UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DENISE GUSMÃO DE OLIVEIRA

Efeito de cianoacrilatos e adesivo tissular a base de veneno de cobra na citotoxicidade sobre fibroblastos gengivais e estresse oxidativo sobre células do biofilme de *C. albicans*

BAURU
2016

DENISE GUSMÃO DE OLIVEIRA

Efeito de cianoacrilatos e adesivo tissular a base de veneno de cobra na citotoxicidade sobre fibroblastos gengivais e estresse oxidativo sobre células do biofilme de *C. albicans*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

BAURU

2016

Oliveira, Denise Gusmão de

Ol4e Efeito de cianoacrilatos e adesivo tissular a base de veneno de cobra na citotoxicidade sobre fibroblastos gengivais e estresse oxidativo sobre células do biofilme de *C. albicans*/ Denise Gusmão de Oliveira. – Bauru, 2016.

95 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: CAAE 50692515.7.0000.5417

Data: 24/11/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

*"Mas já que se há de escrever, que ao menos não se esmaquem com palavras
as entrelinhas. O melhor ainda não foi escrito. O melhor está nas
entrelinhas."*

Clarice Lispector

Dedicatória

Aos meus pais, Omara Oliveira de Gusmão e Ozenir Gomes de Oliveira e aos meus irmãos, Daniella Gusmão de Oliveira e Sergio Augusto Gusmão de Stefano.

Mãe, tua força, tua liderança e a tua sensibilidade são e sempre foram qualidades nas quais me inspiro e me espelho. Obrigada por nos mostrar através de exemplos o que é ser uma mulher forte e guerreira. Tenho em casa um modelo que sempre me deu a confiança de ser quem eu quiser ser. E, de principalmente, ser quem já sou. Te amo!

Paizão, às vezes é assustador o quanto eu tenho de ti em mim. E a cada dia que eu olho mais atentamente, mais eu percebo as semelhanças e mais eu as aprecio. Obrigada por fazer do amor uma sentimento tão basal na minha vida que em nenhum momento eu duvidei do teu apoio em qualquer que fosse o caminho que eu escolhesse trilhar. Te amo, paizão!

Dani e Serginho, vocês dois são os grandes amores da minha vida. Agradeço as risadas, as brincadeiras, as discussões profundas sobre a vida, o apoio, o amor incondicional, a compreensão pela ausência, e até mesmo a saudade. Sou muito privilegiada por ser irmã de vocês. Força dos irmãos desde sempre e para sempre.

A vocês dedico este trabalho.

Agradecimentos

À minha **maravilhosa família, tios, tias, primos e primas** que sempre torceram pela minha felicidade e sucesso.

Aos meus avós **Amazonina** (*in memorian*), **Jatyr** (*in memorian*) e **Osmar** (*in memorian*) pelas lembranças, amor e legado que vocês nos proporcionaram.

À minha querida avó **Nazaré Gusmão** que, superando às nossas expectativas, ainda abre o sorriso mais lindo ao me ver, enchendo o meu coração de luz.

Aos amigos **Sergio de Stefano** e **Susie dos Santos**. Obrigada pelo amor, presença e apoio durante todos esses anos.

Às minhas queridas amigas da graduação da UFAM **Larissa, Carol, Maira e Ju** que, apesar da distância, sempre se fazem incrivelmente presentes em minha vida e na vida da minha família.

Às queridas amigas **Rafa, Raissa, Sofia e Gi** que diariamente me presenteiam com as melhores companhias, risadas e abraços que eu poderia ter.

Aos queridos amigos **Brustinho** (*in memorian*), **Galego, Bueno, Marcelinho, Jordana, Lia, Kika e Damaris** que um dia constituíram a **minha família de Bauru** mas que, hoje seguem seus caminhos em outras terras.

Aos meus queridos **amigos do Maracatu Abayomi** que foram um lindo presente que Bauru me proporcionou.

Ao encontro de almas que experienciei com as queridas **Júlia, Manu, Daísa, Rê, Débora e Tati**.

Aos amigos do **Budismo de Nitiren Daishonin** que me acolheram e me fizeram sentir em casa desde o primeiro dia.

Agradecimentos

Aos amigos que vida e Bauru me apontaram no caminho do auto-conhecimento, principalmente nas quartas-feiras à tarde e domingos pela manhã, durante **nossas práticas de silêncio**.

Aos queridos **colegas de diversas áreas da FOB**, com quem dividi muitas alegrias, risadas, frustrações e muitas horas de CIP, envolto num sentimento de solidariedade e apoio mútuo.

Aos amigos da turma de doutorado **Aline, André, Karen, Laís, Juliana, Jozely, Vinícius, Yuri, Naila, Nanda e Fer Ferruzzi** pela companhia e experiências maravilhosas durante a nossa caminhada. Em especial aos amigos **Letícia, Aline, Vinícius, André e Yuri**. Agradeço principalmente pela amizade e por cada momento que dividimos nesses anos de aprendizado.

Aos colegas da turma de **Mestrado e “turma nova” do Doutorado** em Reabilitação Oral da FOB-USP pelo intercâmbio de conhecimentos e agradável convivência.

Aos colegas que, em algum momento, fizeram parte de nosso grupo de pesquisa **Emílio Acosta, Flora Távora, Luciana Pinto, Matheus Jacobina, Paulo Maurício Silva** pelo legado e assistência sempre que precisei.

Aos amigos **Oscar, Ana e Rodrigo** pela parceria, cumplicidade e muita ajuda em todos os momentos dessa caminhada.

À **Rafaela Alavarce** que, nesses anos de parceria, confiança e aprendizado, se tornou uma grande amiga. Sem você e sua paciência essa pesquisa não teria acontecido. Obrigada!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo por meio da pessoa da diretora **Prof. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, pela formação de uma comunidade da qual eu tenho a honra de fazer parte.

Aos funcionários do Departamento de Prótese Dentária e Clínica de Pós-Graduação, **Marcelo Giatti, Reivanildo, Cleide, Debora, Cleusa e Hebe**, pela eficiência, disponibilidade, bom humor e carinho.

Aos funcionários do CIP-1 **Marcelo e Márcia** pelo carinho e apoio em todos os momentos da minha jornada.

Aos professores do departamento de Prótese Dentária da FOB-USP, **Prof. Dr. Accácio Lins do Vale, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Estevam Bonfante, Prof. Dr. Gerson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, Prof. Dr. Paulo César Conti, Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira, Prof. Dr. Renato de Freitas, Prof^a. Dr^a. Simone Soares, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto e Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela**. Em especial a **Prof^a Karin** pela confiança e disponibilidade sempre que precisei.

Ao Professor **José Roberto Pereira Lauris**, pelo valioso auxílio nas interpretações estatísticas dos resultados desse trabalho.

À **CAPES** e à **FAPESP** (processo Nº 2014/09426-3) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, tocaram a minha vida e os meus dias. Hoje, tenho a consciência de que nenhum encontro é por caso. Gratidão pela troca!

Agradecimento Especial

Ao meu orientador **Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto** pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pela confiança e pela paciência durante estes 5 anos de jornada. Professor, o senhor é um grande líder com o qual eu tive o privilégio de conviver. Serei para sempre grata por ter tido a oportunidade de aprender com você não só sobre odontologia e ciência, mas a arte da liderança. Levarei comigo as lembranças e os ensinamentos e espero poder corresponder, com a minha trajetória profissional, à confiança em mim depositada. Muitíssimo obrigada, Mestre!

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.”

Thich Nhat Hanh

Resumo

RESUMO

A estomatite protética é uma patologia que acomete muitos usuários de prótese total. Um dos principais fatores da sua etiologia é a fácil adesão de microrganismos, como a *Candida albicans*, à resina acrílica, principalmente devido às características de superfície facilitadoras deste material. Por esta razão, estuda-se materiais que possam modificar as características de superfície da resina acrílica sem alterar as suas propriedades mecânicas. A investigação das propriedades desses materiais, como a biocompatibilidade e como eles influenciam as células de *C. albicans*, é de extrema importância para uma futura aplicação clínica. Dessa forma, a proposta desta pesquisa foi avaliar a citotoxicidade sobre fibroblastos gengivais humanos (FGH) e o estresse oxidativo causado em células de *C. albicans* por 6 produtos (etil-cianoacrilato convencional -ECAc; etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “a” -ECAga; etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “b” -ECAgb; butil-cianoacrilato - BCA; octil-cianoacrilato -OCA; selante tissular a base de veneno de cobra-VC;), que quando aplicados na superfície da resina acrílica, modificam suas características de superfície, visando diminuir a formação do biofilme de *C. albicans*. Espécimes de resina acrílica foram confeccionados e duas camadas de cada produto foram aplicadas nas superfícies. Cada espécime foi deixado em 1,066 mL de meio de cultura durante 24 horas para extração e utilização do meio condicionado para os dois ensaios. Para a investigação da citotoxicidade, os FGH foram cultivados em placas de 96 poços, meios condicionado de cada grupo foram depositados em cada poço onde permaneceram em contato por 24, 48 e 72 h. Após o processamento para o ensaio de MTT as placas foram analisadas em espectrofotômetro a 500 nm. Foram realizados quatro experimentos independentes em triplicata (n=12). Para a investigação de estresse oxidativo (ERO) causado em *C. albicans*, biofilme foi desenvolvido em placas de 96 poços durante 24 h. Então, os meios condicionados foram adicionados aos poços e a placa foi mantida em agitadora durante 1 h. Após a retirada dos meios condicionados, foi adicionado a cada poço o reagente CellRox® Deep Red e leituras foram realizadas a cada 30 min durante 3 h em fluorímetro a 640/665nm. Amostras foram coletadas e ensaio de cultura microbiológica foi executado para a realização da normalização dos valores. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata (n=9). Os resultados obtidos pelo ensaio MTT foram analisados por meio de ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste Tukey para a comparação entre grupos ($p<0,05$). Para o ensaio ROS, a análise estatística

realizada foi ANOVA a 1 critério, seguida, igualmente, por Tukey ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram certo grau de citotoxicidade quando comparados ao controle, com exceção do VC ($ECAC < ECAgb < BCA < OCA < ECAga$). O grupo ECAC em 24 e 48 h apresentou viabilidade em torno de 80%. Avaliando os tempos experimentais, a citotoxicidade demonstrou uma característica progressiva. O resultado do ERO demonstrou que todos os grupos induzem estresse oxidativo em células de *C. albicans* ($OCA < ECAC < VC < BCA < ECAgb$). Para a utilização clínica de tais produtos experimentais, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

Palavras-chave (DECS): Cianoacrilatos. Sobrevivência celular. *Candida albicans*. Estresse oxidativo. Estomatite sob prótese.

