matsumoto T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. Microbiology 1999;145:689-94.
48. Pendrak ML, Kruttsch HC, Roberts DD. Structural requirements for hemoglobin to induce fibronectin receptor expression in *Candida albicans*. Biochemistry 2000;39:16110-8.
49. Howard DH. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 1999;12:394-404.
50. Sweet SP, Douglas LJ. Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1991; 137:859-65.

TABELA 1.

Tabela 1. Valores médios de biomassas, atividade específica de proteases e atividade específica de hemolisinas para biofilmes de *C. albicans* SC5314 crescidos por 72 h em presença de íons metálicos simulando esfoliação de aparelho ortodôntico

	Íons metálicos				
	Ni ⁺² 10 ng.mL ⁻¹ (170 nM)	Fe ⁺³ 6.77 ng.mL ⁻¹ (121 nM)	Cr ⁺³ 4.5 ng.mL ⁻¹ (86.5 nM)	Co ⁺² 0.44 ng.mL ⁻¹ (7.46 nM)	Controle
Biomassa de biofilme (retenção de CV - OD ₅₄₀)	0.452±0.061 ^a	0.425±0.065 ^a	0.427±0.091 ^a	0.405±0.064 ^{ab}	0.351±0.086 ^b
Atividade específica de proteases [mU (OD ₄₄₀ .min ⁻¹).biomassa ⁻¹]	0.183±0.012 ^a	0.106±0.037 ^b	0.139±0.051 ^{ab}	0.105±0.022 ^b	0.125±0.047 ^b
Atividade específica de hemolisinas [mU (OD ₅₄₀ .min ⁻¹).biomassa ⁻¹]	0.226±0.070 ^a	0.163±0.088 ^b	0.264±0.035 ^{ac}	0.219±0.077 ^a	0.241±0.084 ^{ac}

Letras sobrescritas iguais indicam similaridade entre pares de tratamentos (p>0.05). Letras diferentes indicam diferenças entre pares de tratamentos (p < 0.05).

FIGURA 1

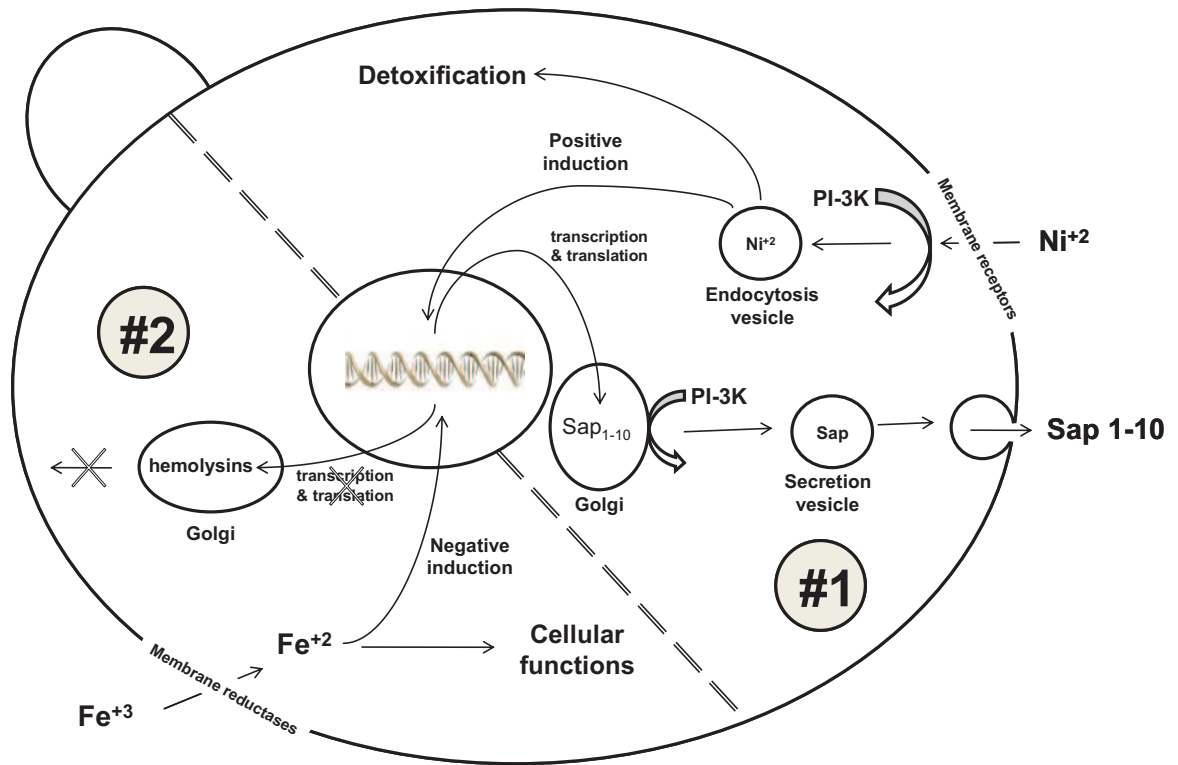


Figura 1. Prováveis vias envolvidas no incremento da secreção de Sap mediada por Ni²⁺ (#1) e na repressão da liberação de hemolisinas por Fe³⁺ (#2) em blastosporo de *C. albicans*.

2. ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

VIRULENCE MODULATION IN *Candida albicans* BIOFILMS BY METAL IONS RELEASED FROM ORTHODONTIC APPLIANCES

Maiara Medeiros Ronsani

Dental Surgeon, MSc (Orthodontics)
The Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Alinne Ulbrich Mores Rymovicz

Dental Surgeon, MSc (Orthodontics)
The Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Thiago Martins Meira

Dental Surgeon, MSc (Orthodontics)
The Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Ana Maria Trindade Grégio

Bachelor in Pharmacy, MSc (Pharmacology), PhD (Oral Pharmacology)
Chair and Full Professor of Pharmacology
The Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Odilon Guariza Filho

Dental Surgeon, MSc (Orthodontics), PhD (Orthodontics)
Associate Professor of Orthodontics
The Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Orlando Motohiro Tanaka

Dental Surgeon, MSc (Orthodontics), PhD (Orthodontics)
Chair and Full Professor of Orthodontics
The Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Bachelor in Pharmacy, MSc (Oral Pathology), PhD (Oral Pathology)
Chair and full professor of Oral Microbiology
Head of the Xenobiotics Research Unit
The Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Corresponding author:

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
The Pontifical Catholic University of Paraná
Biological and Health Sciences Centre (CCBS)
Xenobiotics Research Unit
Rua Imaculada Conceição, 1155
80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil
Phone: +55 41 32711497
Fax: +55 41 32711405
E-mail: edvaldo.rosa@pucpr.br

ABSTRACT

Introduction: The installation of metal devices leads to an increase in the salivary concentration of metal ions and in the growth of salivary *Candida* spp. However, the relationship between released metal ions and *Candida* virulence has not been previously examined. The objective of this study was to evaluate whether metal ions affect fungal virulence. **Methods:** We prepared culture media containing Ni^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} or a mixture of these metal ions at concentrations similar to those released in saliva of orthodontic patients. Biofilms of *Candida albicans* SC5314 were grown for 72 h and their biomasses were determined. The supernatants were analyzed for secretory aspartyl protease (SAP) and hemolysin activities. To verify changes in virulence following treatment with metals, proteolytic and hemolytic activities were converted into specific activities. **Results:** The results revealed that all ions, except Co^{2+} , caused increases in biofilm biomass. In addition, Ni^{2+} caused an increase in SAP activity and Fe^{3+} reduced hemolytic activity. However, the SAP and hemolysin activities in the presence of the mixture of ions did not differ from those of control. **Conclusion:** These results indicate that metal ions released during the degradation of orthodontic appliances can modulate virulence factors in *C. albicans* biofilms.

INTRODUCTION

Conditions in the oral environment such as temperature and microbiological and enzymatic activities are ideal for the biodegradation of metals, facilitating the release of metal ions that can cause adverse effects.^{1,2} Studies have reported that these metals may lead to hypersensitivity,^{3,4} allergic dermatitis,^{5,6} asthma³ and possible mutagenic effects.⁷

Stainless steel is the most widely used material for the manufacture of orthodontic brackets, bands and arch wires.^{8,9} Most of these accessories contain 8% to 12% nickel, 17% to 22% chromium and various proportions of manganese, copper, titanium, and iron¹⁰ in their alloy composition.

Although some studies have related metal ion degradation¹¹⁻¹³ to corrosion, many questions about the biocompatibility of these materials remain to be answered. The relationship between the release of specific ions from orthodontic appliances and the colonization and virulence of microorganisms that inhabit the oral cavity remains unexplored.

Orthodontic appliances serve as "impact zones" that modify microbial adherence and colonization, acting as possible sources of infection for different pathogens¹⁴ including *Candida* spp. *Candida* spp. are opportunistic pathogens commonly found in humans and can be isolated from 50% to 60% of the oral cavities of young adults.^{15,16} A limited number of studies have investigated the effect of metal devices on the presence and density of *Candida* in the oral cavity. Brusca et al.¹⁴ examined the growth and adherence of *C. albicans* on different types of brackets and found an increase in the adherence of the fungus to polycarbonate brackets, but a reduction in the fungal population on metal brackets. Arslan et al.¹⁷ and Hägg et al.¹⁸ observed an increase in the number

of *Candida* spp. at the beginning of orthodontic treatment. However, the presence of oral appliances does not appear to increase the number of individuals who are healthy carriers.¹⁹

We have previously investigated the possibility of modulating the virulence of *C. albicans* by using some xenobiotics²⁰⁻²² to influence adhesion and biofilm formation on orthodontic materials.²³ However, despite the opportunistic role that *Candida* spp., and particularly *C. albicans*, present, the effect of metal ions on the virulence of these organisms remains unclear.

