DANILO DE MELO LOPES

**Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite sob prótese em
usuários de próteses totais**

São Paulo

2011

DANILO DE MELO LOPES

**Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite sob
prótese em usuários de próteses totais**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientador: Profa. Dra. Regina Tamaki.

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lopes, Danilo de Melo

Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite sob prótese em usuários de próteses totais [versão original] / Danilo de Melo Lopes; orientador Regina Tamaki. -- São Paulo, 2011.

73p. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Prótese Dentária. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Estomatite sobre prótese – Terapia fotodinâmica. 2. Prótese total – Estomatite.
I. Tamaki, Regina. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lopes, DM. Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite sob prótese em usuários de próteses totais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Bolivar e Maria Antonia, que desde cedo nos mostrou a importância da educação para atingir os objetivos na vida e por acreditar e investir nessa longa jornada longe de casa.

Aos meus irmãos Fábio e Renata, por compartilhar e fazer companhia durante todo esse tempo.

À minha namorada Maria Fernanda, pelo companheirismo, paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Tamaki, que sempre me apoiou em todas dificuldades do Mestrado, que nunca deixou de incentivar em um só segundo no desenvolvimento deste trabalho e por ser a grande responsável por hoje fazer parte deste grupo.

Ao Prof. Dr. Atlas Moleros Nakamae, meu primeiro orientador, responsável por me direcionar ao mundo da pesquisa e pelo seu papel fundamental no desenvolvimento deste tema.

À Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula, que abriu as portas do seu laboratório e dos seus conhecimentos passados sobre micologia permitindo a execução deste projeto.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Magnífico Reitor Prof. Dr. João Grandino Rodas. À Faculdade de Odontologia, representada pelo seu diretor, Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha e da chefe do Departamento de Prótese Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da USP, presidida pela Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães e a Coordenadora de Programa Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Total da Faculdade de Odontologia da USP, Profa. Dra. Maria Cecília Miluzzi, Prof. Dr. Roberto Nobuaki Yamada e Prof. Dr. Vyto Kiausins pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas de Pós-Graduação e, em especial à Carolina, que mesmo por um período longe, dividíamos as alegrias e frustrações desta caminhada.

A todos meus amigos da Disciplina de Prótese Total da Faculdade de Odontologia da USP, Jun, Roger, Flávio, Carol, Wallace, Karin, Victor, Sanmy, Juliana e Tatiana.

Ao Prof. Dr. Eriques Gonçalves Silva, pela sua ajuda indispensável durante a elaboração e o desenvolvimento do projeto de Mestrado.

Às Professoras do LELO, em especial a Profa. Dra. Ana Cecília Correa Aranha e a Juliana Marotti por compartilharem seus conhecimentos na área de *Laser*, uma tecnologia com inúmeras aplicações.

Aos Professores da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da USP, em especial ao Prof. Dr. Dante Antonio Migliari, Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira e ao Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Jr., por abrirem as portas da disciplina e compartilharem seus conhecimentos.

Aos colegas do ICB que muito me ajudaram no desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do Departamento de Prótese Dentária da Faculdade de Odontologia da USP.

Às funcionárias do Serviço de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da USP, Alessandra Moreira de Lima e Cátia Tiezzi dos Santos

Aos pacientes voluntários que sempre colaboraram com a pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Minha eterna gratidão.

"A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original".

Albert Einstein

RESUMO

Lopes, DM. Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite sob prótese em usuários de próteses totais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original

A estomatite sob prótese é uma inflamação causada pela *Candida* spp associada ao uso de próteses totais e que também pode ser encontrada em pacientes usuários de outros tipos de próteses. Uma das principais preocupações é promover uma condição de saúde adequada a esses usuários. Assim, tem-se pesquisado muitos métodos de higienização das próteses totais e tratamentos para eliminação da *Candida*. Nos pacientes com sistema imunológico debilitado, desnutridos, idosos e recém-nascidos, a ocorrência de candidíase é alta, em suas variadas formas clínicas. Para o tratamento convencional da doença utiliza-se a nistatina ou miconazol. A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma técnica que pode potencialmente atingir células prejudiciais sem afetar os tecidos normais do hospedeiro. A efetividade da terapia combina dois princípios: o acúmulo preferencial de fotossensibilizador nas células alvo e a irradiação precisa da luz, o que possibilita a ação seletiva e localizada da terapia fotodinâmica. A terapia apresenta como vantagens ser um método não invasivo; que não apresenta evidência de promover resistência bacteriana; de baixo custo quando comparado ao laser de alta potência; sem efeitos colaterais, além de agir seletivamente na área de aplicação. O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação da PDT no tratamento da estomatite sob prótese em usuários de próteses totais. Após triagem, 22 pacientes foram selecionados (seguindo os critérios de inclusão e exclusão) e divididos em dois grupos: controle (05 mL de nistatina, 06 vezes ao dia, durante 14 dias) e experimental, submetidos à PDT, cujo protocolo foi: irradiação, por meio da técnica pontual em contato, de 120J/cm² de densidade de energia, 40mW de potência, 2min por ponto. A PDT2 foi realizada 07 dias após a PDT1. Para ambos os grupos foi realizada uma coleta 30 dias após a terapia proposta. Todo material coletado passou por diluições seriadas, semeado em meios de cultura e incubados para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Nos

grupos em que houve isolamento da levedura, todos os tratamentos com a PDT reduziram significativamente ($p<0.05$) a carga da levedura na mucosa dos pacientes em todos os tempos de tratamento, comparado a fase pré tratamento. Houve uma redução significativa ($p<0.05$) no grupo tratado, por 7 dias, quando comparado ao grupo tratado, após os 30 dias. Nos pacientes em que houve isolamento da levedura a redução no isolamento foi significativamente maior ($p<0.05$) em todos os tempos de tratamentos quando comparado ao grupo de pacientes na fase pré tratamento, não houve diferença significativa ($p<0.05$) no isolamento da levedura em nenhum tempo do tratamento, (Figura 16). A redução no isolamento de *Candida* foi significativamente maior ($p<0.05$) no grupo tratado com a terapia fotodinâmica (PDT) por 7 e 14 dias quando comparado ao grupo tratado com nistatina pelo mesmo período. Com isso foi possível concluir que, dentro das condições clínicas desse trabalho, o tratamento com terapia fotodinâmica foi uma alternativa eficaz no tratamento da estomatite sob prótese

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, estomatite sob prótese, *Candida*, prótese total.

ABSTRACT

Lopes, DM. Effect of photodynamic therapy on denture stomatitis in complete denture wearers [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original

Denture stomatitis is pathological condition in complete or partial denture wearers caused by *Candida* spp. In the present, the major concern is to promote a proper health condition. Thus, many hygiene methods and treatments for elimination of *Candida* have been studied. The incidence of candidiasis is high in patients with low immune system, elderly and infants. For the conventional treatment, nystatin or miconazole are used. Photodynamic Therapy is a technique that can potentially reach harmful cells without damaging effects to normal tissue. The effectiveness of the therapy combines two principles: the preferential accumulation of the sensitizer in the target cells and light irradiation, which enables the selective and localized photodynamic therapy. PDT has the advantage of be a noninvasive treatment, shows no evidence promoting bacterial resistance, has low cost when compared to high power lasers, has no side effects and act selectively in the area of application. The aim of this study was to evaluate the PDT effectiveness on denture stomatitis treatment in complete denture wearers. 22 patients were selected (by inclusion and exclusion criteria) and located in two groups: control (05 mL of nystatin, 06 times a day, 2 weeks) and experimental group, treated by PDT which protocol was: irradiation by laser with wavelength of 660nm, output power of 40mW, energy density of 120 J/cm², 02 minutes per point. The PDT2 was performed 07 days after PDT1. For both groups samples were collected 30 days after the proposed therapy. Sample were collected from the palatal mucosa and underwent serial dilution, were spread into culture media and incubated for subsequent colony forming units counting (CFU). All treatments with PDT significantly reduced ($p < 0.05$) the number of yeast counting in patients mucosa at all treatment times compared to before treatment (initial). There were significant decrease ($p < 0.05$) in the group after one week of treatment when compared to the group 30 day after treatment. The reduction in the isolation of *Candida* was significantly higher ($p < 0.05$) in the group treated by the photodynamic therapy (PDT) on day 7 and 14 when compared with group treated by

nystatin for the same period. Thus, we conclude that under the conditions provided by this clinical study, photodynamic therapy can be an effective alternative treatment of denture stomatitis in complete denture wearers.

Keywords: Photodynamic therapy, denture stomatitis, *Candida*, complete denture.

.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
CO ₂	dióxido de carbono
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
μm	micrômetro
μM	micromolar
μg	micrograma
mL	mililitro
mm	milímetro
mW	mili Watt
nm	nanômetro
mg	miligrama(s)
ATP	Trifosfato de adenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
g	grama
g/mol	grama por mol
h	hora
Hz	<i>hertz</i>
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
pH	potencial hidrogeniônico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> (terapia fotodinâmica)
s	segundo
UFC	Unidades formadoras de colônias
w	Watt

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
AsGaAl	arseneto de gálio e alumínio
Ca	cálcio
InGaAlP	fosfeto de índio-gálio-alumínio
Nd:YAG	granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio
HeNe	hélio-neônio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Estomatite Sob Prótese	17
2.2 Laser na Odontologia	21
2.2.1 LLLT-Low Level Laser Therapy (Terapia com Laser de Baixa Potência)	24
2.2.2 Terapia Fotodinâmica	26
2.2.2.1 azul de metileno	29
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Local da pesquisa	34
4.2 Pacientes	34
4.3 Coleta inicial das amostras	35
4.4 Grupo controle	35
4.5 Grupo experimental	35
4.6 Procedimento da coleta das amostras	37
4.7 Avaliação	38
4.8 Identificação das amostras	39
4.9 Identificação presuntiva de <i>Candida dubliniensis</i>	44
4.10 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Pacientes selecionados	46
5.2 Identificação das leveduras	46
5.3 Diferenciação de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida dubliniensis</i>	47
5.4 Tratamentos	47
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	68
APÊNDICES	69

1 INTRODUÇÃO

Candidíase, ou candidose, é um termo usado para determinar um grupo de doenças resultantes da infecção por *Candida* spp (1). Essas lesões podem variar desde lesões superficiais na mucosa até infecções sistêmicas extremamente graves (2). Clinicamente, a candidíase bucal pode apresentar-se como pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica (3).

A forma pseudomembranosa caracteriza-se como placas brancas e cremosas aderentes à mucosa bucal que quando removidas pela raspagem expõem uma mucosa adjacente normal ou eritematosa (4). Histologicamente, a pseudomembrana é formada por tecidos necróticos, restos alimentares, leucócitos e bactérias, juntamente com leveduras e hifas de *Candida*, que podem apresentar invasão na camada queratinizada do epitélio. Observa-se ainda acantose, edema e micro abscessos intra-epiteliais. Infiltrado inflamatório polimorfonuclear, linfócitos e macrófagos estão presentes no tecido conjuntivo (5, 6). Os sítios mais freqüentemente atingidos por esse tipo de candidose são o palato mole, orofaringe, dorso da língua, mucosa jugal e gengiva (1).

A candidíase eritematosa tem sido associada com infecção pelo HIV, representando cerca de 50% das candidíases encontradas nesses pacientes. Ocorrem na maioria dos casos no dorso da língua, ou palato, como áreas avermelhadas de bordas pouco definidas. Histologicamente, o aspecto é semelhante ao observado na pseudomembranosa, entretanto a quantidade de hifas é menor e a reação inflamatória no tecido conjuntivo é mais intensa (7).

A forma hiperplásica é uma condição crônica cujo aspecto clínico é caracterizado pela presença de placas brancas que não podem ser removidas pela raspagem. É caracterizada por intensa penetração de hifas na superfície do epitélio, que apresenta hiperplasia e acantose, com reação inflamatória variando de moderada a severa, no tecido conjuntivo subepitelial (4, 6, 8).