Abstract

ABSTRACT

Effect cyanoacrylate and snake venom tissue adhesive on cytotoxicity of gingival fibroblasts and oxidative stress of *C. albicans* biofilms

Denture stomatitis is a disease that affects many denture wearers. One of the main factors of its cause is the easy adhesion of microorganisms, such as *Candida albicans*, to acrylic resin, mainly due to its permissive surface characteristics. For this reason, materials that can modify surface characteristics of acrylic resin without changing its mechanical properties are being studied. The investigation of these materials' features, such as biocompatibility and how they affect *Candida albicans*, is of utmost importance for future clinical application. Thus, the purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of human gingival fibroblasts (HGF) and oxidative stress in *C. albicans* cells after contact with 6 experimental products (conventional ethyl-cyanoacrylate -ECAc; ethyl-cyanoacrylate in gel formulation "a" -ECAga; ethyl-cyanoacrylate in gel formulation "b" -ECAgb; butyl- cyanoacrylate - BCA; octyl-cyanoacrylate -OCA; tissue adhesive based on snake venom -VC) applied to the surface of the resin acrylic, modifying its surface characteristics, in order to decrease *C. albicans* biofilm formation. Acrylic resin specimens were manufactured and two layers of each product were applied to the surfaces. Each specimen was immersed in 1,066 mL of growth media for 24 hours for extraction and the resulting conditioned media were used for both tests. To investigate cytotoxicity, HGF were cultured in 96-well plates and conditioned media from each group were deposited into each well, where they remained in contact for 24, 48 and 72h. After the MTT assay processing, plates were analyzed in a spectrophotometer at 500 nm. Four independent experiments were performed in triplicate (n=12). To investigate oxidative stress (ROS), *C. albicans* biofilm was developed in 96-well plates for 24 h, conditioned media were added to the wells and the plate was allowed to stir for 1 h. Then, conditioned media were removed and CellRox® Deep Red reagent was added to each well. Readings were performed every 30 min for 3 h in fluorometer at 640/665nm. Samples were collected and microbiological culture test was executed to values normalization. Three independent experiments were performed in triplicate (n=9). Results obtained in MTT assay were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's test for comparison between

groups ($p<0.05$). for comparison between groups ($p<0.05$). For ROS results, one-way ANOVA was performed followed by Tukey test, as well ($p<0.05$). The results showed that all groups presented different degrees of cytotoxicity when compared to control group, except for VC (ECAc<ECAgb<BCA<OCA<ECAga). ECAc group at 24 and 48 h showed viability about 80%. Evaluating experimental periods, the cytotoxicity showed a progressive characteristic. ROS results showed that all groups induced oxidative stress in *C. albicans* cells (OCA<ECAC<VC<BCA<ECAgb). For clinical use of such experimental products, further studies should be conducted.

Key words (MESH): Cyanoacrylates. Cell survival. *Candida albicans*. Oxidative stress. Stomatitis, denture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Confeção dos espécimes.....	45
Figura 02 - Produtos experimentais utilizados.....	46
Figura 03 - Aplicação do produtos experimentais.....	48
Figura 04 - Viabilidade celular (em %) dos FGH após 24, 48 e 72 hs de contato.....	58
Figura 05 - Imagens de fibroblastos gengivais após 24 h de contato.....	59
Figura 06 - Imagens de fibroblastos gengivais após 48 h de contato.....	60
Figura 07 - Imagens de fibroblastos gengivais após 72 h de contato.....	61
Figura 08 - Produção de espécies reativas de oxigênio.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Grupos de acordo com o revestimento de superfície e os ensaios específicos.....	49
Tabela 02 - Valores de absorbância (nm) do ensaio MTT, de cada grupo em cada tempo de avaliação.....	57
Tabela 03 - Produção de ERO do biofilme de 24h de <i>C. albicans</i> após 1 h de contato.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ANOVA	Análise de variância
BCA	Butil-cianoacrilato
CA	Cianoacrilato
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
céls/mL	Células por mililitro
CFU/mL	Unidade Formadora de Colônias por Mililitro (<i>colony-forming unit</i>)
cm ² /mL	Centímetros quadrados por mililitro
Ctrl-	Controle negativo
Ctrl +	Controle positivo
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
ECA	Etil-cianoacrilato
ECAc	Etil-cianoacrilato convencional
ECAg	Etil-cianoacrilato em gel formulação "a"
ECAgb	Etil-cianoacrilato em gel formulação "b"
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
EP	Estomatite Protética
ERO	Espécies reativas de oxigênio
<i>et al.</i>	E outros (<i>et alii</i>)
FGH	Fibroblastos gengivais humanos
g/mL	Grama por mililitro
h	horas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (human immunodeficiency vírus)
Kg	Quilograma
Kgf	Quilograma-força
LTDA	Limitada

MCA	Metil-cianoacrilato
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
n	quantidade da amostra
nm	nanômetro
OCA	Octil-cianoacrilato
p	Nível de significância
PACA	Alil-cianoacrilato
PBS	Solução tampão fosfato-salina (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PT	Prótese Total
rfu	unidade relativa de fluorescência (<i>relative fluorescence unit</i>)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ST	Sem tratamento
VC	Adesivo tissular a base de veneno de cobra
WST	Sais de tetrazólio solúveis em água
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
YEPD	Extrato de levedura, peptone e dextrose (<i>Yeast extract peptone dextrose</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	23
1.1	C. <i>ALBICANS</i> e a ESTOMATITE PROTÉTICA.....	24
1.2	MUDANÇA DAS CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE DE PRÓTESES TOTAIS.....	26
1.2.1	Cianoacrilatos.....	28
1.2.1.1	<i>Citotoxicidade de cianoacrilatos.....</i>	<i>31</i>
1.2.2	Adesivo tissular a base de veneno de cobra.....	34
2	PROPOSIÇÃO.....	39
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	CONFEÇÃO DOS ESPÉCIMES.....	43
3.1.1	Revestimentos de superfície.....	45
3.1.1.1	<i>Aplicação dos cianoacrilatos.....</i>	<i>47</i>
3.1.1.2	<i>Aplicação dos adesivo tissular a base de veneno de cobra.....</i>	<i>47</i>
3.1.2	Meio condicionado.....	49
3.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS SELANTES DE SUPERFÍCIE SOBRE FIBROBLASTOS GENGIVAIS HUMANOS: ENSAIO COLORIMÉTRICO MTT.....	49
3.2.1	Obtenção dos fibroblastos gengivais humanos (FGH).....	49
3.2.2	Processamento dos espécimes para ensaio colorimétrico MTT.....	50
3.3	ENSAIO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	51
3.3.1	Imersão em saliva artificial.....	51
3.3.2	Preparo do inóculo.....	51
3.3.3	Formação do biofilme.....	52
3.3.4	Protocolo ERO.....	53
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53

4	RESULTADOS	57
4.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	57
4.1.1	Ensaio MTT.....	57
4.1.2	Microscópio invertido.....	58
4.2	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	62
5	DISCUSSÃO	65
5.1	VIABILIDADE CELULAR.....	65
5.2	ESTRESSE OXIDATIVO	70
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	81

1 Introdução e Síntese
Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A prótese total (PT) é o dispositivo mais utilizado no tratamento de pacientes que perderam todos os dentes, oferecendo-lhes o reestabelecimento da mastigação, nutrição, estética, além de uma melhor qualidade de vida, de forma geral. Contudo, o material mais utilizado para a confecção das PTs, o Polimetilmetacrilato (PMMA), é um material que facilita a adesão de microrganismos em sua superfície, principalmente devido às suas características físico-químicas, como rugosidade superficial, molhabilidade e energia livre de superfície.

Em decorrência disso, a população usuária de PT, que no Brasil hoje é de cerca de 28% da população adulta e idosa, apresenta uma prevalência de 15% a 70% de uma patologia multifatorial que tem como uma das suas principais causas a infecção por *Candida albicans*, a Estomatite Protética (EP) (GENDREAU; LOEWY, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2015). A falta de tratamento da EP pode levar a envolvimento sistêmicos, principalmente em pacientes imunocomprometidos como, pacientes com diabetes não controlado, HIV, deficiências nutricionais, pacientes com órgão transplantados e pacientes hospitalizados, cuja a principal causa de morte é causada pela infecção por *C. albicans* cerca de 50% (SHEPHERD, 1986; COSTA *et al.*, 2000; VIUDES *et al.*, 2002; ANDES *et al.*, 2012).

Vários são os métodos relatados para o tratamento da EP, como a terapia antifúngica tópica ou sistêmica, a utilização de produtos desinfetantes na PT, instruções de higiene oral ao paciente, a fabricação de uma nova PT ou reembasamento com material rígido ou resiliente (FRENKEL; HARVEY; NEWCOMBE, 2001; GRIMOUD *et al.*, 2005; NEPPELENBROEK *et al.*, 2008; MARIN ZULUAGA; GOMEZ VELANDIA; RUEDA CLAUJO, 2011; CAPISTRANO *et al.*, 2013; YARBOROUGH *et al.*, 2016). No entanto, sabe-se, atualmente, que quando a EP está instalada em um paciente é muito mais significativa a contagem de *C. albicans* na prótese do que a presença deste fungo na mucosa do paciente, evidenciando, assim, a importância do tratamento dado à prótese do paciente afetado (YARBOROUGH *et al.*, 2016). Contudo, por ser uma patologia crônica, a eliminação completa da colonização de *C. albicans* é complexa e, consequentemente, a reincidência é muito comum (SUN *et al.*, 2013). Além da dificuldade da completa eliminação do biofilme de *C. albicans* da PT, a resistência medicamentosa frente a uma ampla classe de

antifúngicos disponíveis é outro fator pelo qual há um alto índice de recorrência (NETT; ANDES, 2015).