The objective of this study was to experimentally evaluate the influence of metal ions released from orthodontic appliances on the virulence of *Candida albicans* SC5314 biofilms.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of metal ion solutions. Nitrogen base broth (Yeast Nitrogen Base[®] - YNB) for yeast (Difco Co., Detroit, MI) containing different metal ions was prepared using concentrations based on previously reported amounts released into saliva from orthodontic accessories.^{1,24} The ions and their concentrations were as follows: 10 ng/mL (170 nM) divalent nickel (Ni^{2+}), 6.77 ng/mL (121 nM) trivalent iron (Fe^{3+}), 4.5 ng/mL (86.5 nM) trivalent chromium (Cr^{3+}), and 0.44 ng/mL (7.46 nM) divalent cobalt (Co^{2+}). The fungus was also treated with a mixture of ions (Mix) dissolved in YNB at the combined concentrations above. Because of their increased solubility, high-purity metal nitrates were used (Merck Chemicals Co., Sao Paulo, Brazil). The negative control was grown in culture medium without any added metal ions. The solvent

used for the manufacture of culture broths was Type II reagent water with specific resistivity above 2 Mohm/cm.^{25,26}

Growth in biofilms. *C. albicans* SC5314 was selected for study because it forms good biofilms, even under adverse conditions.²⁷ The strain was grown aerobically in tubes containing YNB broth at 37 °C to allow cells to adapt to the medium. After 24 h, the cells were centrifuged and washed with sterile 145 mM NaCl. The cells were then re-suspended in 145 mM NaCl to reach a concentration of *ca.* 3×10^7 blastopores/mL (OD_{600} 0.5) to standardize the number of cells in each sample. One-milliliter aliquots for each group were then transferred to wells of a 24-well polystyrene plate (TPP, Trasadingen, Switzerland) for cell culture. The plates were incubated aerobically at 37 °C. After 2 h, the culture was removed and the wells were washed twice with sterile 145 mM NaCl to remove weakly adhering and planktonic cells. The control wells received 1 mL of YNB and the experimental groups received 1 mL of YNB plus ions. The plates were incubated at 37 °C for 72 h, and the media was replaced with fresh broth with or without metal ions every 24 h.

Biomass estimation by crystal violet (CV) retention. Supernatants from biofilms formed after 72 h were separated by aspiration and transferred to sterile tubes for determination of secreted aspartyl protease (SAP) activity (see below). The remaining biomass was thoroughly washed twice with sterile 145 mM NaCl, and the cells were fixed in 99% methanol for 15 min. After evaporation of the methanol via forced air using a hair dryer, the cells were incubated in 1 mL of 0.02% CV for 20 min. Excess CV was removed by washing four times with sterile distilled water. The incorporated CV was released by incubation for 10 min in 1 mL of 33% acetic acid, and the OD_{540}

was then determined.²⁰ The values of blanks were subtracted from the values obtained after treatment to eliminate background interference.

Determination of secreted protease activity (SAP). The SAP activity of supernatants was determined using azocasein as a substrate.²⁰ No protease inhibitors were used to confirm that only the secreted aspartyl protease (SAP) activity in the samples was evaluated. Other peptidases are present in the supernatant at low concentrations^{28,29} or require extraction from cytoplasm.³⁰ The supernatants (150 μ L) from the biofilms described above were quickly transferred to glass tubes containing 250 μ L of 1% azocasein (in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 4.8), and the reactions were incubated for 60 min at 37 °C. The reactions were then stopped by adding 400 μ L of 10% trichloroacetic acid and incubating for 10 min at room temperature, followed by centrifugation at 1,000 $\times g$ for 10 min. A 75- μ L of the supernatant was mixed with an equal volume of 500 mM NaOH and incubated for 15 min. The OD₄₄₀ was determined according to the development of color in the reaction. A control without supernatant in the reaction mixture was used as blank for all colorimetric measurements. One SAP unit was arbitrarily defined as the amount of enzyme that results in an increase of 0.001 absorbance units at 440 nm per minute of incubation at 37 °C.³¹ The ratio of SAP activity units to CV absorbance retention was considered to be the protease specific activity (PSA).