A estomatite sob prótese é uma inflamação causada pela *Candida* spp associada ao uso de próteses totais e que também pode ser encontrada em pacientes usuários de outros tipos de próteses. Uma das principais preocupações é promover uma condição de saúde adequada a esses usuários. Assim, tem-se

pesquisado muitos métodos de higienização das próteses totais e tratamentos para eliminação da *Candida* (9).

A *Candida albicans* é uma levedura endógena oportunista e freqüentemente encontrada na cavidade oral, em porcentagens que variam entre 30 a 60%, seguindo em menor número pelas outras espécies: *C. tropicalis* e *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* entre outras. Essas espécies do gênero *Candida* podem causar infecção primária ou secundária. Os processos patológicos são variados, variando desde irritação e inflamação até uma resposta granulomatosa e supurativa (10).

Nos pacientes com sistema imunológico debilitado, desnutridos, idosos e recém-nascidos, a ocorrência de candidíase é alta, em suas variadas formas clínicas. Para o tratamento convencional da doença utiliza-se a nistatina ou miconazol. Porém, estes fármacos apesar de serem bem tolerados, podem causar distúrbios gastrointestinais leves e transitórios, como náuseas, vômito e diarreia, após ingestão oral. Por estes efeitos colaterais e resistência aos antimicóticos, a prevenção e os tratamentos alternativos para estomatite sob prótese e/ou candidíase tornam-se necessários.

A utilização do *laser* para a descontaminação está crescendo entre os profissionais. O *laser* de baixa potência tem efeito de biomodulação, anti-inflamatório e analgesia (11). Quando associado a um fotossensibilizador, ativa o mesmo, que passa a absorver os fótons, convertendo-se em um estado excitado. É possível que a energia transferida para as moléculas vizinhas resulte na formação de moléculas reativas, como o oxigênio singlete, os íons superóxidos, as hidroxilas e outros radicais livres, que podem danificar ou matar as células bacterianas (11-13), além de neutralizar os fatores de virulência presentes após a morte bacteriana (14). Esse processo é conhecido como terapia fotodinâmica ou PDT (do inglês, *Photodynamic Therapy*). Apesar do mecanismo da terapia fotodinâmica ser conhecido há muitos anos, apenas recentemente houve um maior interesse da comunidade científica sobre as aplicações na clínica diária (15). A terapia fotodinâmica tem sido empregada nas diversas especialidades da Odontologia com o objetivo principal de redução bacteriana (16). Entretanto, estudos mostram também a efetividade dessa terapia em inativação viral (11, 13, 17-22) e descontaminação fúngica (23-30). O mecanismo de destruição do fungo por meio da PDT envolve o rompimento da

membrana celular devido aos radicais de oxigênio induzidos pelo azul de metileno e aplicação do *laser* (31, 32). A terapia apresenta como vantagens ser um método não invasivo; que não apresenta evidência de promover resistência bacteriana; de baixo custo quando comparado ao *laser* de alta potência; sem efeitos colaterais, além de agir seletivamente na área de aplicação (14, 33-37).

A terapia fotodinâmica é uma técnica que pode potencialmente atingir células prejudiciais sem afetar os tecidos normais do hospedeiro (11, 35, 38). Essa terapia foi inicialmente idealizada para o tratamento do câncer, baseada na observação de que algumas moléculas não tóxicas - os fotossensibilizadores, como os derivados das porfirinas - se acumulam principalmente nas células malignas e, quando uma luz (geralmente um *laser*) é aplicada nos tecidos contendo a droga, ela é ativada e os tecidos são rapidamente destruídos, precisamente onde a irradiação foi direcionada. A efetividade da terapia combina dois princípios: o acúmulo preferencial de fotossensibilizador nas células alvo e a irradiação precisa da luz, o que possibilita a ação seletiva e localizada da terapia fotodinâmica (34, 35, 39, 40).

A ação da PDT depende de inúmeros fatores, como: fotossensibilizador; densidade de energia; tempo de exposição; densidade do biofilme bacteriano; comprimento de onda; capacidade de absorção de luz pelo microrganismo fotossensibilizado; estado fisiológico da bactéria; pH do meio; quantidade de água e condutibilidade térmica. Sendo importante o desenvolvimento de protocolos para cada uso (14, 33-36, 41).

Não há, entretanto, um consenso na literatura sobre quais parâmetros para a irradiação a laser seriam mais eficazes para a descontaminação fúngica *in vivo* (23, 29, 42-45). A utilização da PDT como método alternativo para inativação destes microrganismos patogênicos é de grande valia no âmbito clínico (46).

O presente estudo teve por objetivo avaliar, a ação da PDT no tratamento da estomatite sob prótese em usuários de próteses totais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estomatite Sob Prótese

A estomatite sob prótese é a disfunção mais comum encontrada na mucosa oral em pacientes usuários de próteses totais. Esta condição é causada pela infecção por diferentes espécies de *Candida* (47). O tratamento com agentes antifúngicos, como os poliênicos (nistatina e anfotericina) ou clotrimazóis, atinge somente respostas transitórias e recidivas são bastante comuns devido à etiologia multifatorial da doença (48).

Black, em 1885, foi o primeiro a reportar a patologia mediada por prótese como “*sore mouth under plates*”. Cahn (49) foi o primeiro a sugerir que a *Candida albicans* é o fator etiológico da estomatite sob prótese.

Matin e Lamb (50), em um trabalho sobre a frequência dos sorotipos de *Candida albicans* em pacientes usuários de próteses totais com e sem estomatite protética, compararam os diferentes sorotipos de *Candida albicans* encontrados na base da prótese, mucosa palatal e jugal. Vinte e nove dos trinta pacientes avaliados do grupo caso apresentaram somente cepas de *Candida albicans* do sorotipo A e somente um paciente apresentou o sorotipo B. Já no grupo controle, que não apresentavam sinais e sintomas da doença, foram encontrados tanto o sorotipo A quanto o B. Isso fez com que eles concluíssem que a estomatite protética está associada com a proliferação de somente um sorotipo de *Candida albicans*, geralmente o sorotipo A.

Nikawa et al. (51) realizaram uma revisão sobre a colonização de próteses relacionadas à presença de *Candida albicans* e concluíram que a colonização da prótese contendo *Candida* além de causar candidíase bucal e estomatite sob prótese pode também causar cáries e periodontites nos dentes pilares e que a deglutição ou aspiração contínua de microrganismos da prótese colonizada pode expor os pacientes, particularmente os imunocomprometidos ou idosos quem fazem uso de medicações, ao risco de infecções inesperadas.

Chandra et al. (52) avaliaram a resistência a antifúngicos de biofilmes de *Candida* em Próteses de Resina Acrílica *in vitro*. Neste estudo, um modelo reprodutível de biofilme de *Candida albicans* em prótese foi produzido e utilizado na determinação da susceptibilidade de dois isolados de *Candida albicans* a quatro antifúngicos. *C. albicans*, em biofilmes, apresentou resistência a anfotericina B, nistatina, clorexidina e fluconazol, com 50% de redução da atividade metabólica em concentrações de 8, 16, 128 e > 64 µg/mL, respectivamente. Em contraste, culturas planctônicas de *C. albicans* foram suscetíveis a concentrações de 0.25, 1.0, 4.0 e 0.5 µg/mL, respectivamente. Como conclusão, pelos resultados obtidos com o modelo de células de *C. albicans* associados a biofilmes, comparados com a forma planctônica, são mais resistentes aos antifúngicos usados no tratamento da estomatite protética.

Kulak-Ozkan et al. (53) avaliaram os hábitos de higiene oral, higiene da prótese, presença de leveduras e estomatite em idosos. Nesse estudo, setenta usuários de próteses totais foram investigados clínica e micologicamente. Os sujeitos foram avaliados de acordo com a presença de estomatite, presença de levedura, higiene da prótese, e frequência da escovação e métodos de higiene. Amostras foram coletadas do palato para a identificação das colônias. Segundo os resultados obtidos, não foi encontrada relação estatística entre estomatite protética, a frequência da escovação e o método de higiene. Porém, houve correlação estatisticamente significativa entre a estomatite protética, presença de levedura e higiene da prótese.

Soyza e Ellepola (54) em uma revisão sobre o impacto do cigarro/fumo sobre a candidíase bucal mostram que o fumo, em inúmeros estudos, tanto sozinho quanto em combinação a outros fatores, representa ser um fator predisponente importante na candidíase bucal.

Golecka et al. (55) avaliaram a presença da estomatite protética associada à *Candida* em pacientes após terapia imunossupressora. O objetivo deste trabalho era estabelecer a frequência e intensidade da estomatite protética e candidíase bucal em usuários de próteses totais tratados com drogas imunossupressoras. Foram feitos exames clínicos e físicos no grupo experimental e controle. Em ambos os grupos foram realizadas análises micológicas através do método SWAB e ágar Sabouraud. Os resultados obtidos sugerem que pacientes

imunossuprimidos foram freqüentemente mais suscetíveis a infecções por *Candida albicans* e estomatites.

Dorocka-Bobkowska e Konopka (56) avaliaram a susceptibilidade de espécies de *Candida* isoladas de pacientes com estomatite sob prótese à quatro antifúngicos. Um total de 120 culturas de *Candida* foram identificadas: *C. albicans* (59,2%), *C. glabrata* (20%), *C. tropicalis* (12,5%) e *C. parapsilosis* (8,3%). A anfotericina B, a 5-fluorocitosina, fluconazol e o itraconazol foram efetivos contra *C. albicans* (100%, 98,6%, 88,7% e 87,3%) e 79,6%, 77,6%, 71,4% e 79,6% com as outras espécies. Com isso, concluíram que a identificação das espécies de *Candida* e a determinação da sua susceptibilidade aos antifúngicos é de grande importância no manejo com a estomatites sob prótese.

Figueiral et al. (57) realizaram um estudo com o objetivo de identificar e caracterizar fatores etiológicos e predisponentes da estomatite sob prótese, por meio de um estudo transversal, caso-controle e longo cohort, onde 140 usuários de próteses totais maxilares foram selecionados. Os dados foram obtidos por 1) questionário, incluindo identificação do sujeito da pesquisa, dados sociais e demográficos e história médica, 2) exame intra-oral, 3) avaliação da prótese, 4) análise microbiológica e 5) identificação e análise das leveduras. Os resultados mostraram associação significativa entre a estomatite sob prótese, leveduras, gênero, idade e consumo de álcool. Também foi encontrada relação significativa entre a presença de leveduras, hipossalivação e o decréscimo do pH da saliva. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos com e sem a estomatite no que se refere a presença ou não de leveduras. Na maioria dos casos onde houve a presença de estomatite, houve também a presença de *Candida albicans*.

Coco et al. (58) realizaram um estudo com o objetivo de examinar a micologia oral em pacientes com estomatite sob prótese, utilizando uma técnica de amostragem melhorada, para determinar se tanto a diversidade quanto a quantidade de espécies estavam relacionadas com esta patologia. Amostras da saliva e da prótese foram coletadas e processadas para que a leveduras bucais fossem analisadas quantitativa e qualitativamente. As leveduras mais encontradas foram a *C. albicans* (75%) e a *C. glabrata* (30%), isoladas em maior proporções em pacientes com maior grau de inflamação (100% e 80%), e dentro de 80% dos pacientes. Estes autores concluíram que, de acordo com o estudo, biofilmes associados de *C.*

albicans e *C. glabrata* têm um papel importante na patogenia associada com alto índice de inflamação em usuários de próteses.