A alta prevalência da EP, a possibilidade de evolução com complicações sistêmicas, e seu alto índice de recorrência evidenciam que, idealmente, os esforços da ciência seriam mais produtivos se voltados para o desenvolvimento de meios de prevenção da doença. Nesse sentido, pesquisas vem sendo direcionadas para a modificação das características da superfície de materiais de PT, a fim de reduzir a adesão e o crescimento do biofilme de *C. albicans*. Essas modificações das características de superfície são apresentadas por meio da modificação do material da PT em si, pela aplicação de materiais de revestimentos ou pela adição de componentes antifúngicos ou antiaderentes na manipulação da resina (YILDIRIM *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2008; ARAI *et al.*, 2009; REDDING *et al.*, 2009; YOSHIJIMA *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; ZAMPERINI *et al.*, 2011; COCHIS *et al.*, 2012; LAZARIN *et al.*, 2013; SIVAKUMAR *et al.*, 2014; ALAVARCE *et al.*, 2015; SHIRLEY *et al.*, 2015; KAMIKAWA *et al.*, 2016; MALAKHOV *et al.*, 2016; NAWASRAH; ALNIMR; ALI, 2016; SILVA *et al.*, 2016; TSUTSUMI; TAKAKUDA; WAKABAYASHI, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

Dessa forma, identificar e desenvolver revestimentos de superfícies apropriados para o uso em PTs é de grande importância clínica. Estes materiais devem ser biocompatíveis já que serão utilizados em contato constante com a mucosa de pacientes. Além disso, a forma que os materiais interagem com a *C. albicans* deve ser, também, avaliado.

Neste trabalho, uma síntese bibliográfica organizada por tópicos será apresentada, de modo que, a patologia (*C. albicans* e Estomatite Protética), o modo como se pretende prevenir a patologia (Mudança das características de superfície de Próteses Totais), os materiais propostos para esta prevenção (Cianoacrilatos e Adesivo tissular a base de veneno de cobra) terão, de forma sucinta, a literatura atual apresentadas.

1.1 *C. albicans* e a Estomatite protética

A *C. albicans* é um fungo comensal que constitui a microflora normal do ser humano, podendo estar presente na pele, cavidade oral e trato gastrointestinal e

urogenital da maioria dos indivíduos saudáveis (DANTAS ADA *et al.*, 2015). No entanto, principalmente quando há uma situação de imunossupressão do indivíduo, a *C. albicans* pode apresentar seu potencial patogênico causando infecções sistêmicas e superficiais (DOUGLAS, 1987; COLEMAN *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1997). Essas infecções estão diretamente ligadas ao desenvolvimento do biofilme, que são comunidades estruturadas de células sésseis, aderidas irreversivelmente a superfícies. Por ser um fungo dimórfico, *C. albicans* tem em seu biofilme maduro, após 24-48 horas de sua formação, células filamentosas (hifas) ou em formato de levedura imersas em uma matriz extracelular polimérica (COSTERTON *et al.*, 1995; ANDES *et al.*, 2004; KANEKO *et al.*, 2013; LU; SU; LIU, 2014). Os biofilmes apresentam uma resistência muito mais elevada aos sistemas de defesa do hospedeiro e aos medicamentos antimicrobianos do que as células planctônicas (DONLAN, 2002; CAO *et al.*, 2008; FANNING; MITCHELL, 2012).

Além de tecidos vivos, a *C. albicans* é capaz de colonizar superfícies abióticas como a prótese total. A presença de biofilme de *C. albicans* em PTs é apontada como uma das principais causas de uma doença inflamatória que atinge entre 15 e 70% dos usuários de PT, a EP (GENDREAU; LOEWY, 2011). Clinicamente, essa patologia se apresenta como áreas inflamadas e eritema da mucosa sob a prótese classificada pelo sistema descrito por Newton (1962), que a estratifica em três tipos. O tipo 1 refere-se ao estado inicial da condição, com pontos hiperêmicos localizados (ARENDORF; WALKER, 1987). O tipo 2 indica um eritema difuso e edema da mucosa, sendo o mais encontrado clinicamente. O tipo 3 se apresenta como uma hiperplasia papilar da mucosa queratinizada (NEWTON, 1962). Em sua maior parte, a EP não apresenta sintomatologia dolorosa, com poucos relatos de dor, prurido ou ardência (BUDTZ-JORGENSEN, 1974).

O desenvolvimento da EP depende da combinação de diversos fatores de risco. Dentre eles, estão: higiene deficiente da prótese, má qualidade da prótese, uso noturno, trauma da mucosa devido à adaptação deficiente, alergia ao monômero residual, condições inadequadas de armazenamento e envelhecimento da prótese, dentre outros (WEBB *et al.*, 1998a, 1998b; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; RAMAGE *et al.*, 2004; DIKBAS; KOKSAL; CALIKKOCAOGLU, 2006; GENDREAU; LOEWY, 2011; ERCALIK-YALCINKAYA; OZCAN, 2015). Apesar de não

ser o único microrganismo isolado no ambiente oral de pacientes portadores de EP, a contagem elevada de *C. albicans* na saliva e na PT parece ser fator-chave para o desenvolvimento da doença (ALLISON; DOUGLAS, 1973; ALTARAWNEH *et al.*, 2013). O'Donnell *et al.* (2015) observaram a prevalência de 72% de *Candida* spp em próteses de pacientes saudáveis e portadores de EP. Dentre as espécies, *C. albicans* foi a que apresentou uma contagem significativamente mais elevada em portadores da doença (O'DONNELL *et al.*, 2015).

O crescimento excessivo de *Candida* na EP é um achado comum e que pode levar à candidíase orofaríngea e esofágica, principalmente em pacientes imunocomprometidos, como aqueles que apresentam HIV/AIDS, diabetes não-controlada, deficiências nutricionais, órgãos transplantados, entre outras condições (SHEPHERD, 1986; NIKAWA *et al.*, 2002; RAMAGE *et al.*, 2004), tornando-se um risco para a manutenção de vida do paciente. Além disso, *C. albicans* é a espécie de *Candida* mais prevalente em infecções hospitalares, cuja taxa de mortalidade chega a ser de 50% (MORAN *et al.*, 2009; ANDES *et al.*, 2012).

A prótese total em si, parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de condições sistêmicas, como pneumonia aspirativa, candidíase pulmonar e endocardite infecciosa (TAYLOR; LOESCHE; TERPENNING, 2000; COULTHWAITE; VERRAN, 2007; PARAHITIYAWA *et al.*, 2009). O'Donnell *et al.* (2016) verificaram a presença de microrganismos capazes de causar infecções respiratórias em 65% das próteses de indivíduos usuários de PT. Este resultado foi independente da presença ou não de EP, sugerindo que, mesmo pacientes com mucosa saudável e boas práticas de higiene oral podem ser portadores de patógenos respiratórios em suas próteses. Dessa forma, para o desenvolvimento da EP não parece ser necessária uma imunossupressão, ou desequilíbrio muito grande da flora microbiana local, apenas a presença da PT e suas características favoráveis ao crescimento do biofilme podem ser determinantes.

1.2 Mudança das características de superfície de Próteses Totais

As próteses totais geralmente são confeccionadas com resinas acrílicas PMMA termopolimerizáveis. Essa resina possui algumas características de superfície que são extremamente favoráveis à adesão e ao desenvolvimento de biofilme de *C.*

albicans, podendo levar, na presença de outros fatores de risco, ao aparecimento da EP. As características que mais influenciam nesta adesão são a rugosidade, a hidrofobicidade/hidrofiliabilidade e a energia livre da superfície.

Ramage *et al.* (2004) verificaram que a *C. albicans*, em superfícies abióticas, tende a ser protegida das forças de cisalhamento nas irregularidades da superfície, tornando a retirada mecânica dessas células mais difícil (RAMAGE *et al.*, 2004). Dessa forma, quanto mais rugosa é a superfície mais favorável é a adesão de *C. albicans* (NIKAWA *et al.*, 1992; BULAD *et al.*, 2004; AL-DWAIRI; AL-QURAN; AL-OMARI, 2012). Além de proteger as células em forma de levedura e proporcionar um maior tempo para o estabelecimento de uma adesão irreversível dessas células à superfície, as proeminências das irregularidades da superfície funcionam como caminhos pelos quais a hifa se desenvolve, estimulando seu crescimento por meio do contato. Essa característica é denominada de tigmotropismo, vista também em plantas como a videira (MAYAHARA *et al.*, 2014).

A hidrofobicidade/hidrofiliabilidade da superfície é um parâmetro da energia livre da superfície e estão diretamente ligadas entre si, de modo que, de uma maneira simplificada, quanto maior a energia livre mais hidrofílico é o material (KANTA; SEDEV; RALSTON, 2005). A hidrofobicidade/hidrofiliabilidade da superfície quanto característica facilitadora de adesão de *C. albicans* parece ter um papel mais controverso na literatura. Muitos pesquisadores demonstraram que ao tornar a superfície da resina acrílica mais hidrofílica, seja por revestimentos ou por mudanças na sua composição, há uma diminuição da adesão de *C. albicans* (PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008; YOSHIJIMA *et al.*, 2010; ESTIVILL *et al.*, 2011; FRADE; ARTHINGTON-SKAGGS, 2011; KANG *et al.*, 2013; LAZARIN *et al.*, 2013). No entanto, esse resultado parece depender de outras variáveis além da hidrofobicidade da superfície, como a hidrofobicidade da parede celular do fungo. Essa interação é primordial para a adesão inicial do microrganismo, porque quanto mais hidrofóbico é o microrganismo mais fortemente ele se adere a superfícies que são igualmente hidrofóbicas (KLOTZ; DRUTZ; ZAJIC, 1985; HAZEN; GLEE, 1995). Entretanto, as espécies de *Candida* tem diferentes características de parede celular. Dessa forma, na literatura encontram-se, também, autores diversos afirmando que em superfície mais hidrofílica observa-se uma maior adesão de colonização por *C. albicans* (KANG *et al.*, 2013; KOCH;

BURGERS; HAHNEL, 2013). Diante desses questões, percebe-se que a molhabilidade da superfície e o seu papel na adesão de *Candida* ainda não foi completamente elucidado.