Quantification of hemolytic activity. The quantification of hemolytic activity was based on the test proposed by Frey and Nicolet³² with minor modifications. Aliquots (500 μ L) of microbial culture supernatants were mixed with 500- μ L aliquots of 1% sheep erythrocytes (freshly harvested) in 10 mM Tris-HCl containing 145 mM NaCl (pH 7.5), and the mixture was incubated at 37

°C with shaking at 50 rpm. After 120 min of incubation, the suspensions were sedimented at 5 °C for 15 h. The OD₅₄₀ of the supernatants were then determined. Negative controls contained equal volumes of buffer and erythrocyte suspensions. One hemolytic unit was arbitrarily defined as the amount of hemolysin that results in an increase of 0.001 absorbance units at 540 nm per minute of incubation at 37 °C. The ratio of hemolytic units to CV absorbance retention was considered the hemolysin specific activity (HSA).

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

RESULTS

The average values of biomass, SAP specific activities and hemolysin specific activities of 72-h biofilms of *C. albicans* SC5314 are shown in Table 1.

Biomass. Following treatment with Ni²⁺ (OD=0.452±0.061), Fe³⁺ (OD=0.425±0.065), Cr³⁺ (OD=0.427±0.091) and ion mixture (OD=0.430±0.051), the biofilm biomasses were significantly increased ($p \leq 0.018$) compared to the control (OD=0.351±0.086). The average biomass values of biofilms grown in the presence of Co²⁺ (OD=0.405±0.064) did not differ from the other groups.

Protease specific activity (PSA). To determine whether variations in the rate of secretion of protease were independent of the biofilm biomass, we used the SAP specific activity values, which were produced by dividing the

nominal protease values by the biomass. Thus, increases observed following any treatment compared to control would be considered due to treatment-induced elevation and not to high levels of biomass. With the exception of the Cr^{3+} group ($\text{PSA}=0.139\pm0.051$) and the mixed ions group ($\text{PSA}=0.132\pm0.052$), the mean PSA of the group exposed to Ni^{2+} ($\text{PSA}=0.183\pm0.012$) was significantly higher than that of the other experimental groups and the control ($p\leq0.033$). The mean values for the groups treated with Fe^{3+} ($\text{PSA}=0.106\pm0.037$) and Co^{2+} ($\text{PSA}=0.105\pm0.022$) were smaller than the control ($\text{PSA}=0.106\pm0.037$) but did not reach statistical significance ($p\geq0.160$).

Hemolysin specific activity (HSA). As for PSA, we chose to use hemolysin specific activity, the product of dividing the nominal total hemolysin value by the biomass, to determine whether variations in the rate of hemolysin secretion were independent of the biofilm biomass. The proportional secretion of hemolysin following treatment with the mixture of ions ($\text{HSA}=0.312\pm0.071$), while greater than the control ($\text{HSA}=0.241\pm0.084$) and Cr^{3+} ($\text{HSA}=0.264\pm0.035$) groups, did not differ statistically ($p\geq0.072$) from these groups. However, the values obtained following treatment with the ion mixture were higher than those following other treatments ($p\leq0.001$). Significantly, Fe^{3+} treatment led to HSA values ($\text{HSA}=0.163\pm0.088$) that were lower than the other treatment groups and the control ($p\leq0.011$).

DISCUSSION

With rare exceptions, studies designed to correlate colonization by *Candida* spp. and orthodontic therapy with fixed metal appliances have been

published only in the last decade.^{14,17-19,33} There is a consensus that the observed increases in fungal populations associated with these orthodontic treatments result from the accumulation of biofilms, which are difficult to remove, and from environmental changes that favor fungal growth.³⁴ In addition, the degradation of orthodontic appliances increases the salivary concentrations of metal ions, which invariably reach microbial cells.

It has been speculated that some ions could exert deleterious effects on fungal cells because Cr^{3+} can cause a loss of barrier function in the cytoplasmic membrane, resulting in the leakage of low molar mass molecules.³⁵ However, salivary ion concentrations are far below those needed to inhibit the growth of *C. albicans*³⁶ or other species³⁷ or to block the yeast-hyphal transition.³⁸ In addition, the occurrence of deleterious phenomena, including the Fenton reaction and other reactions of Cu, Ni and Fe ions that produce cytotoxic reactive oxygen species (ROS),³⁸ should be significantly reduced by the decreased availability of metal ions and high intrinsic resistance conferred by *Candida* spp. biofilms.

In fact, fungi can internalize metal ions with relative ease.³⁹ In special, *Candida* spp. can accumulate high amounts of Ni^{2+} under acidic conditions.⁴⁰ Because orthodontic appliances are susceptible to colonization by cariogenic microbiota,⁴¹ they tend to suffer continual ion degradation in acidic environments. In the present study, exposure to ions did not inhibit cell growth but actually increased the biofilm biomasses, a more unfavorable result than expected. However, this finding is in agreement with those obtained by Hägg et al.,¹⁸ who established that increases in *Candida* spp. counts after the implantation of appliances were due to the generation of stagnant areas that

favor microbial and substrate retention. Based on these data, we propose that there may be a synergistic relationship between the mechanical retention of the biofilm and the modulation of biofilm formation by metal ions from fixed metal devices.