Bilhan et al. (59) investigaram a relação da estomatite sob prótese com a presença de hifas de *C. albicans* e *Lactobacillus*. Neste trabalho, um total de 91 pacientes usuários de próteses totais maxilares e mandibulares foram selecionados. amostras do palato foram coletadas e testes micológicos e bacteriológicos foram realizados. Segundo os resultados, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a estomatite sob prótese e o uso contínuo da prótese ($p=0,015$). A presença de hifas de *C. albicans* se mostrou significativamente maior em casos de estomatite ($p<0,01$) e houve uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a presença de hifas e *C. albicans* ($p<0,01$). Outro achado interessante foi que pacientes com estomatite sob prótese apresentaram maior contagem de *Lactobacillus* na saliva ($p=0,04$) e no palato ($p=0,028$). Os autores concluíram que a *C. albicans* é um importante fator no desenvolvimento de estomatite sob prótese, que a presença de hifas parece facilitar o aumento da contagem de *C. albicans* e parece estar relacionada com a resposta inflamatória dos tecidos. Concluíram também que os *Lactobacillus* parecem ter papel importante no desenvolvimento de estomatite sob prótese. De acordo com outros estudos, os resultados obtidos confirmariam a importância da idade da prótese e o uso contínuo no desenvolvimento da estomatite sob prótese.

Abaci et al. (60) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a incidência de *Candida* spp. na cavidade bucal de usuários de próteses totais e caracterizar fatores predisponentes para a estomatite sob prótese. Nesse estudo, os usuários de próteses foram divididos em 4 grupos segundo a classificação de Newton. As leveduras encontradas na saliva e na mucosa, a fenotipagem e o impacto de alguns fatores para a presença da levedura foram avaliados. Os autores encontraram que quando a contagem de levedura é aproximadamente maior ou igual a 400 ufc/ml a frequência de estomatite aumenta. Nos pacientes que apresentavam estomatite, foi encontrada a presença da *Candida albicans* mais frequentemente. Foi encontrada relação direta com a higiene da prótese e a intensidade do crescimento da levedura e do desenvolvimento da estomatite sob prótese. Apesar da *Candida albicans* viver de forma comensal na cavidade oral, é capaz de causar infecções na presença de fatores predisponentes.

Zomodorian et al. (61) num estudo sobre a colonização das espécies de *Candida* e estomatite sob prótese em usuários de próteses totais, avaliaram 114 aposentados, dos quais coletaram amostras bucais para posterior análise laboratorial. Neste estudo, eles relatam que a *C. albicans* foi encontrada com mais frequência (61; 41,5%), seguidas pela *C. glabrata* (27; 18,4%) e *C. tropicalis* (19; 12,9%). Além disso, 16 amostras (10,9%) de *C. dubliniensis* foram encontradas. Os autores demonstraram, segundo o estudo, significativa associação entre o tempo de uso da prótese e a candidíase bucal.

As infecções causadas pela *Candida* estão recebendo cada vez mais atenção devido ao aumento da sua prevalência. Muitos estudos mostram que diferentes espécies de *Candida* possuem diferentes mecanismos de virulência que, em condições favoráveis, promovem a colonização e infecção no hospedeiro.

2.2 Laser na Odontologia

Laser é um acrônimo em inglês que significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. O *laser* é um dispositivo que produz radiação eletromagnética com características especiais que a diferem da luz comum: ela é monocromática (único comprimento de onda), coerente (possui relações de fase bem definidas), e colimada (propaga-se como um feixe). Os *lasers* utilizados na clínica diária têm comprimento de onda entre o vermelho e infravermelho próximo, portanto, na faixa não-ionizante do espectro eletromagnético. Assim, o *laser* não tem a capacidade de provocar mutações celulares e, conseqüentemente, o desenvolvimento de neoplasias (62).

Para que um *laser* funcione é necessário excitar um número mínimo de átomos de determinado material para um nível de energia superior, de modo a se obter uma inversão da população. Quando isso ocorre, a emissão espontânea de fótons é amplificada pelos átomos vizinhos, que vão emitir fótons estimulados pelos primeiros, levando a um efeito cascata, além de uma realimentação, ou seja, sempre manter fótons emitidos estimuladamente, interagindo com os átomos. Todo esse processo é obtido com uma cavidade óptica, uma região do espaço em que se

confina luz por algum tempo, com o uso de espelhos altamente refletores e convenientemente alinhados (62, 63).

A interação do *laser* com os tecidos depende de vários fatores, como: comprimento de onda do *laser*; potência do *laser*; tipo de tecido e a sua capacidade de absorção; frequência de pulsos por segundo; duração do pulso; quantidade de energia aplicada; distância focal e tempo de exposição.

A radiação *laser* pode ser refletida, transmitida, espalhada ou absorvida por um sistema biológico. Essas interações da luz com o tecido podem acontecer concomitantemente, sendo que a proporção que cada uma delas ocorrerá irá depender do tecido alvo, sua composição, modo de irradiação e das características e parâmetros da luz incidente. Assim, para que os ângulos de incidência e o de reflexão sejam iguais a zero, é necessário que a irradiação seja perpendicular ao tecido alvo, a fim de que a absorção da luz pelo tecido seja a máxima possível .

Em Odontologia, os *lasers* são utilizados em diversas especialidades como terapia complementar ao tratamento convencional. De uma forma geral, são divididos em *lasers* de alta e baixa potência. A escolha do tipo de *laser* irá depender, essencialmente, da patologia apresentada e do modo de absorção desejado. Logo, não existe o *laser* ideal mas, sim, o mais indicado para cada situação clínica (38, 62).

Um dos pioneiros na pesquisa com *laser* de baixa intensidade nas áreas biomédicas foi Mester (64) que publicou o primeiro trabalho científico referente aos efeitos não térmicos da luz *laser* sobre a pele de ratos, demonstrando que células em cultura e no tecido podem ser estimuladas por uma certa dose de luz *laser*. Esta radiação eletromagnética não ionizante pode interagir com o corpo em níveis molecular, celular, tecidual e orgânico, atuando na biomodulação, analgesia e modulação do processo inflamatório por meio de efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotomecânicos nas células do tecido irradiado (62, 65). Quando a luz interage com as células ou tecido, se administrada na dose correta, pode estimular certas funções celulares. Esse efeito é particularmente evidente se a célula tem a sua função debilitada por desordem funcional ou injúria ao tecido (65, 66).

Os *lasers* de baixa potência utilizados em Odontologia disponíveis no mercado estão na faixa do vermelho (630 a 700nm) ou do infravermelho (700 a 904nm) do espectro eletromagnético, que são os comprimentos de onda mais utilizados. A

escolha desse comprimento (vermelho ou infravermelho) irá depender da estrutura celular que se deseja atingir. O *laser* vermelho é o mais indicado no tratamento de lesões superficiais (pele e mucosa), devido à sua menor profundidade de penetração no tecido, ao contrário do *laser* infravermelho utilizado em nervos, ossos e músculos (62, 65, 67).

A literatura tenta explicar, hipoteticamente, a indução dos efeitos celulares promovidos pelos *lasers* na faixa do vermelho e do infravermelho (65, 68-72). Basicamente, dois tipos de reações ocorrem em fotobiologia: reações primárias induzidas pela luz, que atuam sobre os tecidos absorvedores e adjacentes, e reações secundárias que ocorrem na ausência de luz, também chamadas de efeitos indiretos, que atuam de formas local, regional e geral (73).

As reações primárias podem ocorrer: pela absorção da luz pelas enzimas mitocondriais, resultando em aquecimento local, gerado pelo aumento de vibração molecular (74) por absorção da luz por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva a alterações na transferência de elétrons, para seus pares reduzidos, localizados na mitocôndria (65, 68) por porfirinas endógenas que foto-induzem oxigênios singletos (71) ou ainda por ativação direta dos canais de Ca^{2+} da membrana celular, por meio de modificações fotofísicas, induzindo a entrada de Ca^{2+} intracelular e proliferação celular (69, 70). Essas situações acontecem simultaneamente no tecido irradiado, de forma que contribui para os efeitos biológicos posteriormente observados (73).

As reações secundárias (sem a presença de luz) sinalizam transdução e amplificação. As alterações do pH intracelular, relacionadas com a ativação das ATPases e seguidas por alterações nos níveis de cálcio intracelular, parecem ser um caminho comum para a transdução do sinal e amplificação de todas as fotorreações primárias citadas (75).

Alguns dos mecanismos secundários relatados na literatura são: aumento de metabolismo celular; proliferação e síntese de colágeno; síntese protéica; aumento no potencial de ação de células nervosas; estímulo da formação de DNA e RNA no núcleo celular; efeitos sobre o sistema imunológico pela ativação de linfócitos; formação de capilares estimulada pela liberação de fatores de crescimento e aumento na atividade de leucócitos (76-78).

É consenso na literatura o benefício que os *lasers* de baixa potência promovem aos tecidos. No entanto, os parâmetros ideais de irradiação para cada patologia ainda estão sendo definidos (79).

As últimas décadas têm visto um grande aumento de pesquisas da aplicação do *laser* na prática odontológica. Na Medicina e na Odontologia, os *lasers* de diodo têm sido predominantemente usados em aplicações comumente chamadas *low level laser therapy* – LLLT – ou bioestimulação (80), porém, existe muita controvérsia ao redor da sua efetividade em alguns procedimentos (81, 82) .

2.2.1 LLLT – *Low Level Laser Therapy* (Terapia com Laser de Baixa Potência)

Alguns estudos, especialmente aqueles onde se utiliza o *laser* em baixa intensidade, reportam uma melhora considerável na cura de patologias causadas por microrganismos , assim como na aceleração da cicatrização de feridas (83).

Em humanos, os efeitos benéficos da LLLT na aceleração da cura de doenças, principalmente da mucosa oral, têm se baseado em relatos de casos, um vez que ainda, poucos estudos têm sido dirigidos em larga escala. Para melhor entender a ação da LLLT na cura de doenças da mucosa, estudos clínicos de qualidade com um tipo de investigação bem controlada, parâmetros de tratamento e acompanhamento, e estudos correlacionados com os efeitos celulares e processos biológicos são necessários. Embora, as aplicações dos *lasers* de alta potência estejam já bem estabelecidas com um suporte significativo de literatura e uso disseminado em várias áreas, como por exemplo na oftalmologia, estudos conflitantes sobre a LLLT têm limitado seu uso como apenas investigativo. Ainda assim, a LLLT tem sido clinicamente muito utilizada em algumas áreas como coadjuvante em tratamentos neurológicos, quiropráticos, bucais e dermatológicos com larga aceitação por parte dos profissionais dessas áreas (84).

Clinicamente, a LLLT é utilizada no tratamento de parestesia, paralisia, nevralgia, afta, mucosite, herpes labial, queilite angular, hipersensibilidade dentinária, alveolite, pericoronarite, gengivite e periodontite, xerostomia, disfunção

temporomandibular, edema, pós-operatório de tecido mole, bioestimulação óssea, entre outros.

Nussbaum et al. (85) investigaram *in vitro* o efeito da LLLT no crescimento de bactérias. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* foram semeadas em agar e depois irradiadas com diferentes comprimentos de onda: 630, 660, 810 e 905 nm ($0,015 \text{ W/cm}^2$) e densidade de energia variando de 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 J/cm^2 . As células foram encubadas e contadas depois de 20 horas. De modo geral, houve interação entre o comprimento de onda e as espécies ($p=0,0001$) e entre o comprimento de onda e a densidade de energia ($p=0,007$). Os resultados obtidos permitiram que os autores observassem uma mudança significativa no crescimento bacteriano, no caso de densidades de energia variando de um a 20 J/cm^2 , concluindo assim que a LLLT aplicada em feridas pode produzir mudanças no crescimento bacteriano e que o comprimento de onda de 630 nm apresentou-se mais comumente associado à inibição bacteriana.