Diante disso, muitos pesquisadores vem concentrando esforços para modificar as características da superfície de materiais de prótese total a fim de diminuir a adesão de *C. albicans*. Alguns estudos demonstraram a diminuição da colonização da *C. albicans* por meio do revestimento da resina acrílica com Poli(N-vinil-2-pirrolidona) carregado com miconazol, anticorpos de gema do ovo de galinha extratos de plantas, selantes de superfícies, polímeros hidrofílicos, polímeros zwitteriônicos, biosurfactantes, dióxido de titânio, parilene, revestimento com plasma, entre outros (YILDIRIM *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2008; ARAI *et al.*, 2009; REDDING *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2010; ZAMPERINI *et al.*, 2011; COCHIS *et al.*, 2012; LAZARIN *et al.*, 2013; ALAVARCE *et al.*, 2015; SHIRLEY *et al.*, 2015; KAMIKAWA *et al.*, 2016; MALAKHOV *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

Outros pesquisadores observaram a diminuição da colonização por meio da incorporação de produtos com ação antifúngica ou antiaderente na manipulação da resina acrílica como dimetilaminododecil metacrilato, partículas de ionômero de vidro, nano partículas de óxido de zinco, henna, entre outros (NAWASRAH; ALNIMR; ALI, 2016; TSUTSUMI; TAKAKUDA; WAKABAYASHI, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

Contudo, o material ideal ainda não foi encontrado devido à certos aspectos negativos que estes podem promover, como a espessura da camada e interferência na retenção da prótese, interferência nas características mecânicas ou estéticas da PT, técnicas complexas de produção e elevados custos finais (BOURLIDI *et al.*, 2016).

Dessa forma, elegemos como produtos com potencial de diminuição de adesão de biofilme, alguns tipos de cianoacrilatos, baseado em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa que apontam resultados promissores e o adesivo tissular a base de veneno de cobra devido à sua capacidade anti-inflamatória e fácil disponibilidade (TÁVORA, 2011; MARCILLO, 2015).

1.2.1 Cianoacrilatos

Os cianoacrilatos (CAs) são monômeros de baixa viscosidade, incolores, com propriedades adesivas e derivados do ácido cianoacrílico, que apresentam uma

polimerização rápida quando entram em contato com substâncias básicas fracas (COOVER *et al.*, 1959; SASKA; GASPAR; HOCHULI-VIEIRA, 2009; TSE; KO, 2012). Sintetizados em 1949 e descritos por Coover em 1959, os CAs apresentam uma fórmula geral $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOR}$, de forma que o R representa cadeias laterais cujo a quantidade de carbonos identifica o tipo de CA, como: radical metil ($\text{R}=\text{CH}_3$), etil ($\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$), butil e isobutil ($\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$) e octil-cianoacrilato ($\text{R}=\text{C}_8\text{H}_{17}$) (14 da FAPESP). Os CAs degradam-se por hidrólise, formando os subprodutos cianoacetato e formaldeído, que é um composto tóxico aos tecidos (LENAERTS *et al.*, 1984; MULLER *et al.*, 1990; TSENG *et al.*, 1990; SINGER; QUINN; HOLLANDER, 2008). A velocidade de degradação do adesivo e a quantidade de subprodutos liberados estão diretamente relacionadas ao tamanho da cadeia lateral do CA. De forma que, quanto maior a cadeia lateral menor a velocidade de degradação, menos subprodutos liberados e consequentemente, menor toxicidade (MULLER *et al.*, 1990; CIAPETTI *et al.*, 1994b; THUMWANIT; KEDJARUNE, 1999). No entanto, a medida que a cadeia lateral aumenta, há uma redução de força de adesão quando comparados aos de cadeia mais curta como metil-cianoacrilatos (MCA) e etil-cianoacrilatos (ECA) (VOTE; ELDER, 2000; MIZRAHI *et al.*, 2011).

A polimerização dos CAs acontece como uma reação altamente exotérmica iniciada em contato com íons hidróxido que estão presentes na água, na umidade do ambiente e nos fluidos do corpo, como o sangue (LEGGAT; SMITH; KEDJARUNE, 2007; SCHNEIDER; OTTO, 2012). Durante a reação exotérmica, os monômeros se polimerizam formando cadeias longas poliméricas de cianoacrilatos com uma união adesiva estável e resistente a água.

Os CAs são comumente utilizados em ambientes domésticos como adesivos instantâneos para metais, plásticos, borrachas e cerâmicas sob diversos nomes comerciais (COOVER *et al.*, 1959; LIM; LEE, 2014). E devido, principalmente a sua resistência mecânica e capacidade de polimerização em ambientes úmidos, estes produtos também tem sido utilizados em procedimentos médicos e odontológicos (BARKHORDAR *et al.*, 1988; PINEROS-FERNANDEZ; RODEHEAVER; RODEHEAVER, 2005). Os CAs também possuem propriedades bacteriostáticas e hemostáticas que são vantajosas para o seu uso como biomaterial (AL-BELASY; AMER, 2003; SINGER; QUINN; HOLLANDER, 2008) .

Na medicina, eles vem sendo utilizados como adesivos cirúrgicos em enxertos dermatológicos, fixação de enxerto ósseo, em neurocirurgia, otorrinolaringologia, cirurgia do trato gastrointestinal e como cimento ortopédico (GOSAIN; LYON; PLASTIC SURGERY EDUCATIONAL FOUNDATION, 2002). (AMARANTE *et al.*, 1995; CRAVEN; TELFER, 1999; DE ALBUQUERQUE; GOMINHO; DOS SANTOS, 2006; DE OLIVEIRA NETO *et al.*, 2012; LIM; LEE, 2014). Quando utilizados como adesivo cirúrgico, a literatura indica que há uma recuperação tecidual mais rápida e com melhor resultado cosmético por diminuírem o tempo e o grau da resposta inflamatória (MATSUMOTO *et al.*, 1967; BHASKAR; CUTRIGHT, 1969; PEREZ *et al.*, 2000).

Na odontologia, seu uso tem sido incorporado em diferentes procedimentos, especialmente cirúrgicos, como em levantamento de seio maxilar, fixação de membranas e enxertos de bloco autógeno e fechamento de bordas de retalhos, além da ferulização de dentes avulsionados (KIM; GUPTA, 2003; BARBOSA *et al.*, 2009; COBB; AHMAD; KUMAR, 2011; ALI; ALHARBI; SURESH, 2013; DE MELO *et al.*, 2013; VASTANI; MARIA, 2013).

Apesar de CAs com cadeias mais longas serem preferidos para essas finalidades biológicas devido a menor histocitotoxicidade relatada, os CAs de cadeia mais curta como os ECA vem sido utilizados para diversas dessas funções biológicas como “sutura” de pele com ótimos resultados estéticos, enxerto ósseo e capeamento pulpar (BHASKAR; FRISCH, 1968; SINGER *et al.*, 1998; NITSCH *et al.*, 2005; DE ALBUQUERQUE; GOMINHO; DOS SANTOS, 2006; SASKA *et al.*, 2009; LANDEGREN *et al.*, 2010).

Portanto, os adesivos a base de cianoacrilatos (CA) são produtos que poderiam ser testados como revestimentos de superfície de próteses totais e agir no controle de biofilmes. Nesse sentido, em tese de doutorado desta instituição (FOB-USP), Távora (2011) avaliou a formação de biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica autopolimerizável modificada por ECA (Super Bonder®) por meio de microscopia confocal. Os espécimes foram revestidos com uma camada de ECA ou foram incorporadas gotas deste produto na estrutura dos espécimes. Observou-se uma diminuição significativa do biofilme de *C. albicans* nos espécimes que foram revestidos por ECA em comparação àqueles espécimes que tiveram gotas de ECA incorporados à sua estrutura ou àqueles que não receberam qualquer tratamento.

Em outra investigação prévia deste grupo de pesquisa, Marcillo (2015), em dissertação de mestrado, avaliou ECA (Super Bonder®), ECA em forma de gel (Super Bonder® Easy gel), butil-cianoacrilato (BCA; Tekbond® 932), octil-cianoacrilato (OCA; Dermabond®) e um selante biológico a base de veneno de cobra (VC) quanto a capacidade de inibição da adesão de *C. albicans* sobre resinas acrílicas para base de prótese total. Os resultados obtidos a partir da cultura microbiológica (CFU/mL) e pelo ensaio colorimétrico XTT demonstraram que todos os grupos, exceto o VC, diminuem a adesão do biofilme.

Todo material com finalidade de uso biológico deve ser biocompatível e um dos principais problemas dos CAs como biomaterial é a sua relatada citotoxicidade. Por esta razão, para um melhor entendimento acerca desta questão, o próximo item será destinado à uma sucinta revisão literária em ordem cronológica sobre estudos conduzidos relacionando CAs e viabilidade de células diversas.

1.2.1.1 Citotoxicidade de cianoacrilatos

Ciapetti *et al.* (1994a e 1994b) observaram que o contato direto entre fibroblastos de linhagem de rato L929 e BCA ou ECA em forma líquida e em gel causou elevada citotoxicidade. Enquanto, em contato indireto, quando houve adesão dos fibroblastos a superfície previamente ao contato com as substâncias não houve citotoxicidade significativa, com exceção do ECA em forma líquida. Já quando as células foram colocadas para adesão imersas em extrato, a citotoxicidade foi importante em todos os grupos.

Ao observar a utilização indevida de “colas instantâneas” (cianoacrilatos) por pacientes que fraturam suas PTs, Thumwanit e Kedjarune (1999) avaliaram a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos na presença de 3 marcas comerciais não divulgadas de MCA e ECA. A citotoxicidade foi avaliada após 1, 3, 7 e 14 dias em contato indireto com 5 µL CAs por meio de ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e cristal violeta. Os resultados indicaram uma liberação de produtos tóxicos aos FGH pelos cianoacrilatos por, pelo menos, 2 semanas.