We also observed that Ni^{2+} appears to promote protease secretion independently of biomass. It is known that after Ni^{2+} internalization, this ion is routed to vacuoles for detoxification,⁴² probably via the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34p. This finding is interesting given that signal transduction mediated by phosphoinositides occurs in eukaryotic organisms.^{43,44} Vps34p is also involved in enzyme secretion, likely by regulating the vesicular transport and/or exocytosis of SAP in *C. albicans* SC5314.⁴⁵ Thus, in an attempt to detoxify the Ni^{2+} , *C. albicans* may concurrently increase the mobility of proteases, resulting in increased secretion. Figure 1, panel #1, illustrates this probable mechanism of increased SAP secretion mediated by Ni^{2+} . From the virulence perspective, this phenomenon is important because different SAPs are directly involved in the adhesion of the fungus to host epithelial cells and in the hydrolysis of host proteins, including collagen, laminin, fibronectin, mucin, salivary lactoferrin, immunoglobulins, interleukin-1 β , lactoperoxidase, and complement and coagulation factors.⁴⁶

However, because other ions maintained the specific secretion of SAP at the control level, we believe that there was a "dilution effect" of the increased virulence mediated by Ni^{2+} . Thus, even with Ni^{2+} partially elevating SAP secretion, other ions may have interfered with the total secretion of enzymes. Some hypotheses for this interference include the possibility of competition for binding sites, the repression of SAP genes by other ions or deviations in the

secretory pathways induced by other ions. These hypotheses require further experimental verification.

SAP specific activity is a useful tool to compare changes in protease secretion between different amounts of microbial cells. From the pathogenicity standpoint, however, the nominal rates of secretion are more relevant because they indicate whether the tissues surrounding the biofilm will be affected by changes in aggression. We observed that Ni^{2+} treatment induced SAP secretion to levels almost twice that of the control without ions (1.383 ± 0.030 mU vs. 0.733 ± 0.05 mU). This increased secretion of proteases likely confers a worse prognosis in terms of soft tissue destruction and microbe persistence in the oral cavity.

Our results show that *C. albicans* biofilm growth in the presence of Fe^{3+} leads to a reduction in hemolytic activity. During an infection, the fungus can obtain iron complexes from molecules like hemoglobin or hemin.⁴⁷ However, previous studies have suggested that the Fe ion is internalized more rapidly than complexed iron. In the case of *C. albicans* in particular, the kinetics of internalization of Fe^{3+} is faster than that of the complexed iron in hemoglobin, which requires specific receptors.⁴⁸ Reductases present on the fungal cell surface reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , facilitating metal absorption.⁴⁹ Based on these observations, we propose that in the presence of Fe^{3+} from metal devices, the fungus internalizes the ion in detriment of hemolytic factor secretion, which is less effective in the presence of iron. Panel #2 in Figure 1 illustrates this hypothesis. Interestingly, this scenario points to an incongruity in virulent behavior: if the fungus attacks red blood cells with less intensity in the pursuit of hemoglobin, it will incorporate ionic iron faster and thus increase its rate of cell

division, adhesion to oral mucosa cells and formation of germ tubes.⁵⁰ However, as occurred for Ni^{2+} in relation to SAP, the effect of Fe^{3+} as a hemolysis reducer in the mixture of ions seems to have been offset by the maintenance or increase of hemolytic activity induced by other metal ions.

In patients, the levels of these ions depend on a myriad of factors including the types of alloys used in the construction of the appliances, the degree of corrosion and the extent of co-colonization by acidogenic microbes. Despite the strong likelihood of these interactions, to our knowledge this is the first study that has examined the possibility that these ions could affect the virulence of an oral organism in a context similar to that in which orthodontic appliances are involved. However, other factors, such as sialometric and sialochemical variations,³³ smoking,^{22,23} immunodeficiency, diet rich in sugars, and deficient hygiene should also be considered as contributors to the formation of *Candida* spp. biofilms.

CONCLUSIONS

Our findings are clinically relevant and indicate that different metal ions from the degradation of orthodontic appliances can modulate different virulence factors. While different ions had varying effects on the expression of factors such as aspartyl proteases and hemolysins, all ions tested promoted substantial increases in the biomass of *C. albicans* biofilms. However, the clinician should keep in mind that other host-dependent variables (salivation status, immunocompetence, medication and diet type) should be considered.