Maver-Biscanin et al. (44) examinaram, *in vivo*, o efeito da irradiação do *laser* de diodo no crescimento fúngico na mucosa do palato e da base da prótese total. No total, 70 pacientes que apresentavam estomatite sob prótese participaram deste estudo. Os participantes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos que receberam tratamentos com diferentes protocolos. 1) irradiados com *laser* de comprimento de onda de 685 nm por 10 minutos (30 mW); 2) irradiados com 830 nm por 5 minutos (60 nW); 3) grupo controle (irradiação placebo) e 4) tratados com antifúngico oral em gel (miconazol) e desinfecção da prótese com o uso de solução anti-séptica. O efeito da laserterapia sobre o crescimento fúngico foi avaliado através do método *swab* e estimativa semi-quantitativa das UFCs. Os autores obtiveram resultado fungicida tanto no grupo tratado com o *laser* quanto no grupo tratado com o antifúngico, porém, na maioria dos sujeitos do grupo controle não houve mudanças tanto na condição do palato ($P=0,004$) quanto das próteses ($P<0,001$). Com isso, puderam concluir que a LLLT é uma alternativa válida de tratamento da estomatite sob prótese, fato importante já que a doença apresente uma taxa de recorrência alta.

Em outro estudo, Maver-Biscanin et al. (86) avaliaram o efeito da LLLT no crescimento de *Candida albicans* em pacientes com estomatite protética. Neste estudo, 02 usuários de próteses totais, ambos com sinais clínicos de estomatite

(classe II de Newton), foram tratados com *laser* de baixa potência com diferentes comprimentos de onda (685 e 830 nm) por 5 dias consecutivos. Tanto a mucosa quanto a prótese foram irradiadas. O efeito da terapia com o *laser* foi avaliado utilizando o método SWAB e o número de UFCs. Os resultados mostraram uma redução no número de UFCs e da inflamação, e com isso concluiu-se que a LLLT foi eficaz no tratamento da estomatite sob prótese.

2.2.2 Terapia Fotodinâmica (PDT)

O termo “ação fotodinâmica” surgiu pela primeira vez em 1900, quando Raab constatou, acidentalmente, a morte dos microrganismos que estavam sendo cultivados em um meio de cultura contendo acridina diluída, e foram expostos à luz intensa de raios durante uma tempestade. Posteriormente, Von Tappeiner e Jesionek (87) descreveram o tratamento de tumores de pele por meio de uma combinação de eosina aplicada topicamente com exposição à luz branca. Postularam que algum produto da fluorescência, e não somente a luz, seria o responsável pela elevada toxicidade.

Sua ação baseia-se na transferência da energia do feixe de luz com um agente fotossensibilizador, endógeno ou exógeno, que sobre fotoativação gera espécies citotóxicas *in situ*. O fotossensibilizador, sobre excitação passa do estado singlete para o tripleto através de um processo de cruzamento intersistema que reage com moléculas próximas produzindo radicais livres e peróxido de hidrogênio – conhecido como mecanismo do tipo I – ou transfere sua energia para o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) produzindo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) – mecanismo do tipo II. Ambos resultam em morte celular localizada; contudo, o principal mecanismo fotodinâmico parece ser o do tipo II, gerador do oxigênio singlete, poderoso agente oxidante e altamente tóxico para as células (88). O mecanismo da destruição fúngica da PDT envolve a lise da parede e membrana celular com a indução de radicais de oxigênio, permitindo o agente fotossensibilizador entrar na célula. Na seqüência, este agente promove danos a organelas celulares, tais como mitocôndrias, induzindo à morte celular (89). A iluminação precisa da área alvo aumenta a seletividade da terapia,

uma vez que somente na área irradiada ocorre o efeito fotodinâmico (90). Além da ação imediata, essa técnica não promove injúria aos tecidos circunvizinhos, nem aumento de temperatura (90-92).

Essa técnica apresenta diversas vantagens no tratamento de infecções causadas por microrganismos patogênicos, tais como amplo espectro de ação; ausência de efeito colateral; baixo potencial mutagênico; ser uma terapia específica à célula alvo; início de sua atividade somente quando exposta à luz; e o não favorecimento da seleção de cepas resistentes (16, 93), muito comum com o uso indiscriminado de antibióticos (94). A PDT pode ser influenciada, entre outros fatores, pelo pH do meio; conteúdo de água; presença de exsudato; sangue; concentração e tempo de permanência do agente fotossensibilizador; comprimento de onda do *laser*; energia utilizada e tempo de exposição à luz *laser* (95, 96).

Wilson e Mia (31) realizaram um estudo na tentativa de determinar se a *Candida albicans* e outros tipos de *Candida* spp., responsáveis por candidoses em pacientes HIV positivos, eram suscetíveis à luz de um laser de baixa intensidade. Neste trabalho, suspensões de *Candida albicans* foram tratadas com diferentes potenciais fotossensibilizadores e expostos a dois *lasers* (GaAs e HeNe) por 120 segundos. As UFCs remanescentes foram contadas. O azul de tuldina, tionina e violeta cristal foram capazes de matar as leveduras com o uso do *laser* de HeNe (876 mJ, 66,36 J/cm²). O azul de tuldina também foi capaz de sensibilizar muitas outras espécies de *Candida* com o *laser* de HeNe. O éster de dihematoporfirina não foi eficaz nas condições propostas. O azul de metileno foi capaz de sensibilizar *C. albicans* com o *laser* de GaAs (1,32 J, 2,04 J/cm²), porém a pitalocianina dissulfonatada de alumínio não foi eficaz. A viabilidade das leveduras não foi afetada pela irradiação pelo *laser* na ausência dos corantes. Os resultados permitiram concluir que a PDT pode ser usada como uma alternativa à terapia convencional nos casos de candidoses.

Soukos et al. (91) observaram que a maioria dos microrganismos é sensível à terapia com luz vermelha depois de fotossensibilizados com azul de metileno. Esse efeito é dependente de alguns parâmetros, como: comprimento de onda, densidade de potência, densidade de energia e concentração do fotossensibilizador.

Chabrier-Roselló et al. (28), realizaram um estudo sobre a sensibilidade do tubo germinativo e biofilme de *Candida albicans* à fototoxicidade mediada pelo

photofrin®. Nesse estudo o biofilme da *Candida albicans* mostrou-se sensível, de maneira dose-dependente, à fototoxicidade mediada pelo *photofrin*®. A atividade metabólica do biofilme após a terapia fotodinâmica foi significativamente menor que a atividade de biofilmes tratados com anfotericina B pelo mesmo período. Os resultados demonstram que muitos dos mecanismos utilizados pelos microrganismos usados para subverter tanto as defesas oxidativas antimicrobianas ou as terapias antimicrobianas parecem não funcionar com a terapia fotodinâmica mediada pelo *photofrin*®. As observações feitas pelos autores promovem apoios à maiores investigações da PDT como terapia adjunta, ou possível alternativa, contra a candidíase cutânea ou mucocutânea.

Maish (16) em uma revisão sobre terapia fotodinâmica antimicrobiana concluiu que o aumento da resistência microbiana aos antibióticos fez com que houvesse uma maior procura por terapias alternativas, como a PDT.

Bevilacqua et al. (97) fizeram uma revisão bibliográfica da ação do *laser* de baixa potência associado a substâncias fotoativadoras na redução de *Candida* em meio bucal. Os autores relatam que a *Candida* spp. que estão presentes em grande quantidade em pacientes HIV positivos e pacientes submetidos a radioterapia e quimioterapia, tem se mostrado uma forte candidata ao tratamento com a PDT, pois, muitas vezes, tem mostrado resistência ao tratamento com antifúngicos. Os autores observaram que a terapia fotodinâmica pode ser eficaz na redução do número de *Candida*, tornando-se uma alternativa aos demais tratamentos utilizados, sem prejuízo aos tecidos sadios.

Ainda sobre terapia fotodinâmica, Donnelly et al. (24), concluíram que tanto dermatomicetes quanto leveduras podem ser efetivamente mortos por ação fotodinâmica de fenotiazinas (azul de metileno e azul de tuluidina). E, também se deve levar em consideração, que a maior afinidade dos corantes pelos fungos em relação às células humanas já foi demonstrada, não havendo indícios de resistência fúngica ao tratamento e que não há associação deste com efeitos mutagênicos para os fungos e células humanas. Por fim, a terapia fotodinâmica tem o potencial de se tornar útil no tratamento de infecções fúngicas em regiões acessíveis do corpo, como por exemplo a estomatite sob prótese.

Mima et al. (98) avaliaram a suscetibilidade da *Candida albicans* à terapia fotodinâmica em modelo animal em candidíase bucal. Após os camundongos serem

inoculados com cepas de *C. albicans*, , foi administrado *photogen*® , um corante derivado da hematoporfirina, nas concentrações de 400, 500 ou 1000 mg/L seguidos, porém, da irradiação com LED (305 J/cm²) com comprimentos de onda de 455 (azul) e 630 (vermelho) nm. Após o tratamento, amostras foram coletadas e o número de UFCs foram contadas. A PDT resultou em uma significativa redução no número da *C. albicans* coletadas da língua comparado ao dos camundongos do grupo controle. Não houve diferença entre as concentrações do *photogen*® e do comprimento de onda do LED utilizado e a avaliação histológica da língua revelou que a PDT não causou efeitos adversos significante à mucosa local. Com isso, os autores concluíram que a PDT promoveu redução significativa da viabilidade do biofilme da *C. albicans* sem prejudicar os tecidos da língua.

2.2.2.1 azul de metileno

Uma das linhas de pesquisas fundamentais para a evolução da terapia fotodinâmica é o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. Buscam-se melhorias na ação, menor custo, melhor conhecimento sobre os mecanismos de ação e da relação entre a estrutura e a atividade (99, 100), o que favorecerá uma maior popularização da PDT.

Um composto, para atuar como um bom fotossensibilizante é importante que apresente as seguintes características: banda de absorção e eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio; baixa citotoxicidade no escuro; facilidade de obtenção em escala industrial, com boa reprodutividade e custos reduzidos; permeabilidade em tecidos e seletividade (99, 100).

O azul de metileno é um composto aromático heterocíclico, do grupo dos corantes fenotiazínicos, sólido verde escuro, com fórmula molecular C₁₆H₁₈CIN₃S e massa molar 319,85 g/mol. Pode ser utilizado em alta concentração (1%) sem causar toxidade em humanos (15, 90, 101). Os corantes fenotiazínicos atuam de forma eficiente em bactérias, sendo mais efetivos contra as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas (23, 33, 102).

Como corante bacteriológico e indicador, apresenta inúmeras aplicações nos mais variados campos das ciências biomédicas, biológica e química. Efetivo na PDT, devido ao seu comprimento de onda de absorção máxima igual a 660nm (vermelho visível), possui boa penetração no tecido alvo, com mínima toxicidade e ação microbiana (23, 33).

O azul de metileno, por ser um fotossensibilizador catiônico, promove uma ligação eletrostática na superfície externa da célula, o que causa um dano inicial à sua parede e induz uma maior atividade fotodinâmica contra as bactérias (15, 90, 92, 93, 101, 102). É facilmente lavável, não mancha os tecidos orais nem componentes protéticos (39).

Sua ação fotodinâmica ocorre por meio da geração, principalmente, do oxigênio singlete, uma espécie excitada altamente reativa capaz de oxidar moléculas orgânicas com alta densidade eletrônica, como por exemplo, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Sua formação em meio biológico está associada a processos fisiológicos e patológicos. Como exemplo pode-se citar o seu envolvimento nos mecanismos de defesa contra microrganismos (90, 101).

Devido à ressonância com os *lasers* de emissão na região vermelha do espectro eletromagnético, o azul de metileno é um dos principais fotossensibilizadores utilizados para PDT, com ótimos resultados na redução bacteriana. Por causa da sua já conhecida baixa toxicidade, do seu uso e aceitação no campo médico e do seu potencial antimicrobiano fotoativo, este corante se faz ideal para a avaliação do seu efeito em descontaminação fúngica (23).