Montanaro *et al.* (2001) observaram por meio do ensaio de absorção do vermelho neutro que a citotoxicidade de dois adesivos cirúrgicos (Glubran®- mistura de ECA e BCA; Glubran® 2- BCA) em contato indireto com células L929, é dependente da diluição do extrato de cada material. Os autores observaram que quando utilizavam o extrato não diluído, conforme as indicações da ISO 10993, parte 12 (International Organization for Standardization Specification 2012), ou diluído em 1:2, a citotoxicidade era elevada enquanto utilizavam o extrato na diluição de 1:10 a viabilidade das células era em torno de 70%.

Azevedo, Marques e Bombana (2003) avaliaram por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán a citotoxicidade de duas marcas comerciais de ECA (Super Bonder® e Ultrabond®) e uma de BCA (Histoacryl®) em contato direto com fibroblastos de linhagem NIH 3T3 por curto (0, 6, 12 e 24 h) e longo (1, 3, 5 e 7 dias) prazo. Os resultados demonstraram que todos os grupos experimentais foram biocompatíveis, com um mínimo de 82% de viabilidade nas primeiras 24 h. Em curto prazo, Super Bonder® e Histoacryl não diminuíram a viabilidade das células. Já em longo prazo, Super Bonder® apresentou menores índices de viabilidade, no entanto foi o único grupo que mostrou um aumento progressivo e contínuo de viabilidade celular. Segundo os autores, a presença de células em divisão celular após três dias de contato com Super Bonder® indicou a preservação da capacidade de auto renovação.

Chen *et al.* (2007) avaliaram a citotoxicidade de metoxipropil cianoacrilato e BCA (Histoacryl®) por meio da observação do halo de inibição de queratinócitos e células epiteliais ou endoteliais da córnea de bovinos, após 0, 24, 48 e 72 h. Todos os produtos demonstraram citotoxicidade elevada após 24 h de aplicação.

Nitsch *et al.* (2005) avaliaram três adesivos cirúrgicos: um ECA (Epiglu®), um BCA (Histoacryl®) e um OCA (Dermabond®) quanto a citotoxicidade em contato indireto com células de linhagem L929 e HEP2, que representam células cancerígenas de laringe humana por meio dos testes de halo de inibição e MTT. As diluições utilizadas foram de 1:1 a 1:512 por 72 h. O OCA demonstrou um maior halo de inibição e uma maior inibição de crescimento no MTT, quando comparado ao ECA e ao BCA. No entanto, em contraste com os resultados *in vitro*, quando avaliados histologicamente com microscopia eletrônica em mini porcos, não houve evidência de citotoxicidade.

Landegren *et al.* (2010) investigaram a citotoxicidade de ECA (Evobond®) e BCA (Hystoacryl®) em células de linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de contato direto através da detecção de morte celular por liberação de cromo radioativo (51Cr) e halo de inibição. Os autores observaram uma diminuição da toxicidade já a partir do 1º até o 14º dia no ensaio de 51Cr e a partir do 3º dia no ensaio de halo de inibição. Não houve diferença entre os o ECA e o BCA.

Schneider e Otto (2012) conduziram experimentos *in vitro* e *in vivo* avaliando a biocompatibilidade do BCA (Hystoacryl®). Para o estudo *in vitro*, os autores utilizaram um extrato de 0,2 g/mL, conforme as normas ISO 10993, em contato indireto com células de fibroblastos de ratos 3T3 e a viabilidade foi analisada após 24 h e 4 dias por meio de sais de tetrazólio solúveis em água (WST). Os resultados demonstraram que houve uma drástica diminuição de viabilidade, sendo de 33 e 27 % em 24 h e 4 dias, respectivamente. Em modelo animal, os autores observaram que os coelhos que tiveram seus septos nasais tratados com adesivo BCA apresentaram uma maior reação inflamatória de corpo estranho e necrose da cartilagem.

Ao avaliar a citotoxicidade a longo prazo (3, 5, 7, 10 e 14 dias) de MCA (ThreeBond®) e ECA (Super Bonder®) em contato direto com osteoblastos orais humanos por meio de ensaio colorimétrico MTT, de Melo *et al.* (2013) observaram que o ECA foi menos citotóxico do que o MCA, comparando-se ao controle.

Visando o aumento da biocompatibilidade, Lee *et al.* (2013) desenvolveram um novo adesivo cirúrgico com um princípio ativo cianoacrilato de cadeia lateral mais longa, alil-cianoacrilato (PACA). Os autores, então, o compararam ao adesivo cirúrgico mais amplamente utilizado do mercado, Dermabond® (OCA). Foi realizado o teste de sais de tetrazólio solúveis em água (WST) em contato direto e indireto entre fibroblastos de ratos L929 e os CAs por 24, 48 e 72 h. Em contato direto, tanto as células tratadas com PACA (54.4%, 61.1% e 94.2%) quanto as tratadas com Dermabond® (50.8, 66.1% e 95.3%) demonstraram aumento de viabilidade durante o curso do experimento. Já em contato indireto, os dois adesivos demonstram viabilidade superiores a 80% em todos os tempos. Adicionalmente, um ensaio *in vivo* foi realizado com avaliação histológica de 7 dias após a incisão. Observou-se que os grupos tratados com adesivos apresentavam cicatrização da área incisada, enquanto

o grupo não tratado não apresentou selamento. Quando comparando os dois adesivos, PACA apresentou um processo inflamatório menor do que o Dermabond®.

1.2.2 Adesivo Tissular a base de Veneno de Cobra

Adesivos de fibrina são adesivos biológicos tissulares que vêm sendo utilizados há muitos anos com finalidade cirúrgica, principalmente, devido as suas propriedades hemostáticas e adesivas (LERNER; BINUR, 1990; BRENNAN, 1991; HARADA; PRESSLER; MCNAMARA, 1992). São de rápido e fácil manuseio, além de serem absorvíveis e não tóxicos para os tecidos (PETERSEN *et al.*, 2004; SCHNEIDER; OTTO, 2012). Usualmente, esses adesivos são compostos de trombina derivada de bovinos e fibrinogênio derivado de humanos (BARROS *et al.*, 2009). No entanto, essa derivação humana pode facilitar o transporte de doenças transmissíveis pelo sangue como hepatite, HIV, sífilis e doença de chagas (FERREIRA *et al.*, 2013).

No sentido de eliminar o risco de transmissão de doenças, pesquisadores da Universidade Estadual Paulista (UNESP) no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) em Botucatu-SP vem desenvolvendo desde 1989 um adesivo tissular a base de veneno de cobra (VC) composto por fibrinogênio extraído de búfalo e enzima semelhante a trombina extraída de cascavel. Além disso, outra vantagem apresentada pelo uso do VC é o aumento da disponibilidade do material e, consequente, diminuição do custo do produto, devido ao maior tamanho do animal doador de fibrinogênio, além da possibilidade de criação de cobras para coleta do veneno (BARROS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2013).

O VC doado pelo CEVAP é composto por três soluções que ao serem misturadas polimerizam e formam uma espécie de coágulo. Os compostos são:

- Solução 1: Fibrinogênio extraído pelo processo de crioprecipitação do sangue de búfalo.
- Solução 2: Cloreto de cálcio. Solução na qual o fibrinogênio e a enzima semelhante a trombina são reconstituídos.
- Solução 3: Enzima semelhante a trombina extraída do veneno de cobra da espécie *Crotalus durissus terrificus* submetido a tratamentos moleculares. Por esta solução ser responsável pela polimerização, deve ser homogeneizada por último (BARBIZAN *et al.*, 2013).

Os adesivos de fibrina simulam a última etapa da cascata de coagulação do sangue, em que há a conversão do fibrinogênio em fibrina induzida pela trombina, levando a formação do coágulo (BARROS *et al.*, 2009). Por isso, os adesivos de fibrina são hemostáticos efetivos para sangramentos de baixa pressão (BRENNAN, 1991). A enzima semelhante a trombina extraída do veneno de cobra tem atividades semelhantes a trombina, mas é 4000x mais potente em induzir a transformação do fibrinogênio em fibrina (DE BARROS *et al.*, 2016).

Desde o seu desenvolvimento, o VC já foi avaliado em diversas áreas da medicina e da odontologia como adesivo biológico, apresentando resultados bastante promissores (KAMIKAWA *et al.*, 2016). Em um estudo inicial, foi determinado que o VC promoveu uma adequada união e regeneração dos nervos injuriados em ratos Wistar com o nervo ciático lesionado e os resultados obtidos foram semelhantes aos adesivos de fibrina convencionais já utilizados em procedimentos semelhantes (IUAN *et al.*, 1995). Já em lesões de neurônios periféricos e com avulsão de raízes dorsais e ventrais em ratos, o VC demonstrou características neuroprotetoras, permitiu a preservação de redes sinápticas e regeneração axonal, além de melhorar a função sináptica e motora (BARBIZAN *et al.*, 2013; BENITEZ *et al.*, 2014; BUCHAIM *et al.*, 2015).

O VC já foi avaliado, também, como adesivo biológico em enxerto de pele em cachorros e humanos e foi observada uma maior viabilidade e reparação tecidual além de uma excelente resultado cosmético (STOLF, 1999; RAHAL *et al.*, 2004). Não foi observada nenhuma indicação de toxicidade local ou sistêmica (STOLF, 1999). Além disso, Gatti *et al.* (2011) avaliaram o VC quanto a sua influência no processo de cicatrização de úlceras venosas de membros inferiores, e observou-se que, durante 8 semanas, o adesivo tissular causou um melhor processo de cicatrização e aumentou a taxa de cura.

Em regeneração tecidual guiada, o VC foi utilizado por Gasparoto *et al.*, em (2014), como arcabouço para células-tronco mesenquimais e observou-se que o adesivo de fibrina permitiu a migração, proliferação e diferenciação em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. Quando testado como arcabouço de cartilagem femoral em ovelhas, o VC apresentou performance aceitável, sem reações inflamatórias exageradas durante 15 dias (DE BARROS *et al.*, 2016).