REFERENCES

1. 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;11:51-6.
2. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:687-93; discussion 693-4.
3. Burrows D. Hypersensitivity to mercury, nickel and chromium in relation to dental materials. *Int Dent J* 1986;36:30-4.
4. Dunlap CL, Vincent SK, Barker BF. Allergic reaction to orthodontic wire: report of case. *J Am Dent Assoc* 1989;118:449-50.
5. Hensten-Pettersen A. Casting alloys: side-effects. *Adv Dent Res* 1992;6:38-43.
6. Brendlinger DL, Tarsitano JJ. Generalized dermatitis due to sensitivity to a chrome cobalt removable partial denture. *J Am Dent Assoc* 1970;81:392-4.
7. Ağaoğlu G, Arun T, Izgi B, Yarat A. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2001;71:375-9.
8. Gottlieb EL, Nelson AH, Vogels DS 3rd. 1996 JCO Study of Orthodontic Diagnosis and Treatment Procedures. Part 1. Results and trends. *J Clin Orthod* 1996;30:615-29.
9. Hwang CJ, Shin JS, Cha JY. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:383-91.
10. Kerosuo H, Moe G, Hensten-Pettersen A. Salivary nickel and chromium in subjects with different types of fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111:595-8.

11. Bhaskar V, Subba Reddy VV. Biodegradation of nickel and chromium from space maintainers: an in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2010;28:6-12.
12. Kuhta M, Pavlin D, Slaj M, Varga S, Lapter-Varga M, Slaj M. Type of archwire and level of acidity: effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. Angle Orthod 2009;79:102-10.
13. Eliades T, Pratsinis H, Kletsas D, Eliades G, Makou M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloys. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;125:24-9.
14. 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.
15. Atack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. J Periodontol 1996;67:78-85.
16. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. J Am Acad Dermatol 1994;31(3 Pt 2):S2-5.
17. 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.
18. 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.
19. Lee W, Low BK, Samaranayake LP, Hagg U. Genotypic variation of *Candida albicans* during orthodontic therapy. Front Biosci 2008;13:3814-24.
20. Carvalho AP, Gursky LC, Rosa RT, Rymovicz AU, Campelo PM, Grégio AM, Koga-Ito CY, Samaranayake LP, Rosa EA. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may modulate the protease activity of *Candida albicans*. Microb Pathog 2010;49:315-22.

21. Mores AU, Souza RD, Cavalcá L, de Paula E, Carvalho A, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of Secretory Aspartyl Protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses* 2009 Oct 28. [Epub ahead of print]
22. Baboni FB, Barp D, Izidoro AC, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. *Mycopathologia* 2009;168:227-35.
23. Baboni FB, Guariza Filho O, Moreno AN, Rosa EA. Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:427-34.
24. Gürsoy S, Acar AG, Seşen C. Comparison of metal release from new and recycled bracket-archwire combinations. *Angle Orthod* 2005;75:92-4.
25. American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard specification for reagent water. Document D 1193-91. Philadelphia, Pennsylvania: ASTM. 1991.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS. 1997.
27. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52:761-7.
28. de Brito Costa EM, dos Santos AL, Cardoso AS, Portela MB, Abreu CM, Alviano CS, Hagler AN, de Araújo Soares RM. Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:173-80.
29. dos Santos AL, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, Alviano CS, de Araújo Soares RM. Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human

- serum proteins and extracellular matrix components. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;46:209-20.
30. Imbert C, Imbert-Bouyer S, Kauffmann-Lacroix C, Daniault G, Rodier MH. Effect of azoles on the secretion of a *Candida albicans* metallopeptidase. Mycopathologia 2006;161:147-52.
 31. De Bernardis F, Mondello F, San Millàn R, Pontòn J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1999;37:3481-6.
 32. Frey J, Nicolet J. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca^{2+} . Infect Immun 1988;56:2570-5.
 33. Hibino K, Samaranayake LP, Hägg U, Wong RW, Lee W. The role of salivary factors in persistent oral carriage of *Candida* in humans. Arch Oral Biol 2009;54:678-83.
 34. Hibino K, Wong RW, Hägg U, Samaranayake LP. The effects of orthodontic appliances on *Candida* in the human mouth. Int J Paediatr Dent. 2009;19:301-8.
 35. Pesti M, Gazdag Z, Belágyi J. In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane, as revealed by EPR spectroscopy. FEMS Microbiol Lett 2000;182:375-80.
 36. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Rabiei M, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. Appl Environ Microbiol 2007;73:4940-9.
 37. Harrison JJ, Rabiei M, Turner RJ, Badry EA, Sproule KM, Ceri H. Metal resistance in *Candida* biofilms. FEMS Microbiol Ecol 2006;55:479-91.
 38. Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. Nat Rev Microbiol 2007;5:928-38.
 39. Acosta I, Rodríguez X, Gutiérrez C, Moctezuma M de G. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions onto fungal biomass. Bioinorg Chem Appl 2004;1-7.