Usacheva et al. (33) em 2001, compararam a eficiência fotobactericida do azul de metileno e do azul de tuluidina contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Neste trabalho eles concluíram que o azul de tuluidina foi mais eficaz que o azul de metileno na morte de bactérias tanto no escuro quanto sobre efeito da luz.

Teichert et al. (23), avaliaram a eficácia do tratamento da candidíase oral através da PDT mediada pelo azul de metileno em modelo animal imunodeficiente, simulando o que acontece em humanos. Após ser administrado azul de metileno em diferentes concentrações: 250, 275, 300, 350, 400, 450 ou 500 µg/mL, os camundongos foram irradiados com *laser* de diodo com comprimento de onda de 664 nm. Os resultados indicaram um efeito dose-dependente do azul de metileno,

sendo mais eficaz nas concentrações de 450 e 500 µg/mL, erradicando totalmente as cepas *Candida albicans* da cavidade oral dos camundongos. Estes resultados sugerem que a terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno pode ser potencialmente usada no tratamento da candidíase bucal em pacientes imunodeficientes.

Munin et al. (42) estudaram, a formação do tubo germinativo por *C. albicans* depois da quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica e concluíram que os resultados obtidos na pesquisa sugerem a possibilidade do azul de metileno, combinado com uma fonte de luz de comprimento de onda específico, pode ser utilizado como um promissor agente antifúngico.

Giroldo et al. (29) realizaram um estudo da quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica com azul de metileno no aumento da permeabilidade da membrana em *Candida albicans in vitro*. Neste trabalho, cepas de *Candida albicans* foram atacadas com o azul de metileno em concentrações que variavam de 0,01 mg/mL a 0,5 mg/mL e irradiadas com um *laser* de diodo com comprimento de onda de 684 nm, 35mW de potência e área do *spot* de 0,38cm², resultando numa dose de 28 J/cm². Os resultados mostraram que a combinação do azul de metileno e a ação do *laser* promoveram um decréscimo no crescimento da *Candida* e que a inibição foi mais pronunciada na presença do azul de metileno na concentração de 0,05 mg/mL na densidade de energia de 28 J/cm². O decréscimo no crescimento da *Candida* foi associado ao aumento da permeabilidade da membrana. Com isso, os autores sugerem que a quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica mediada pelo azul de metileno está relacionada com o dano na membrana plasmática das células.

Souza et al. (103) compararam a eficiência fungicida fotodinâmica do azul de metileno, azul de tuluidina, verde malaquita e do *laser* de baixa potência isoladamente. Neste trabalho, o número de unidades formadoras de colônias foi reduzido, porém variou de acordo com a densidade de energia empregada. Com isso, concluíram que o azul de tuluidina, o azul de metileno e o verde malaquita foram fotossensibilizadores eficientes na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra *C. albicans*, assim como o laser de baixa potência isoladamente.

Martins et al. (104) avaliaram o efeitos da terapia fotodinâmica na patogenicidade da *Candida albicans*. Neste estudo, 56 camundongos, previamente inoculados com cepas de *C. albicans* e que desenvolveram a candidose, receberam

diferentes tipos de tratamento: *laser* e fotossensibilizador azul de metileno (L+P+); somente o *laser* (L+P-); somente o fotossensibilizador (L-P+) e somente solução fisiológica (L-P+). Amostras da cavidade oral foram coletadas para a contagem das unidades formadoras de colônia por mL. Também, as colônias foram isoladas para a avaliação da atividade das proteinase e da fosfolipases. Posteriormente, os camundongos foram sacrificados para análise microscópica do dorso da língua. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), e pelos testes Kruskal-Wallis e Bonferroni. O número de *C. albicans* obtidos da cavidade oral foi similar entre os grupos ($P = 0,106$). O grupo L+P+ apresentou menos lesões de candidose do que o grupo L-P- ($P = 0,001$). O grupo L+P+ apresentou menor atividade da proteinase comparado aos outros grupos, com diferença significativa entre os grupos L+P+ e o L-P+ ($P = 0,018$). Com os resultados obtidos, os autores puderam concluir que a terapia fotodinâmica reduziu o número de lesões microscópicas da candidose e a atividade da proteinase da *C. albicans*, sem promover danos aos tecidos normais.

3 PROPOSIÇÃO

O controle de microrganismos patogênicos da cavidade oral é fundamental para prevenir o risco de infecções locais e sistêmicas. A prevenção e tratamentos alternativos para estomatite sob prótese e/ou candidíase, como a PDT, tornam-se necessários. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase bucal em usuários de próteses totais. O tratamento convencional da candidíase bucal consiste na administração de medicamentos tópicos antifúngicos, como a nistatina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A primeira fase da pesquisa foi realizada na Clínica de Graduação da Disciplina de Prótese Total do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Foram realizados exames clínicos nos pacientes voluntários, e os seus dados foram registrados na ficha do paciente (Apêndice A). A terapia fotodinâmica foi realizada no Laboratório de *Laser* em Odontologia (LELO) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. A análise microbiológica foi desenvolvida no Laboratório de Leveduras Patogênicas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB - USP) e sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Claudete Rodrigues Paula e do Prof. Dr. Eriques Gonçalves da Silva.

4.2 Pacientes

De acordo com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob protocolo 98/2009 (Anexo A), foram selecionados 133 pacientes voluntários, reabilitados com próteses totais que apresentavam estomatite sob prótese, avaliados através de exame clínico, independente de faixa etária, gênero, nível cultural e social ou econômico. Destes, foi confirmada a presença de leveduras do gênero *Candida*, segundo análise microbiológica, em 24 pacientes, que após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), foram selecionados para o estudo. Durante o desenvolvimento do trabalho, 02 pacientes foram desligados da pesquisa, 01 por não seguir corretamente às recomendações propostas e outro por abandono, gerando no total um universo de 22 pacientes participantes.

Os sujeitos da pesquisa selecionados foram divididos pelo método de amostragem aleatória simples, por meio de sorteio, em dois grupos: controle e experimental, seguiram o tratamento proposto (nistatina ou PDT), e todos receberam orientação de higiene, sendo instruídos a escovarem as próteses com água e sabão neutro após as refeições. Foram excluídos da pesquisa os sujeitos que não se encaixavam nos critérios de inclusão anteriormente citados, pacientes que apresentaram histórico de neoplasias de cabeça e pescoço, ou que apresentavam estomatite do tipo III da classificação de Newton.

4.3 Coleta inicial das amostras

Após a seleção dos pacientes voluntários e antes do início dos tratamentos (t0), foram coletadas amostras do palato para se isolar e quantificar em UFCs de *Candida* spp.

4.4 Grupo controle

Os 10 pacientes deste grupo receberam o tratamento convencional com nistatina diariamente por via oral de seis em seis horas, 5 mL [100.000 UI] durante 14 dias, realizando bochecho da solução e mantendo-a por 05 minutos na cavidade oral antes de ser deglutida (105). As amostras foram coletadas em três momentos: após sete dias de utilização da nistatina (t1), após quatorze dias de utilização da nistatina (t2) e um mês após a terapia (t3).

4.5 Grupo experimental

Os 12 pacientes deste grupo foram encaminhados ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia - LELO/FOUSP, para receber tratamento por

meio da terapia fotodinâmica (PDT). Os pacientes realizaram bochecho com azul de metileno a 0,005% (Chimiolux, Hipopharma, Ribeirão das Neves) (figura 4.1) por vinte minutos. Após esse tempo toda a região foi irradiada, pela técnica pontual em contato, com o *laser* de baixa potência (Twin Flex Evolution – MM Optics Ltda., São Carlos, Brasil), com comprimento de onda de 660nm, 120J/cm² de densidade de energia, 40mW de potência, 2min por ponto (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4). Os números de pontos variaram de acordo com a extensão da região contaminada, havendo um espaçamento entre os pontos de, aproximadamente, 1 cm. A PDT foi repetida após 1 semana. Previamente à irradiação, a potência foi aferida com o medidor de potência - Power Meter 841-PE (*Newport Corporation* – USA). Todas as pessoas presentes no consultório utilizaram óculos de proteção específicos durante a utilização do *laser* (fornecido pelo fabricante). As amostras foram coletadas em quatro momentos: inicial (t0), após a aplicação da 1ª PDT (t4), após a 2ª PDT (na semana seguinte – t5) e um mês após a terapia (t6).

Figura 4.1 - Corante Chimiolux, solução de azul de metileno a 0,005%.

Figura 4.2 - Aparelho de *laser* de baixa potência Twin Flex (MM Optics®, São Carlos, Brasil)

Figura 4.3 Destaque do protocolo utilizado

Figura 4.4 - Irradiação do palato pela técnica pontual com *laser* de baixa potência

4.6 Procedimento da coleta das amostras

Antes da coleta das amostras os pacientes foram orientados a não comer, não beber (exceto água) e a não fumar, no período de 1 hora antes da coleta. A amostra foi coletada pela técnica SWAB, através de um *citobrush* (Kolplast ci Ltda., Itupeva, Brasil), que foi esfregado na região reabilitada por prótese (palato) e

em seguida colocado em tubo com 10 mL de solução salina estéril (figura 4.5) e armazenado em geladeira por até 24 horas.

Figura 4.5 - Acondicionamento da coleta com o *citobrush* em 10 mL solução salina estéril

4.7 Avaliação

Foram avaliados os pacientes do grupo de controle e experimental e os resultados obtidos entre eles comparados. A avaliação foi realizada através de análises microbiológicas, quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) das espécies de *Candida* isoladas do palato dos pacientes.

4.7.1 Análise microbiológica

As células da levedura foram homogeneizadas através de agitação em vortex. Foram feitas 10 diluições seriadas do homogeneizado, semeadas, em triplicata, 0.1 mL da solução em ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, MI) com cloranfenicol (figura 4.6) e incubadas a 35°C por um período de 24 a 48 horas e as UFCs foram contadas.

Figura 4.6 - Esquema da diluição seriada do homogeneizado.

4.8 Identificação das amostras

As amostras foram semeadas em meio de cultura cromogênico Chromagar® *Candida* (Difco, EUA) para observação da pureza das colônias e avaliação das espécies pertencentes ao gênero *Candida* (figura 7). Posteriormente, as amostras foram identificadas, através das provas: tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá e fermentação e assimilação de carboidratos (106).

Levedura	Coloração típica da colônia
<i>Candida albicans</i>	Verde
<i>Candida krusei</i>	Rosa claro com bordas cotonosas
<i>Candida tropicalis</i>	Azul-acinzentado
<i>Candida glabrata</i>	Rosa, roxo
<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa claro
<i>Candida spp</i>	Branco para rosa

Quadro 4.1 - Coloração apresentada por diferentes espécies do gênero *Candida* semeadas em meio cromogênico Chromagar® *Candida*

Figura 4.7 - Análise das espécies de *Candida* em meio de cultura cromogênico Chromagar® *Candida*; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente. (Em <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kiessling-cornelia-2005-04-28/HTML/chapter3.html>)

4.8.1 Formação de tubo germinativo

Uma cultura pura de 24 horas da levedura foi inoculada em um tubo contendo 0.5 mL de soro fetal bovino. O tubo foi incubado a 37°C por um período mínimo de 2 horas e máximo de 3h. No final deste período uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e a formação ou não de tubo germinativo foi observada através de microscopia de luz (figura 4.8).

Figura 4.8 - Microscopia de luz da formação de tubo germinativo de *Candida albicans* após 48 horas de incubação

4.8.2 Microcultivo em ágar fubá

O ágar fubá contendo 1% de Tween 80 (3.0 mL), após ser previamente fundido em banho maria e mantido em temperatura próxima a 50°C; foi colocado sobre uma lâmina de vidro de modo a formar um filme. Com auxílio da alça em “L”, duas estrias paralelas da amostra de estudo foram semeadas sobre o filme produzido; e sobre a semeadura uma lamínula estéril foi colocada, a incubação foi realizada a temperatura ambiente (27 a 30°C) por 72 horas e a leitura realizada a cada 24 horas (figura 4.9, 4.10 e 4.11).