Na odontologia, o VC já foi empregado como adesivo cirúrgico em cirurgias periodontais, participando, inclusive, de pesquisas no departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, com o objetivo de determinar a possibilidade de substituir as suturas convencionais de enxertos gengivais livres por selantes à base de veneno de cobra. Nesses estudos foram avaliados 15 pacientes que receberam enxertos gengivais livres para cobertura radicular na região de pré-molares mandibulares contralaterais imobilizados por sutura e por VC. Ao avaliar clinicamente os resultados, observou-se uma estética melhorada e menor indicação de dor pelos pacientes no lado que recebeu o VC (BARBOSA; GREGH; PASSANEZI, 2007). Ao avaliar histologicamente os sítios após 7, 14 e 45 dias de cicatrização, por meio de biópsias, o grupo com o selante apresentou, em 7 dias, melhores resultados no reparo tecidual, com a presença de maior quantidade de fibroblastos. No entanto, após 14 e 45 dias a maturação do tecido ocorreu com as mesmas características em todos os grupos testados, apresentando uma maior densidade de fibroblastos e colágeno. A maior quantidade de fibroblastos no grupo experimental aos 7 dias pode ser explicada pela possível atração das células pelo estímulo de deposição de fibrina (BARBOSA *et al.*, 2008).

Semelhantemente, Chiquito (2007) conduziu uma investigação avaliando dois grupos de 21 pessoas divididas em fixação de enxerto conjuntivo em cobertura de raízes por meio de sutura convencional ou por meio de VC. O grupo experimental demonstrou melhor resultado no tempo cirúrgico, quantidade de gengiva inserida e profundidade de sondagem vestibular.

A partir das características regeneradoras do VC demonstradas na literatura avaliou-se a possibilidade dessas propriedades serem benéficas aos portadores de EP, já que, por muitas vezes, há uma lesão tecidual crônica.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar o potencial citotóxico dos produtos experimentais: etil-cianoacrilato convencional, etil-cianoacrilato gel formulação “a”, etil-cianoacrilato gel formulação “b”, butil-cianoacrilato, octil-cianoacrilato e adesivo tissular a base de veneno de cobra.
- Avaliar o nível de estresse oxidativo causado pelos produtos experimentais em células de biofilme de *C. albicans*.

2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar a viabilidade celular e observar a morfologia de fibroblastos gengivais humanos após 24, 48 e 72h de contato com os produtos experimentais, por meio do ensaio colorimétrico a base de MTT.
- Quantificação das espécies reativas de oxigênio produzidas por células do biofilme de *C. albicans* após 1h de contato com os produtos experimentais, por meio de sonda fluorogênica (CellRox® Deep Red).

3 *Material e* *Métodos*

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos ensaios, os espécimes foram projetados para se assemelharem ao máximo à prótese total, em termos de material utilizado e características físico-químicas. Desta forma, espécimes de resina acrílica quadrangulares foram confeccionados e os produtos experimentais foram aplicados como revestimentos sobre estes.

3.1 Confeção dos espécimes

A confecção dos espécimes de resina acrílica foi realizada conforme as técnicas de confecção convencional de PTs, na qual um modelo em cera ou silicone da prótese é incluído em mufla para que haja posterior polimerização em resina acrílica por meio de termopolimerização.

Dessa forma, modelos de silicone por condensação (Zetalabor, Zhermack, Badia Polesine, Rovigo, Itália) foram confeccionados utilizando uma matriz metálica, com espaços quadrangulares medindo 10 mm de comprimento, 10 mm de largura e 4 mm de altura (Figura 1A). Após preenchimento da matriz com silicone, esta foi prensada entre duas placas de vidro, sob peso de 5 kg por 10 minutos. Em seguida, os padrões de silicone foram removidos da matriz e os excessos foram cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi 15c (Solidor, Diadema, São Paulo, Brazil) (JACOBINA, 2012; OLIVEIRA, 2013).

Os padrões de silicone, então, foram incluídos em gesso tipo III em muflas metálicas (Figura 1C) (PINTO, 2007; OLIVEIRA, 2013). Durante uma hora, as muflas permaneceram em prensa hidráulica (VH Equipamentos médicos Odont. Acess. LTDA., Araraquara, São Paulo, Brasil) com 0,5 Kgf de pressão e somente então, foram abertas para a remoção dos padrões de silicone e exame do molde no gesso (Figura 1D) (PINTO, 2007; OLIVEIRA, 2013).

O interior dos moldes de gesso foi isolado com isolante líquido Cel-lac (SS White Duflex, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e preenchido com a resina acrílica incolor termopolimerizável VIPI Cril Plus (VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil) na fase plástica (Figura 1E e F). A base da mufla foi fechada com a sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica inicialmente sob pressão de 0,5 kgf até atingir 1,5 kgf, conforme orientações do fabricante (Figura 1G) (PINTO, 2007). Em seguida, a mufla foi levada a uma prensa manual para a

termopolimerização da resina acrílica em termopolimerizadora digital (Solab, Piracicaba, São Paulo, Brasil) (Figura 1H). A termopolimerização consistiu na manutenção da temperatura da água da termopolimerizadora digital em 73 °C durante 90 minutos e posterior elevação para 100 °C por 30 minutos. Ao final, foram obtidos padrões de resina acrílica, medindo 10 mm x 10 mm x 4 mm, nos quais foi realizado o acabamento com o auxílio de fresa de tungstênio em baixa velocidade (SARTORI *et al.*, 2006).

Em seguida, as amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Ultrasonic Cleaner USC 700, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba, São Paulo, Brasil) por 20 minutos em água destilada, para remoção dos detritos da superfície da resina (PEREIRA-CENCI *et al.*, 2007).

Todas as amostras tiveram sua superfície polida mecanicamente em uma politriz metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, São Paulo, Brasil) com um dispositivo de aço inoxidável redondo com um orifício central que permite o posicionamento e fixação da amostra por meio da tensão superficial causada pela interposição de uma gota d'água. O orifício redondo tem medidas exatas para receber um espécime quadrangular de 10 mm x 10 mm, e sua profundidade é de 3 mm para limitar o desgaste durante o polimento (Figura 1I). Posteriormente, todos os espécimes foram individualmente submersos em 2 mL de água destilada em placas de 24 poços e acondicionados em estufa a 37°C durante 48 horas, conforme as normas da ISO 1567:1988 (International Organization for Standardization Specification 1567, 1988) visando a eliminação de monômero residual. Ao final, foram obtidos 387 espécimes de resina acrílica quadrangulares (10 mm x 10 mm x 3 mm) (Figura 1J).

Em seguida, todos os espécimes foram embalados individualmente para esterilização por óxido de etileno (Acecil – Central de esterilização comércio e indústria, Campinas, SP) (SILVA *et al.*, 2006; MIMA *et al.*, 2008).

Figura 1- Confeção dos espécimes. A- Matriz metálica e padrões de silicone (10x10x4 mm); B- Mufla metálica; C- Padrões de silicone incluídos em gesso em muflas metálicas; D- Modelo de gesso dos padrões de silicone; E- Resina acrílica manipulada em pote de vidro; F- Resina acrílica em fase plástica acomodada ao modelo de gesso em mufla; G- Mufla em prensa hidráulica; H- Mufla em prensa manual pronta para termopolimerização; I- Dispositivo redondo para auxiliar polimento do espécime de resina acrílica; J- Espécime de resina acrílica finalizado (10x10x3 mm).

3.1.1 Revestimentos de superfície

Os produtos testados como revestimentos da superfície das resinas acrílicas foram:

1. Etil-cianoacrilato convencional (ECAC; Super Bonder® Original) (Figura 2A).
2. Etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “a” (ECAga; Super Bonder® Easy Gel) (Figura 2B).
3. Etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “b” (ECAgb; Super Bonder® Power Flex) (Figura 2C).
4. Butil-cianoacrilato (BCA; Tekbond® 932) (Figura 2C).
5. Octil-cianoacrilato (OCA; Dermabond®, Johnson & Johnson/Ethicon, Somerville, NJ) (Figura 2D).
6. Adesivo tissular a base de veneno de cobra (VC) (Figura 2E).

Figura 2- Produtos experimentais utilizados. A- Super Bonder® Original; B- Super Bonder® Easy Gel; C- Super Bonder® Power Flex; D- TekBond® 932; E- Dermabond®; F- Adesivo tissular a base de veneno de cobra.

Os espécimes de resina acrílica, aleatoriamente selecionados para receber ou não em sua superfície os produtos testados, foram divididos em grupos para a realização dos ensaios (Tabela 1). Os espécimes que não receberam tratamento de superfície constituíram o grupo sem tratamento (ST). A aplicação dos produtos foi realizada no mínimo 12 horas antes do início dos ensaios para que houvesse tempo suficiente para sua total polimerização. A aplicação foi realizada no laboratório de Microbiologia do Centro Integrado de Pesquisa-1 (CIP-1) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, em capela de fluxo laminar (modelo FLV-808/3, Filterflux®, Piracicaba, SP) previamente desinfetada com álcool 70%.

3.1.1.1 Aplicação dos cianoacrilatos

A aplicação dos produtos dos grupos cianoacrilatos (ECAc, ECAga, ECAgb, BCA e OCA) nos espécimes foi realizada com auxílio de uma pinça de dissecação anatômica (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil), que permitiu a estabilização do espécime tocando apenas dois de seus vértices, permitindo, assim, a aplicação do produto em toda a sua extensão sem que houvesse adesão do espécime aos materiais utilizados (Figura 3A e B).

Com a estabilização permitida pela pinça, pode-se depositar 1 gota do produto na superfície de cada espécime, e com o auxílio de um pincel, esta gota foi espalhada de modo que uma camada fina e regular fosse formada (Figura 3A e B). Após 40 minutos, este processo foi repetido, constituindo assim, um espécime com duas camadas do produto. O tempo entre as duas camadas foi baseado em indicação dos fabricantes e observações de polimerização em estudos piloto. Os espécimes foram depositados individualmente em poços de placa de 24 poços e após, no mínimo, 12 horas de polimerização, meios de cultura foram depositados para que fosse obtido o meio condicionado que seria utilizado nos experimentos.