40. Dönmez G, Aksu Z. Bioaccumulation of copper(II) and nickel(II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water Res* 2001;35:1425-34.
41. Al Mulla AH, Kharsa SA, Kjellberg H, Birkhed D. Caries risk profiles in orthodontic patients at follow-up using Cariogram. *Angle Orthod.* 2009 Mar;79:323-30.
42. Nishimura K, Igarashi K, Kakinuma Y. Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1998;180:1962-4.
43. DeCamilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. and Novick, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 1996;271:1533–9.
44. Toker A, Cantley LC. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997;387:673–676.
45. Kitanovic A, Nguyen M, Vogl G, Hartmann A, Günther J, Würzner R, Künkel W, Wölfl S, Eck R. Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34 of *Candida albicans* is involved in filamentous growth, secretion of aspartic proteases, and intracellular detoxification. *FEMS Yeast Res* 2005;5:431-9.
46. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 2009;56:211-24.
47. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M, Matsumoto T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 1999;145:689-94.
48. Pendrak ML, Krutzsch HC, Roberts DD. Structural requirements for hemoglobin to induce fibronectin receptor expression in *Candida albicans*. *Biochemistry* 2000;39:16110-8.
49. Howard DH. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:394-404.

50. Sweet SP, Douglas LJ. Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1991; 137:859-65.

TABLE I.

Table I. Average values of biomasses, Sap specific activity, and hemolysin specific activity of 72 h-old *C. albicans* SC5314 biofilms grown in presence of metallic cations simulating orthodontic exfoliation

	Metallic ion				
	10 ng.mL ⁻¹ Ni ⁺² (170 nM)	6.77 ng.mL ⁻¹ Fe ⁺³ (121 nM)	4.5 ng.mL ⁻¹ Cr ⁺³ (86.5 nM)	0.44 ng.mL ⁻¹ Co ⁺² (7.46 nM)	Control
Biofilm biomass (OD ₅₄₀ CV retention)	0.452±0.061 ^a	0.425±0.065 ^a	0.427±0.091 ^a	0.405±0.064 ^{ab}	0.351±0.086 ^b
Sap specific activity [mU (OD ₄₄₀ .min ⁻¹).biomass ⁻¹]	0.183±0.012 ^a	0.106±0.037 ^b	0.139±0.051 ^{ab}	0.105±0.022 ^b	0.125±0.047 ^b
Hemolysin specific activity [mU (OD ₅₄₀ .min ⁻¹).biomass ⁻¹]	0.226±0.070 ^a	0.163±0.088 ^b	0.264±0.035 ^{ac}	0.219±0.077 ^a	0.241±0.084 ^{ac}

Similar superscript letters denote similarity between pairs of treatment (p>0.05). Different letters denote difference between pairs of treatment (p < 0.05).