Figura 9 - Microscopia de luz de *Candida albicans* em microcultivo de ágar fubá após 72 horas de desenvolvimento

Figura 10 - Microscopia de luz de *Candida tropicalis* em microcultivo de ágar fubá após 72 horas de desenvolvimento

Figura 11 - Microscopia de luz de *Candida glabrata* em microcultivo de ágar fubá após 72 horas de desenvolvimento

4.8.3 Fermentação de carboidratos (Zimograma)

Para verificação da fermentação de carboidratos pelas espécies de *Candida*, foi utilizado o meio de cultura caldo vermelho de fenol adicionado de 1% dos seguintes açúcares: glicose, maltose, sacarose e lactose. O meio de cultura com o respectivo açúcar foi distribuído em tubos de ensaio contendo tubos de Duhran invertidos em seu interior (figura 4.12) . Os tubos foram inoculados com culturas puras de 24h das amostras a serem identificadas e incubados a 37°C por até 7 dias. Após este período verificou-se a fermentação dos açúcares através da produção de ácido e formação de gás.

Figura 4.12 - Imagem da formação de gás no tubo de Duhran invertido após a fermentação de açúcares

4.8.4 Assimilação de carboidratos e de nitrato (Auxanograma)

Para esta prova, um meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) - Base de Nitrogênio para Levedura- (Difco, EUA), destituído de fontes de carbono, foi fundido e ao atingir a temperatura de 45°C foi vertido sobre 4 mL da suspensão de *Candida* preparada a partir de crescimento de 24h da levedura e com concentração correspondente ao tubo 5 da escala de McFarland, em placa de Petri grande. Após homogeneização em movimentos em forma de 8 (oito), o meio foi deixado para solidificação. A seguir, pequenas porções de glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose, rafinose, inositol, melibiose, ramnose, xilose, trealose, dulcitol e celobiose, e KNO₃ e PEP, foram colocados sobre a superfície do ágar. Após incubação de 25°C a 30 °C por 48h, foi observada a assimilação do açúcar através do crescimento da levedura ao redor desses açúcares (figuras 4.13, 4.14 e 4.15).

Figura 4.13 - Teste para assimilação de nitrato (negativo). Peptona como controle

Figuras 14 e 15 - Teste para assimilação de carboidratos

4.9 Identificação presuntiva de *Candida dubliniensis*

Existe um alto grau de similaridade fenotípica e genotípica entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, com isso testes complementares se fazem necessários para a correta identificação dessas espécies. Todas as amostras identificadas como *C. albicans* foram testadas novamente por meio da técnica do meio Sabouraud Caldo Hipertônico, proposta por Alves et al. (107). As amostras foram cultivadas em meio Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (Difco, EUA) por 24 horas. Foram preparados inóculos na escala 0,5 de MacFarland, os quais foram inoculados em meio Sabouraud Caldo acrescido com 6,5% de cloreto de sódio e foram incubados por 96 horas. Tubos separados contendo o mesmo inóculo, porém sem a adição do cloreto de sódio, foram incubados sob as mesmas condições para garantir que todos os organismos testados eram viáveis. As culturas foram analisadas visualmente para a detecção de crescimento fúngico num intervalo de 24 horas. Neste meio a *C. albicans* consegue se desenvolver enquanto que a *C. dubliniensis* não consegue.

4.10 Análise Estatística

Os dados obtidos em relação a UFCs (Unidade Formadora de Colônia) foram transformados logaritmicamente ($\log_{10}$) para aproximar de uma distribuição normal antes da análise estatística, e analisados através do teste de Mann-Whitney realizada pelo programa estatístico computadorizado GraphPad Prism 4 (GraphPad Prism™, Version 4.0, Graph Pad Software Incorporated). As diferenças foram consideradas significativas para $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes selecionados

Dos 133 (cento e trinta e três) pacientes voluntários avaliados, somente 18% (24 - vinte e quatro) foram incluídos no estudo.

5.2 Identificação das leveduras

Através dos testes de Identificação dos isolados verificamos que *Candida albicans* foi prevalente em 13 (treze) pacientes, 59,1%, seguido de *Candida guilliermondii* em 4 (quarto) pacientes, 18,19%, *Candida tropicalis* 3 (três) pacientes, 13,7%, *Candida parapsilosis* 1 (um) paciente 4,55% e *Candida glabrata* em 1 (um) paciente 4,55%, (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Distribuição das espécies de *Candida* spp isoladas dos pacientes

Espécie	Infecção	
	No.	%
<i>Candida albicans</i>	13	59,1
<i>Candida guilliermondii</i>	4	18,19
<i>Candida tropicalis</i>	3	13,7
<i>Candida glabrata</i>	1	4,55
<i>Candida parapsilosis</i>	1	4,55

Figura 5.1 - Distribuição das amostras isoladas dos pacientes

5.3 Diferenciação de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*

Após o teste de diferenciação por meio da técnica do meio Sabouraud Caldo Hipertônico, das 13 amostras previamente identificadas como *C. albicans*, 03 amostras foram reclassificadas, presuntivamente, como *C. dubliniensis*.

5.4 Tratamentos

5.4.1 PDT

Não houve isolamento de *Candida* em 54% dos pacientes tratados com PDT por 7 dias, 73% tratados por 14 dias e 27% tratados por 30 dias. Nos grupos em que houve isolamento da levedura, todos os tratamentos com a PDT reduziram significativamente ($p < 0.05$) a carga da levedura na mucosa dos pacientes em todos os tempos de tratamento, quando comparados à fase pré tratamento. Houve uma redução significativa ($p < 0.05$) no grupo tratado por 7 dias, quando comparado ao grupo tratado após os 30 dias (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 - Análise do isolamento de *Candida* de pacientes usuários de próteses totais, não tratados (inicial), tratados com a terapia fotodinâmica (PDT) por 7 e 14 dias e 30 dias após o tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significantes para $p < 0.05$. Estatística realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney

5.4.2 Nistatina

Não houve isolamento de *Candida* em 50% dos pacientes tratados com nistatina por 7 dias, 40% tratados por 14 dias e em 20% por 30 dias. Nos pacientes em que houve isolamento da levedura a redução no isolamento foi significativamente maior ($p < 0.05$) em todos os tempos de tratamentos quando comparado ao grupo de pacientes na fase pré tratamento, não houve diferença significativa ($p < 0.05$) no isolamento da levedura em nenhum tempo do tratamento (Gráfico 5.2). A redução no isolamento de *Candida* foi significativamente maior ($p < 0.05$) no grupo tratado com a terapia fotodinâmica (PDT) por 7 e 14 dias quando comparado ao grupo tratado com nistatina pelo mesmo período (Gráfico 5.3).

Gráfico 5.2 - Análise do isolamento de *Candida* de pacientes usuários de próteses totais, não tratados (inicial), tratados com nistatina por 7 e 14 dias e 30 dias após o tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significantes para $p < 0.05$. Estatística realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney

Gráfico 5.3 - Análise comparativa do isolamento de *Candida* de pacientes usuários de próteses totais, não tratados (inicial), tratados com a terapia fotodinâmica (PDT) e com nistatina por 7 e 14 dias e 30 dias após o tratamento. Estatística realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney. $p < 0.05$ versus nistatina

Tabela 5.2 - Médias e desvio padrão das UFCs em $\log_{10}$ para os grupos experimentais

UFC- $\log_{10}$ - mucosa (média e desvio padrão)				
	inicial	7 dias	14 dias	30 dias
PDT	4,1 $\pm$ 0,9	1,65 $\pm$ 1	1,3 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 1,15
Nistatina	3,6 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 1,35	2,35 $\pm$ 1,1	2,45 $\pm$ 0,8

6 DISCUSSÃO

Espécies de *Candida*, que compreendem entre 25% e 50% da microbiota da cavidade oral de indivíduos saudáveis, são uma das principais causas da formação de biofilme em catéteres e próteses dentárias, e compreendem 80% dos microrganismos presentes na mucosa oral em usuários de prótese total (61, 108, 109).

Em relação ao resultado da distribuição das espécies do gênero *Candida*, este apresentou-se semelhante aos dados encontrados tanto por autores que não realizaram em seus trabalhos, testes para a diferenciação da *C. dubliniensis* como Dorocka-Bobkowska (*C. albicans* 59,2%, *C. glabrata* 20%, *C. tropicalis* 12,5% e *C. parapsilosis* 8,3) quanto aos encontrados em trabalhos onde houve essa diferenciação, como Zomorodian (61) (*C. albicans* 41,5%, *C. glabrata* 18,4%, *C. tropicalis* 12,9% e *C. dubliniensis* 10,9%). Porém os resultados foram diferentes aos dos encontrados por Marcos-Arias (110), onde o índice em pacientes que apresentavam estomatite sob prótese mostrou-se ser de 73,4% para *C. albicans*, de 8,9% para *C. glabrata* e *C. tropicalis* e de 1,25% para *C. famata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*.

Atualmente, buscam-se meios de descontaminação alternativos e a PDT desponta como uma das terapias de destaque na literatura com resultados animadores (23, 29, 31, 98, 104). Porém, ainda não existe um consenso sobre os parâmetros utilizados, seja para o *laser*, como para o corante.

Na realização da terapia fotodinâmica é necessário ocorrer uma interação entre a luz e o fotossensibilizador, o qual é capaz de transferir essa energia para outras moléculas. Esse processo resulta na liberação de espécies energéticas com tempos de vida curtos, que interagem com os sistemas biológicos para causar morte celular ou alterações teciduais (11, 12). A ação desta terapia é restrita à região onde a substância fotossensibilizadora ficou concentrada. Esse fenômeno tem por característica ser muito seletivo (90, 92). A excitação do fotossensibilizador depende do comprimento de onda no qual a luz é absorvida por um determinado composto (95). Geralmente, a fonte de luz mais utilizada são os *lasers*, porém mais recentemente os LEDs vêm sendo utilizados.

Neste estudo foi utilizado o *laser* de diodo vermelho com comprimento de onda de 660nm e o fotossensibilizador de escolha foi o azul de metileno. A escolha do Chimiolux norteou-se por este ser, até o momento, o único corante fotossensibilizador, à base de azul de metileno, com possibilidade de uso em pacientes com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (no. 80466460001).

No grupo experimental, houve redução significativa da carga de levedura na mucosa dos pacientes, sendo essa significativa para a PDT1, porém não sendo estatisticamente significativa da PDT1 para a PDT2. O comportamento da PDT neste grupo apresentou-se de forma fungicida. Estes resultados corroboram com os encontrados por Teichert (23), no qual a terapia fotodinâmica mostrou-se eficaz na erradicação de *Candida albicans* imediatamente após tratamento de candidose induzida em camundongos imunodeprimidos. Após os 30 dias do tratamento realizado, houve um aumento da carga de levedura isoladas dos pacientes. Contudo, quando comparado aos resultados iniciais, os resultados após 30 dias apresentaram-se significativamente menor.

Um ponto de extrema importância, relacionado à PDT, se deve ao fato de ser um procedimento seguro para o paciente, por atuar sobre as leveduras sem prejudicar ou reduzir a viabilidade celular do hospedeiro (111).

Vale lembrar que a maior parte dos pacientes deste grupo relatou acentuada melhora dos sintomas da estomatite, como ardência e incomodo, já no dia seguinte à irradiação. Uma outra vantagem observada em relação à terapia fotodinâmica é que esta independe da ação do paciente quanto à aplicação de medicamentos, o que muitas vezes pode retardar o tratamento tendo em vista as dificuldades dos pacientes idosos em seguir as orientações prescritas.