3.1.1.2 Aplicação dos adesivo tissular a base de veneno de cobra

O adesivo tissular a base de veneno de cobra foi cedido pelo CEVAP em três soluções e foram estocadas a -20°C até o momento de uso, quando foram postas em temperatura ambiente (Figura 2E). Para o preparo do VC, as soluções foram

misturadas na proporção de 1/2 de fibrinogênio, 2/3 de cloreto de cálcio e 1/3 de proteína extraída do veneno de serpente de forma que fossem obtidos 50 µL do produto. O terceiro composto é o responsável pela polimerização e por esta razão foi o último a ser homogeneizado (BARBIZAN *et al.*, 2013). Com o auxílio de uma pipeta, 50 µL do produto foi depositado e espalhado na superfície dos espécimes com um pincel (Brush Tips, Plasdent Corporation, Pomona, Califórnia, Estados Unidos) (Figura 3C e D). A quantidade de 50 µL de cada produto foi determinada em estudo piloto, pois é quantidade suficiente para que haja um recobrimento da superfície dos espécimes sem que haja excesso de material. Da mesma forma dos grupos cianoacrilatos, o grupo VC também recebeu outra camada após 40 min de polimerização e foi depositado em poços de placas de 24 poços.

Figura 3- Aplicação dos produtos experimentais. A- Depósito de ECAc na superfície de espécime estabilizado por pinça anatômica; B- Aplicação de ECAc com auxílio de um pincel; C- Depósito de VC na superfície de espécime estabilizado por pinça; D- Aplicação de VC com auxílio de um pincel.

Tabela 1: Grupos de acordo com o revestimento de superfície e os ensaios específicos e quantidade de espécimes destinados a cada grupo.

Tempo	MTT			ERRO
	24h	48h	72h	1h
Grupos	ECAc (n=12)	ECAc (n=12)	ECAc (n=12)	ECAc (n=9)
	ECAGA (n=12)	ECAGA (n=12)	ECAGA (n=12)	ECAGb (n=9)
	ECAGb (n=12)	ECAGb (n=12)	ECAGb (n=12)	BCA (n=9)
	BCA (n=12)	BCA (n=12)	BCA (n=12)	OCA (n=9)
	OCA (n=12)	OCA (n=12)	OCA (n=12)	VC (n=9)
	VC (n=12)	VC (n=12)	VC (n=12)	ST (n=9)
	ST (n=12)	ST (n=12)	ST (n=12)	Ctrl - (n=9)
	Ctrl - (n=12)	Ctrl - (n=12)	Ctrl - (n=12)	
	Ctrl + (n=12)	Ctrl + (n=12)	Ctrl + (n=12)	

Grupos constituintes e tempos experimentais de citotoxicidade (MTT) e de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO); n= quantidade de espécimes por grupo; Ctrl – corresponde ao meio de cultura de cada ensaio; Ctrl + corresponde à água destilada.

3.1.2 Meio condicionado

Os ensaios foram realizados a partir de contato indireto com os produtos experimentais através de meio condicionado, seguindo as normas ISO 10993-12 que regem avaliações biológicas de biodispositivos. Para este fim, cada poço da placa de 24 poços que continha um espécime recebeu 1,066 mL de meio de cultura sendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco® Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e penicilina/estreptomicina (100UI/mL/100µg/mL) (DMEM completo) para o ensaio de MTT ou Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Gibco® Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) para o ensaio de ERO. Então, as placas de 24 poços foram mantidas durante 24 horas em estufa a 37°C e após este período as soluções foram utilizadas como meios de cultura condicionados.

3.2. Avaliação da citotoxicidade dos revestimentos de superfície sobre fibroblastos gengivais humanos: ensaio colorimétrico MTT

3.2.1 Obtenção dos fibroblastos gengivais humanos (FGH)

A partir de culturas primárias, previamente obtidas e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Carla Andreotti Damante (Processo Plataforma Brasil CAAE 50692515.7.0000.5417), fibroblastos gengivais humanos armazenados a -80°C foram descongelados e cultivados em garrafas de cultura T75, contendo meio de cultura DMEM completo, e incubados em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) (Function Line, Thermo-Fischer Scientific Heraeus, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Sempre que a cultura de fibroblastos atingiu sub-confluência, esta foi submetida a tratamento enzimático com solução de tripsina 0,05%/ EDTA 0,02%, e separada em suspensão. Parte foi plaqueada em placa de 96 poços (10⁴ células/poço) para utilização nos ensaios de viabilidade celular e parte em outra garrafa T75 para permanecer em cultura (MOSMANN, 1983; LIU et al., 2013).

3.2.2 Processamento dos espécimes para ensaio colorimétrico MTT

O meio de cultura dos FGH (DMEM completo) foi removido de cada poço da placa de cultura. Os meios condicionados foram depositados em cada poço com os fibroblastos aderidos, bem como com água destilada (controle positivo da reação; Ctrl +) e com meio de cultura (controle negativo da reação; Ctrl -) e, foram mantidos em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) por 24, 48 e 72 horas.

Após cada período de avaliação, os meios foram retirados e cada poço foi lavado 2 vezes com 200 µL de solução tampão fosfato-salina (PBS) para remoção de resíduos dos testes. Depois, 200µl de meio DMEM incompleto (sem soro bovino fetal) foram adicionados em cada poço, juntamente com 10µL da solução stock MTT (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). As placas de cultura foram incubadas em estufa de CO₂ por 4 horas e, em seguida, a solução de MTT foi retirada com cuidado dos poços, para não remover os cristais de formazan (MOSMANN, 1983; LIU et al., 2013). Em seguida, os mesmos foram solubilizados com 150µl de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. Após solubilização, as placas foram analisadas em espectrofotômetro a 500 nm. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata para cada período (n=12/grupo). A porcentagem de células viáveis foi calculada considerando como 100% o controle negativo (meio de cultura) de cada tempo experimental. A morfologia das células foi monitorada durante toda a investigação por meio de microscópio invertido (CKX 41, Olympus, Tóquio, Japão) e imagens dos grupos experimentais e controles foram adquiridos.

3.3 Ensaio de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Para a avaliação de espécies reativas de oxigênio foi necessário o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* foi realizado em placas de 96 poços e o seguinte protocolo foi seguido:

3.3.1 Imersão em saliva artificial

A saliva artificial foi preparada de acordo com a composição e concentrações descritas por Hahnel *et al.* (2010). Os componentes e suas concentrações nesta fórmula são similares aos encontrados na saliva humana e foi utilizada em diversos estudos para colonização de microrganismos, incluindo *C. albicans*. A cada poço da placa de 96 poços, foi adicionado 200 µL de saliva artificial, simulando a influência da formação da película adquirida na colonização de *C. albicans* e foram mantidos em agitadora (Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos LTDA, Vargem Grande do Sul, SP) a 37° C por 2 horas. Após este período, a saliva foi retirada e os poços foram inoculados com *C. albicans*.

3.3.2 Preparo do inóculo

A cepa selvagem *C. albicans* SC 5314 foi reativada de sua cultura original a -80°C (solução contendo 20% de glicerol) em 20 mL de meio de cultura (GILLUM; TSAY; KIRSCH, 1984; DA SILVA *et al.*, 2010); (CATALAN *et al.*, 2008). Previamente a confecção do inóculo, uma alçada da cepa descongelada foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura YEPD Agar (Clontech laboratories Inc, Mountain View, CA, USA) que permaneceu incubada durante 48 h a 37° C em estufa bacteriológica (ULUDAMAR; OZYESIL; OZKAN, 2011; ZAMPERINI *et al.*, 2011). Então, uma colônia de *C. albicans* foi removida da placa, ressuspensa em 50 mL de meio de cultura YEPD e mantida overnight (aproximadamente 16h) em incubadora com agitação orbital (Shaker-Mod. 430/RDBP, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP) a 30° C, sob agitação de 180 rpm, resultando em uma pré-cultura (MATSUURA *et al.*, 1997; EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL; INFECTIOUS, 2000; RAMAGE *et al.*, 2001).

Para a purificação das células, 5 mL da pré-cultura foram retirados e colocados em tubos Falcon de 15 mL. Estes foram submetidos à centrifugação a 4000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante resultante do processo desprezado. A purificação das células foi realizada por meio de lavagem do pellet com 5mL de PBS e homogeneização em vórtex, seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, com descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 1998; DA SILVA *et al.*, 2008).

Em seguida, foram retirados 10 µL da suspensão e diluídos em PBS na proporção de 1:10. A contagem dos fungos foi realizada em câmara de Neubauer (BIZERRA *et al.*, 2008). Conhecida a concentração final da suspensão, foi realizada a padronização através da diluição em PBS para obtenção do inóculo em uma concentração final de 1×10^7 cels/mL (CHANDRA *et al.*, 2001b).

3.3.3 Formação do biofilme

Após formação da película salivar, 200 µL da suspensão celular foram adicionados aos poços da placa de 96 poços, através de pipetas e ponteiras descartáveis. Inicialmente, a placa foi mantida em incubadora com agitação orbital por 90 minutos a 37°C, com agitação de 75 rpm para a fase de adesão do biofilme (CHANDRA *et al.*, 2001b; DA SILVA *et al.*, 2010). Cessado os 90 minutos, a placa foi centrifugada (20°C, 4000 rpm durante 5 min) e o sobrenadante de cada poço foi descartado. A seguir, aos poços já inoculados, foram adicionados 200 µL de meio de cultura RPMI-1640 e a placa foi incubada em agitadora a 37°C sob agitação de 75 rpm durante um período de 24 horas para o desenvolvimento do biofilme (CHANDRA *et al.*, 2001a; KUMAMOTO, 2002; BIZERRA *et al.*, 2008; KUCHARIKOVA *et al.*, 2011). Após este período, o conteúdo de cada poço foi retirado gentilmente com auxílio de pipeta, para que houvesse manutenção do biofilme aderido ao fundo do poço. Então, cada poço foi lavado duas vezes por centrifugação (20°C, 4000 rpm durante 5 min) com 200 µL de PBS estéril (RAMAGE *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2011). Posteriormente, aos poços, foram adicionados os meios condicionados e o controle e a placa mantida em agitadora durante 1 h (DANTAS ADA *et al.*, 2015; KOMALAPRIYA *et al.*, 2015).