FIGURE 1

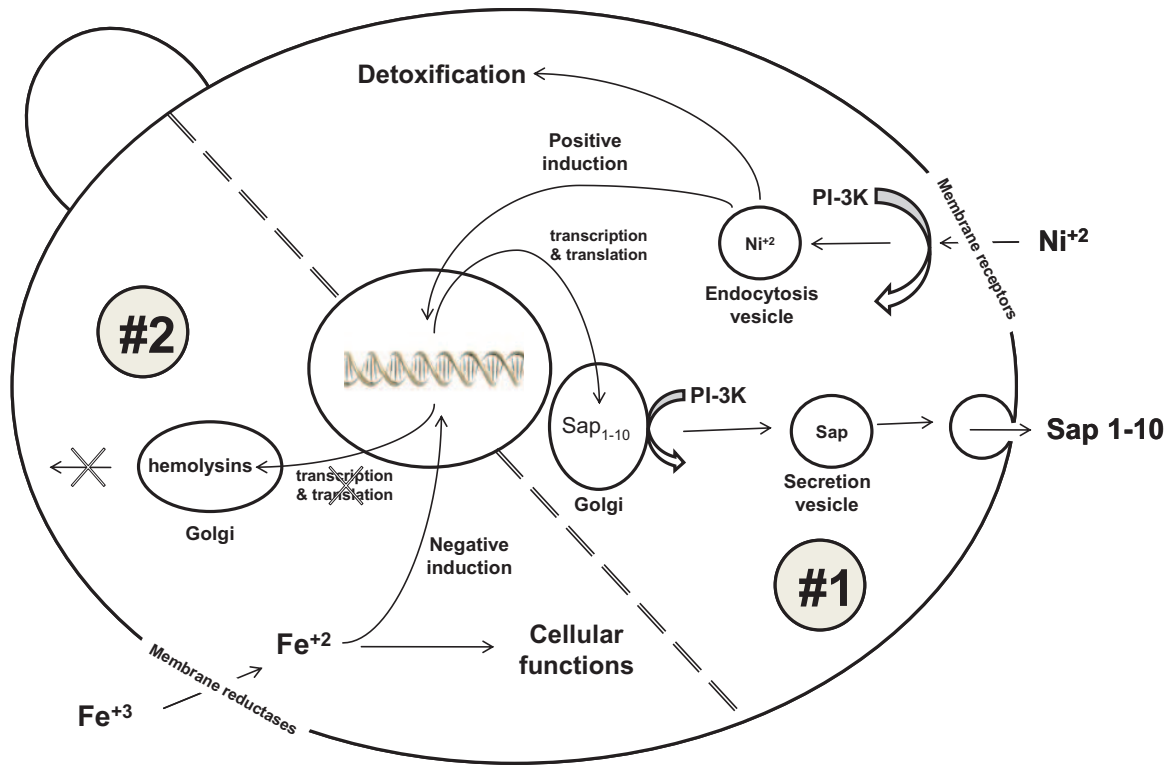


Figure 1. Proposed pathways involved on the increase of Sap by Ni^{+2} (#1) and on the repression of hemolysins by Fe^{+3} (#2) in *C. albicans* cells.

ANEXO I – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 1. Teste de normalidade Komogorov-Smirnov das variáveis estudadas, PUCPR – 2010

Variáveis	Grupo	Estatística	n	Valor p
Biomassa	Controle	0.123	24	0.200
	Níquel	0.211	24	0.007*
	Ferro	0.185	24	0.031*
	Cromo	0.103	24	0.200
	Cobalto	0.151	24	0.160
	Mix	0.145	24	0.200
Atividade específica de protease	Controle	0.167	24	0.078
	Níquel	0.226	24	0.002*
	Ferro	0.208	24	0.008*
	Cromo	0.203	24	0.011*
	Cobalto	0.191	24	0.022*
	Mix	0.188	24	0.026*
Atividade específica de hemolisina	Controle	0.147	24	0.190
	Níquel	0.092	24	0.200
	Ferro	0.218	24	0.004*
	Cromo	0.210	24	0.007*
	Cobalto	0.187	24	0.028*
	Mix	0.085	24	0.200

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: *Variáveis que não apresentam distribuição normal ($p < 0.05$).

Tabela 2. Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene das variáveis estudadas, PUCPR – 2010

Variáveis	Estatística	Valor p
Biomassa	1,663	0,147
Atividade específica de protease	11,760	0,000*
Atividade específica de hemolisina	1,042	0,395

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: *Variáveis que não apresentam homogeneidade de variâncias ($p < 0.05$).

Tabela 3. Estatísticas descritivas das variáveis estudadas, PUCPR – 2010

Variáveis	Grupos	n	Média	Mediana	D.P.	Mínimo	Máximo	I.C. de 95% para média	
								Limite mínimo	Limite máximo
Biomassa	Controle	24	0,351	0,332	0,086	0,191	0,526	0,387	0,191
	Níquel	24	0,452	0,440	0,061	0,329	0,551	0,478	0,329
	Ferro	24	0,425	0,437	0,065	0,275	0,562	0,452	0,275
	Cromo	24	0,439	0,439	0,068	0,287	0,565	0,467	0,287
	Cobalto	24	0,405	0,423	0,064	0,276	0,541	0,432	0,276
	Mix	24	0,430	0,433	0,051	0,293	0,522	0,451	0,293
Atividade específica de protease	Controle	24	0,134	0,122	0,047	0,074	0,272	0,154	0,074
	Níquel	24	0,188	0,149	0,112	0,080	0,465	0,236	0,080
	Ferro	24	0,110	0,095	0,037	0,066	0,200	0,126	0,066
	Cromo	24	0,135	0,110	0,070	0,074	0,329	0,164	0,074
	Cobalto	24	0,108	0,103	0,022	0,078	0,162	0,117	0,078
	Mix	24	0,134	0,119	0,052	0,080	0,303	0,156	0,080
Atividade específica de hemolisina	Controle	24	0,251	0,239	0,084	0,121	0,417	0,287	0,121
	Níquel	24	0,227	0,233	0,070	0,114	0,387	0,257	0,114
	Ferro	24	0,158	0,150	0,055	0,089	0,290	0,182	0,089
	Cromo	24	0,265	0,261	0,092	0,106	0,519	0,304	0,106
	Cobalto	24	0,227	0,214	0,077	0,096	0,403	0,259	0,096
	Mix	24	0,315	0,311	0,071	0,184	0,450	0,344	0,184

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (D.P.) Desvio padrão, (I.C.) Intervalo de confiança.

Tabela 4. Análise de Variância ANOVA a um critério entre os grupos em relação às variáveis estudadas, PUCPR – 2010

Variáveis	F	Valor p	Poder do teste
Biomassa	6,960	0,000*	0,998
Atividade específica de protease	4,993	0,000*	0,980
Atividade específica de hemolisina	11,167	0,000*	0,999

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS*

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 (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