A terapia fotodinâmica mostrou-se uma ferramenta viável no tratamento da estomatite sob prótese nas condições aplicadas a este estudo, podendo ser utilizada principalmente em pacientes idosos ou em outros pacientes que apresentem maiores comprometimento sistêmicos, como no caso dos pacientes hospitalizados, pacientes transplantados, diabéticos ou com AIDS.

No caso dos pacientes com AIDS, o tratamento da candidíase se torna muito mais difícil. A nistatina é ineficiente, o fluconazol, o cetoconazol e o itraconazol promovem maiores intervalos sem a doença, porém, estão associados a diversas

interações medicamentosas, reações adversas e têm aumentado a prevalência de candidose resistente às drogas (112). As interações medicamentosas mais importantes nos pacientes portadores do vírus HIV são dos antifúngicos com os anti-retrovirais, medicamentos estes imprescindíveis ao tratamento para o vírus. Os antifúngicos diminuem a eficácia de alguns destes medicamentos podendo haver piora no estado de saúde geral do paciente (113).

No grupo controle, a carga de levedura isolada da mucosa dos pacientes reduziu de forma estatisticamente significativa após 07 dias de tratamento, porém não houve redução significativa tanto para os resultados encontrados após 14 dias de tratamento quanto para os encontrados após os 30 dias. Diferentemente do grupo experimental, a ação do medicamento deu-se de forma fungistática.

Deve-se ressaltar que a maioria dos pacientes deste grupo já havia feito uso desta medicação por várias vezes e relataram como reações adversas: gosto desagradável do medicamento, diarreia e dores abdominais, sendo, muitas vezes, o motivo da queixa e desistência do tratamento por parte de alguns pacientes.

A deficiência na higiene da prótese tem papel direto na reincidência da *Candida*, em pacientes edêntulos portadores de próteses totais, apesar da enfática orientação quanto à assepsia destas e a aplicação de agentes desinfetantes (profilaxia) (114). Comprovadamente, a maioria dos microrganismos adere às superfícies acrílicas demonstrando uma grande resistência mecânica principalmente em próteses totais mal adaptadas (115).

De fato, para ambos os grupos, houve uma tendência de um aumento na carga de levedura na mucosa dos pacientes após os 30 dias do tratamento, porém em menor grau quando comparado ao período antes dos tratamentos, principalmente no grupo experimental. A manutenção da higiene das próteses é de grande importância para a saúde de seus usuários, pois com o descuido, em muitos casos, as infecções por *Candida* spp tendem a reaparecer em poucas semanas por isso, os pacientes de prótese devem ser constantemente motivados quanto a higienização de suas próteses a fim de evitar esse problema. (116)

Segundo Chandra et al. (52), tem sido notado que os sintomas da estomatite sob prótese frequentemente retornam logo após o tratamento, sugerindo que espécies de *Candida* encontradas em biofilmes são mais resistentes à ação de drogas antifúngicas. O modelo de estudo desses autores mostrou que o crescimento

de *C. albicans* em próteses exibiu maior grau de resistência a anfotericina B, nistatina, fluconazol e clorexidina. Contudo, não existem relatos no desenvolvimento de resistência por parte desses microrganismos à terapia fotodinâmica.

Para minimizar a prevalência de estomatite sob prótese, o cirurgião dentista deve instruir o paciente em remover as próteses totais de 06 a 08 horas por dia (117, 118), e a instalação destas não deve ser considerada o estágio final do tratamento, mas o início de um longo relacionamento entre o cirurgião dentista e o paciente, com o objetivo da manutenção da saúde dos tecidos orais (119), sendo de extrema importância que estes pacientes façam retornos regularmente para a avaliação de suas próteses e manutenção da saúde oral.

Apesar de existirem trabalhos na literatura, tanto *in vitro* quanto em modelos animais, com o objetivo de promover a descontaminação fúngica, em humanos ainda são escassos. Portanto faz-se necessário pesquisas em busca de um maior número de resultados, de definição de parâmetros e de protocolos mais efetivos.

7 CONCLUSÃO

Por meio da metodologia utilizada e dentro das condições clínicas desde trabalho, é possível concluir que o tratamento com terapia fotodinâmica foi uma alternativa eficaz no tratamento da estomatite sob prótese.

REFERÊNCIAS¹

1. McIntyre GT. Oral candidosis. Dent Update. 2001 Apr;28(3):132-9.
2. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998 Feb;43(1):45-50.
3. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):398-429.
4. Sherman RG, Prusinski L, Ravenel MC, Joralmon RA. Oral candidosis. Quintessence Int. 2002 Jul-Aug;33(7):521-32.
5. Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. Clin Dermatol. 2000 Sep-Oct;18(5):553-62.
6. Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. Oral Dis. 2000 Mar;6(2):85-91.
7. Budtz-Jorgensen E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. Acta Odontol Scand. 1990 Feb;48(1):37-43.
8. Neville BW. Doenças fúngicas e protozoários. Patologia Oral & Maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 18.
9. Emami E, de Grandmont P, Rompre PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. J Dent Res. 2008 May;87(5):440-4.
10. Burnett G. Microbiologia oral & doenças infecciosas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1978.
11. Marotti J, Aranha ACC, Eduardo CP, Ribeiro, MS. Tratamento do herpes labial

¹ De acordo com estilo Vancouver

- pela terapia fotodinâmica. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2008;62:5.
12. Zanin ICJ, Brugnera-Júnior A, Gonçalves RB. Aplicação da terapia fotodinâmica na descontaminação bacteriana. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2002;56(supl):5.
 13. Marotti J, Bello-Silva MS, Eduardo CP. Laser em alta e baixa intensidade no tratamento do herpes labial. São Paulo: Artes Médicas; 2008.
 14. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol*. 1997 Jun;65(6):1026-31.
 15. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005 May 13;79(2):159-70.
 16. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*. 2007 Jun;22(2):83-91.
 17. Bockstahler LE, Coohill TP, Hellman KB, Lytle CD, Roberts JE. Photodynamic therapy for herpes simplex: a critical review. *Pharmacol Ther*. 1979;4(2):473-99.
 18. Hiatt CW. Photodynamic inactivation of viruses. *Trans N Y Acad Sci*. 1960 Nov; 23:66-78.
 19. Hiatt CW, Kaufman E, Helprin JJ, Baron S. Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue. *J Immunol*. 1960 May;84:480-4.
 20. Khan NC, Melnick JL, Biswal N. Photodynamic treatment of herpes simplex virus during its replicative cycle. *J Virol*. 1977 Jan;21(1):16-23.
 21. Schnipper LE, Lewin AA, Swartz M, Crumpacker CS. Mechanisms of photodynamic inactivation of herpes simplex viruses: comparison between methylene blue, light plus electricity, and hematoporphyrin plus light. *J Clin Invest*. 1980 Feb;65(2):432-8.
 22. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):406-11.

23. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb;93(2):155-60.
24. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008;163(1):1-12.
25. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jan 3;86(1):59-69.
26. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2000-6.
27. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B.* 2005 Jan 14;78(1):1-6.
28. Chabrier-Rosello Y, Foster TH, Perez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Oct;49(10):4288-95.
29. Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 2009 Jan;24(1):109-12.
30. Monfrecola G, Procaccini EM, Bevilacqua M, Manco A, Calabro G, Santoianni P. In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 May;3(5):419-22.
31. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993 Sep;22(8):354-7.
32. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 24;104(17):7223-8.

33. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):165-73.
34. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol*. 2005 Aug;76(8):1275-81.
35. Yamada AM, Júnior, H.R., Ribeiro, M.S. O emprego da terapia fotodinâmica (PDT) na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. *RGO*. 2004;52:5.
36. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol*. 2004 Oct;75(10):1343-9.
37. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol*. 1992 Aug;25(2):77-81.
38. Marotti J, Aranha, A.C.C., Eduardo, C.P. A utilização do laser no tratamento do herpes labial. *RPG*. 2007;14:7.
39. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B*. 2003 Oct 15;71(1-3):87-98.
40. Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Apr;12(2):104-8.
41. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol*. 1992 Nov;37(11):883-7.
42. Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B*. 2007 Jul 27;88(1):16-20.
43. Sakima SM, Ego A. C., Bagnato V.P. Efetividade da terapia fotodinâmica na

inativação de *Candida albicans* presentes em próteses totais. 61a Jornada Odontológica e 21a Jornada Acadêmica "Profa Dra Elaine Maria Sgavioli Massucato Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. 2007 2007.

44. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V, Biscanin A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. *Lasers Surg Med*. 2004;35(4):259-62.
45. de Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B*. 2006 Apr 3;83(1):34-8.
46. Dovigo LN. Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida* spp. . Araraquara: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara; 2007.
47. Jerolimov V. [Incidence of inflammatory changes in the tissues under upper complete dentures]. *Acta Stomatol Croat*. 1983;17(3):227-31.
48. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990 Feb;48(1):61-9.
49. Cahn LR. The denture sore mouth. *Ann Dent*. 1936;3:4.
50. Martin MV, Lamb DJ. Frequency of *Candida albicans* serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. *J Clin Pathol*. 1982 Aug;35(8):888-91.
51. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *J Dent*. 1998 May;26(4):299-304.
52. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001 Mar;80(3):903-8.
53. Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil*. 2002 Mar;29(3):300-4.

54. Soysa NS, Ellepola AN. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis.* 2005 Sep;11(5):268-73.
55. Golecka M, Oldakowska-Jedynak U, Mierzwinska-Nastalska E, Adamczyk-Sosinska E. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. *Transplant Proc.* 2006 Jan-Feb;38(1):155-6.
56. Dorocka-Bobkowska B, Konopka K. Susceptibility of candida isolates from denture-related stomatitis to antifungal agents in vitro. *Int J Prosthodont.* 2007 Sep-Oct;20(5):504-6.
57. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007 Jun;34(6):448-55.
58. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct;23(5):377-83.
59. Bilhan H, Sulun T, Erkoş G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O, et al. The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clin Oral Investig.* 2009 Dec;13(4):363-8.
60. Abacı O, Haliki-Uztan A, Öztürk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacıoğlu H. Determining *Candida* spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia.* 2010 May;169(5):365-72.
61. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011 Feb;49(2):208-11.
62. Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2004.
63. Brugnera-Junior A, Villa RG, Genovese WJ. Laser na Odontologia. São Paulo: Pancast; 1991.
64. Mester E. Experimentation on the interaction between infrared laser and wound healing. *Exper Chirurg.* 1969;2.

65. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989 May;56(5): 691-704.
66. Tuner J, Hode L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Oct; 16(5):245-8.
67. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2): 339-52.
68. Labbe RF, Skogerboe KJ, Davis HA, Rettmer RL. Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers Surg Med.* 1990;10(2):201-7.
69. Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *J Photochem Photobiol B.* 1996 Jul;34(2-3):117-21.
70. Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M, Cohen N, Breitbart H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers Surg Med.* 1997;21(5):493-9.
71. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med.* 1998;22(4):212-8.
72. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Mossbacher U, Schindl L. Low intensity laser irradiation in the treatment of recalcitrant radiation ulcers in patients with breast cancer--long-term results of 3 cases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000 Feb;16(1):34-7.
73. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000 Sep;48(5):312-26.
74. Olson JE, Schimmerling W, Tobias CA. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res.* 1981 Jan 12;204(2):436-40.

75. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1991 Oct;11(1):87-91
76. Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med*. 1993;13(1):72-82.
77. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2004;34(3):260-5.
78. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med*. 2006 Jan;38(1):74-83.
79. Meneguzzo D. Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana [dissertação]. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; São Paulo; 2007.
80. Goldman L, Goldman B, Van Lieu N. Current laser dentistry. *Lasers Surg Med*. 1987;6(6):559-62.
81. Nemeth AJ. Lasers and wound healing. *Dermatol Clin*. 1993 Oct;11(4):783-9.
82. Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med*. 1995;16(4):331-42.
83. Lyons RF, Abergel RP, White RA, Dwyer RM, Castel JC, Uitto J. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann Plast Surg*. 1987 Jan;18(1):47-50.
84. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*. 1971 Oct;122(4):532-5.
85. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg*. 2002 Dec;20(6):325-33.

86. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. *Photomed Laser Surg.* 2005 Jun;23(3):328-32.
87. Jesionek H, Tappeiner H. Zur Behandlung der Hautcarcinome mit fluoreszierenden Stoffen. *Dtsch Arch Klin Med.* 1905;82:4.
88. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 1976 Jul; 36(7 PT 1):2326-9.
89. Stenstrom AG, Moan J, Brunborg G, Eklund T. Photodynamic inactivation of yeast cells sensitized by hematoporphyrin. *Photochem Photobiol.* 1980 Sep; 32(3):349-52.
90. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jul;42(1):13-28.
91. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996;18(3):253-9.
92. Prates RA, Yamada AM Jr., Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jan 3;86(1):70-6.
93. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):468-81.
94. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000.* 1996 Feb;10:45-78.
95. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J.* 1994 Apr;44(2):181-9.
96. de Almeida JM, Garcia VG, Theodoro LH. Terapia Fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. *Arq Odontol.* 2006;42(3):12.

97. Bevilacqua IM, Júnior, A.B., Nicolau, R.A. Ação do Laser de baixa potência associado a substâncias fotoativadoras na redução de cândidas em meio bucal (Revisão da Literatura). Anais do VII Encontro latino americano de pós graduação, 2007, São José dos Campos.
98. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Mar;109(3):392-401.
99. Deda DK, Uchoa AF, Carita E, Baptista MS, Toma HE, Araki K. A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment. *Int J Pharm.* 2009 Jul 6;376(1-2):76-83.
100. Pavani C, Uchoa AF, Oliveira CS, Iamamoto Y, Baptista MS. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci.* 2009 Feb;8(2):233-40.
101. Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Correa TC, Toma IN, et al. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life.* 2007 Apr-May;59(4-5):322-31.
102. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2173-8.
103. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 2010 May;25(3):385-9.
104. Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Jan;111(1):71-7.
105. Editora EPUB. DEF - Dicionário de Especialidades Farmacêuticas: EPUB; 2009.
106. Kurtzman CP. The yeasts: a taxonomic study. 4a edição ed. Amsterdam:

Elsevier Science; 1998.

107. Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 May;43(1):85-6.
108. Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*. 2003 Jun;46(5-6):187-91.
109. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007 Mar;86(3):204-15.
110. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol*. 2009 Feb;54(2):127-31.
111. Agnes RS. Terapia Fotoinâmica antimicrobiana no tratamento da candidose em pacientes portadores do vírus HIV. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
112. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia oral o maxillofacial. São Paulo: Guanabara Koogan; 2002.
113. Rachid M, Schechter M. Manual de HIV/AIDS. 8 ed. São Paulo: Revinter; 2002.
114. Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. *J Prosthet Dent*. 1999 Feb;81(2):207-14.
115. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998 Oct 24;185(8):380-4.
116. Lopes DM, legami CM, Matsubara VH, Furuyama RJ, Gil C, Nakamae AEM. Avaliação da influência do ácido acético na eficiência da higienização de próteses totais. *Rev de Odontol da Univ Cidade São Paulo*. 2009 mai-ago;21(2):5.
117. Zissis A, Yannikakis S, Harrison A. Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. *Int J Prosthodont*. 2006 Nov-Dec;19(6):621-5.

118. Peracini A, Andrade IM, Paranhos HF, Silva CH, de Souza RF. Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers. *Braz Dent J.* 2010;21(3):247-52.
119. Jeganathan S, Payne JA, Thean HP. Denture stomatitis in an elderly edentulous Asian population. *J Oral Rehabil.* 1997 Jun;24(6):468-72.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 273457
Protocolo 98/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase Oral em usuários de Próteses Totais”**, de responsabilidade do Pesquisador Danilo De Melo Lopes, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a.) Regina Tamaki.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 12 de novembro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Apêndice A – Ficha do paciente

FIXA DO PACIENTE

NOME: _____ IDADE: _____

GÊNERO ()M ()F

ETNIA: ()leucoderma ()melanoderma ()outro _____

END.: _____

TEL: _____ PROFISSÃO: _____

CONDIÇÃO SOCIO-ECONOMICA:

1. ESTUDO:

() nenhum, () fundamental incompleto, () fundamental completo, () médio incompleto, () médio completo, () superior incompleto, () superior completo.

2. QUANTAS PESSOAS MORAM NA SUA CASA: _____

3. QUANTOS CÔMODOS TÊM: _____

4. RENDA FAMILIAR MÉDIA: _____(salário mínimo)

5. ALIMENTAÇÃO:

() sopa, () batido no liquidificador, () arroz, feijão, () carne, () verdura crua,

() verdura cozida, () legumes, () frutas em geral, () frutas moles ou amassadas

EXAME CLÍNICO 1

1. CONDIÇÃO DE SAÚDE GERAL: ()boa ()hipertensão ()diabetes

()colesterol ()triglicérides ()doença cardíaca

() _____

2. FUMA: ()SIM ()NÃO

3. BEBIDA ALCÓOLICA: ()SIM ()NÃO

4. MEDICAMENTOS: _____

5. ALERGIA: () sim _____ () não.

6. PROBLEMAS INTESTINAIS: () não ()intestino preso ()diarréias freqüentes

7. LESÃO NA MUCOSA :

() leucoplasias () hiperplasia () ulceração () lesão oral pigmentada

8. LESÃO RELACIONADA À CANDIDA:

() estomatite protética () queilite angular () glossite rombóide

9. ARDÊNCIA BUCA ()sim ()não

10. SENSAÇÃO DE BOCA SECA ()sim ()não

11. MUSCULATURA:

Bucinator () rígido () normal () flácido

Língua () rígida () normal () flácida

Lábios () rígido () normal () flácido

Freios labiais () rígido () normal () flácido

Freio lingual () rígido () normal () flácido

Inserções musculares () rígido () normal () flácido

12. TIPO DE REBORDO:

() alto () normal () baixo

() reabsorvido () em lâmina () estrangulado;

13. CONSISTÊNCIA DO REBORDO:

() rígido () resiliente () flácido

14. CONDIÇÃO DENTAL:

() desdentado total sup e inferior () unimaxilar com problema periodontal

() necessita de tratamento restaurador () em bom estado.

15. TRATAMENTOS REALIZADOS

RECENTEMENTE: _____

PRÓTESE TOTAL:

UTILIZA PT? () bimaxilar () uni superior () uni inferior () não.

1. QUANTAS PRÓTESES USOU? _____

2. QUANTOS ANOS TÊM A PRÓTESE?

() 1 ano ou menos () 2 a 5 anos () 6 a 10 anos () mais de 10 anos

3. PRÓTESE TOTAL SUPERIOR:

Condição geral () íntegra () perfurada () com fratura () quebrada;

Dentes () em bom estado () faltando () quebrados () muito desgastados;

Dor () não sente () machuca pouco () machuca muito;

Adaptação () bem adaptada () sem retenção () sem estabilidade () básica;

DVO () adequada () inadequada;

Estética () boa () prejudicada mas aceita () não está satisfeito;

Fonética () boa () prejudicada mas aceita () não está satisfeito;

Mastigação () boa () prejudicada mas utiliza () não utiliza a prótese.

4. PRÓTESE TOTAL INFERIOR:

Condição geral () íntegra () perfurada () com fratura () quebrada;

Dentes () em bom estado () faltando () quebrados () muito desgastados;

Dor () não sente () machuca pouco () machuca muito;

Adaptação () bem adaptada () sem retenção () sem estabilidade () básica;

DVO () adequada () inadequada;

Estética () boa () prejudicada mas aceita () não está satisfeito;

Fonética () boa () prejudicada mas aceita () não está satisfeito;

Mastigação () boa () prejudicada mas utiliza () não utiliza a prótese.

CONDIÇÃO DE HIGIENE DA PRÓTESE INÍCIO:

() limpa () placa () muita placa () cálculo
() muito cálculo () pigmento () opaca () odor desagradável

CONDIÇÃO DE HIGIENE DA PRÓTESE APÓS PDT: () limpa () placa () muita placa
() cálculo () muito cálculo () pigmento () opaca () odor desagradável

CONDIÇÃO DE HIGIENE DA PRÓTESE APÓS UM MÊS: () limpa () placa () muita placa
() cálculo () muito cálculo () pigmento () opaca () odor desagradável

COLETA DA AMOSTRA DO PALATO PARA AVALIAÇÃO LABORATORIAL:

____/____/____ - INÍCIO
____/____/____ - APÓS 1ª PDT
____/____/____ - APÓS 2ª PDT
____/____/____ - UM MÊS APÓS PDT

ORIENTAÇÃO AO PACIENTE: não comer, não beber (exceto água) e não fumar, no período de 1 hora antes da coleta.

Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Título do estudo: Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase oral em usuários de próteses totais.

Pesquisador (es) responsável(is): Danilo de Melo Lopes, Regina Tamaki

Instituição/Departamento: FOU SP/ Departamento de Prótese Dentária

Telefone para contato: 3091-7882

Local da coleta de dados: LELO e Clínica de Reabilitação Oral do Departamento de Prótese da FOU SP

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de você se decidir a participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivo do estudo: O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase oral em usuários de próteses totais. A *Candida* é um fungo que ao ser associado com o uso de próteses pode provocar uma doença chamada estomatite protética. A terapia fotodinâmica é uma aplicação de laser de baixa potência juntamente com um corante que ajuda a identificar o fungo a ser eliminado.

Procedimentos. Sua participação nesta pesquisa consistirá em permitir que os pesquisadores colem as amostras, através de uma escovinha que será passada na região do palato, para análise laboratorial. Somente os participantes da pesquisa que tiverem o fungo (*Candida*) realizarão a terapia com laser.

Benefícios. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre a eficácia da terapia fotodinâmica no controle da *Candida*, tanto na prevenção como no tratamento da estomatite protética.

Riscos. Todos os pacientes que receberem a terapia fotodinâmica serão protegidos, durante a irradiação laser, com óculos de proteção adequado, evitando riscos de danos à retina. Com exceção aos pacientes com alergia ao azul de metileno, a terapia fotodinâmica não apresenta risco aos pacientes e nem efeitos colaterais. A Nistatina geralmente é um fármaco bem tolerado nas apresentações orais, salvo pacientes alérgicos a um dos seus componentes.

Sigilo. As informações fornecidas por você serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Todos os pacientes receberão terapia de suporte alternativa caso os resultados obtidos com as terapias não sejam satisfatórios ou apresentem algum resultado adverso.

Assinatura: _____

Nome: _____

Data: ____/____/____

Apêndice C – Ficha de Identificação

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
SEÇÃO DE MICOLOGIA
DIVISÃO DE LEVEDURAS**

Procedencia:

Registro:

Observações:

1. Exame direto:**2. Crescimento em meios usuais:**

Crescimento em meios com ácido graxo:

3. Microcultivo e tubo germinativo

PM:	MV:	BL:	CL:
AR:	TG:	Outros:	

4. Ascó e ascóporos

Positivo: Negativo:

5. Outras Provas

- Síntese amido:
- Produção melanina:
- TTC:

6. AuxanogramaKN03
PEP:

glicose:	inositol:
sacarose:	lactose:
dulcitol:	maltose:
rafinose:	celobiose:
melibiose:	trealose:
ramnose:	xilose:

7. Zimograma

glicose:
lactose:
maltose:
sacarose:

Diagnóstico