Após este período de contato com o meio condicionado de cada grupo, o biofilme de *C. albicans* desenvolvido nas placas de 96 poços foi avaliado por sua produção

endógena de ERO. Em cada experimento, um poço de cada grupo não recebeu o reagente fluorescente para evitar a interferência de uma possível autofluorescência das células. O ensaio foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes (n=9 por grupo).

3.3.4 Protocolo ERO

Após contato indireto com os meios condicionados durante 1 h, a placa foi centrifugada (20°C, 4000 rpm durante 5 min) e os meios retirados. Então, os biofilmes foram lavados por centrifugação com 200 µL de PBS para a retirada de resíduos dos produtos. Em seguida, a cada poço foi adicionado 10 µL do reagente CellRox® Deep Red (5µM) (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e 190µL de PBS, e foram mantidos por 30 minutos em estufa a 5% de CO₂ a 37°C na ausência de luz, conforme orientações do fabricante. CellRox® é uma sonda fluorogênica que, em estado reduzido e mediante oxidação exibe uma forte fluorescência, indicando a presença de espécies reativas de oxigênio. Após esse período, a placa foi retirada da estufa, centrifugada (20°C, 4000 rpm durante 5 min) e uma lavagem por centrifugação com PBS foi realizada. Em seguida, 200 µL de PBS foi adicionado aos poços para a leitura da fluorescência (KOBAYASHI *et al.*, 2002). A avaliação da produção de ERO foi verificada por meio da leitura dos níveis de unidade relativa de fluorescência (rfu- relative fluorescence unit) realizada em fluorímetro (Synergy Mx Monochromator- Based Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, Vermont, Estados Unidos) com leituras a cada 30 min durante 3 h a 640/665nm. A cinética foi realizada nos ensaios piloto afim de realizar uma varredura e encontrar o tempo de maior liberação das espécies reativas de oxigênio. Os valores da terceira hora, por serem mais significativos, foram registrados e neste momento amostras foram coletadas e o ensaio piloto de cultura microbiológica (CFU/mL) foi executado para a normalização (LIAO *et al.*, 2015).

3.4 Análise estatística

Os dados referentes ao ensaio de MTT, mostraram-se homogêneos e por esta razão, o teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA) a 2 critérios foi utilizado e para a comparação entre grupos utilizou-se o teste de Tukey. Já para o ensaio de

ERO, uma análise ANOVA a 1 critério seguida por teste de Tukey foi utilizado para avaliar os grupos. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade

4.1.1 Ensaio MTT

Por meio do ensaio colorimétrico MTT, foi possível observar a viabilidade dos FGH ao longo de 24, 48 e 72 h de contato indireto com os produtos experimentais e controles, como mostra a tabela 2 e figuras 4.

Tabela 2- Valores das médias $\pm$ desvio padrão de absorbância (nm) do ensaio MTT, de cada grupo em cada tempo de avaliação.

Material	Tempo					
	24h A		48h AB		72h B	
ECAc a,b	0,5663	$\pm$ 0,066	0,6024	$\pm$ 0,1335	0,698	$\pm$ 0,2179
ECAg a c	0,0819	$\pm$ 0,039	0,0765	$\pm$ 0,0185	0,048	$\pm$ 0,00585
ECAgb a	0,4884	$\pm$ 0,103	0,486	$\pm$ 0,1501	0,505	$\pm$ 0,13322
BCA c	0,1913	$\pm$ 0,122	0,1893	$\pm$ 0,119	0,243	$\pm$ 0,17133
OCA c	0,1693	$\pm$ 0,102	0,1538	$\pm$ 0,0844	0,205	$\pm$ 0,30125
VC d	0,7313	$\pm$ 0,106	0,9978	$\pm$ 0,2817	1,094	$\pm$ 0,36013
ST b,d	0,7443	$\pm$ 0,127	0,7973	$\pm$ 0,1469	0,904	$\pm$ 0,06859
Ctrl - d	0,7084	$\pm$ 0,126	0,7628	$\pm$ 0,1485	1,209	$\pm$ 0,3547
Ctrl + c	0,0053	$\pm$ 0,01	0,0465	$\pm$ 0,0117	0,026	$\pm$ 0,02445

ECAc: etil-cianoacrilato convencional; ECAga: etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “a”; ECAgb: etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “b”; BCA: butil-cianoacrilato; OCA: octil-cianoacrilato; VC: adesivo tissular a base de veneno de cobra; ST: espécime sem tratamento de superfície; Ctrl -: do meio de cultura; Ctrl +: água. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tempos de avaliação ($p < 0,05$).

Houve significativa diminuição de viabilidade de FGH de todos os grupos cianoacrilatos (ECAc, ECAga, ECAgb, BCA e OCA) quando comparados ao grupo controle negativo (meio de cultura) em todos os tempos avaliados. No entanto, apesar de ECAc ter diminuído a viabilidade, este demonstrou valores comparáveis ao grupo ST, que representa a resina acrílica sem revestimentos, material utilizado amplamente em prótese totais. Já o grupo VC manteve a viabilidade das células em todos os tempos.

Figura 4- Viabilidade (em %) dos FGH após 24, 48 e 72 h em contato com os grupos experimentais (ECAC: etil-cianoacrilato convencional; ECAGa: etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “a”; ECAGb: etil-cianoacrilato em forma de gel formulação “b”; BCA: butil-cianoacrilato; OCA: octil-cianoacrilato; VC: adesivo tissular a base de veneno de cobra; ST: espécime sem tratamento de superfície; Ctrl -: do meio de cultura; Ctrl +: água *indica diferença estatística do Ctrl- (meio) e +indica diferença estatística de Ctrl +(água) ($p < 0,05$).

4.1.2 Microscópio invertido

Em todos os grupos e tempos experimentais (Figuras 6, 7 e 8), registros foram feitos por meio de microscópio invertido. Durante os três tempos experimentais, houve consistência da morfologia dos fibroblastos gengivais humanos em cada grupo. Os grupos ECAC, VC, ST apresentaram células alongadas com formato fusiforme, semelhantemente ao controle negativo (meio). Já os grupos ECAGa, ECAGb, BCA, OCA apresentaram uma quantidade bem menor de células com formato arredondado, indicando a perda da adesão das células à superfície, sugerindo morte celular e aspecto semelhantemente ao controle positivo (água).

Figura 5- Imagens feitas em microscópio invertido de fibroblastos gengivais após 24 h em contato com cada grupo: A- ECAC; B- ECAGa; C- ECAGb; D- BCA; E- OCA; F- VC; G- ST; H- meio; I- água. Aumento de 40X.

Figura 6- Imagens feitas em microscópio invertido de fibroblastos gengivais após 48 h em contato com cada grupo: A- ECAC; B- ECAGA; C- ECAGb; D- BCA; E- OCA; F- VC; G- ST; H- meio; I- água. Aumento de 40X.

Figura 7- Imagens feitas em microscópio invertido de fibroblastos gengivais após 72 h em contato com cada grupo: A- ECAC; B- ECAGa; C- ECAGb; D- BCA; E- OCA; F- VC; G- ST; H- meio; I- água. Aumento de 40X.

4.2 Avaliação do estresse oxidativo

Para a análise da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizado o ensaio por meio de sonda fluorogênica. Os valores do estresse oxidativo estão representado na tabela 3.

Tabela 3- Valores da média de unidade relativa de fluorescência (rfu) $\pm$ desvio padrão, correspondente a produção de ERO do biofilme de 24h de *C. albicans* após 1 h de contato indireto com grupos experimentais e meio de cultura (Ctrl -).

Material	ERO		
ECAc abc	5605,62	$\pm$	1560,80
ECAgb c	9525,57	$\pm$	3233,05
BCA bc	7808,34	$\pm$	4266,99
OCA abd	5573,41	$\pm$	4115,24
VC bc	6223,71	$\pm$	2321,89
ST ad	3240,67	$\pm$	868,17
Ctrl - d	3916,89	$\pm$	1411,92

Letras minúsculas diferentes ao fim das linhas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 8- Produção de espécies reativas de oxigênio. Valores de unidade relativa de fluorescência (rfu) correspondente a produção de ERO do biofilme de 24h de *C. albicans* após 1 h de contato indireto com grupos experimentais, meio de cultura (Ctrl -). *indica diferença estatística ao Ctrl- (meio) ($p < 0,05$).

Discussão

5 DISCUSSÃO

A necessidade de investigação dos produtos que pudessem auxiliar na prevenção da Estomatite Protética, surgiu a partir da observação de que esta é uma patologia prevalente (15 a 70%) entre comunidade usuária de prótese total, com um alto índice de recorrência após tratamento e possibilidade de evolução com complicações sistêmicas.

Em estudo inicial realizado por este grupo de pesquisa, observou-se que o revestimento de materiais reembasadores de PTs com ECA diminuíram a quantidade de biofilme de *C. albicans* (TÁVORA, 2011). Então, em estudo subsequente, estudou-se de forma mais abrangente os cianoacrilatos, para a investigação de qual adesivo poderia ter melhor performance como revestimento de PTs (MARCILLO, 2015). Os resultados demonstraram que houve uma característica antiaderente e de diminuição de viabilidade de *C. albicans* em contato com todos os adesivos cianoacrilato (ECAc>BCA>OCA>ECAgb). Por esta razão, como continuidade de uma investigação com o intuito de identificação e aprimoramento de um revestimento de superfícies de PTs investigamos a citotoxicidade em FGH e o estresse oxidativo que causam em células de *C. albicans*.

Para melhor entendimento e organização, a discussão foi dividida em duas partes, onde serão discutidos os ensaios realizados separadamente.

5.1 Viabilidade Celular

No presente estudo, com a finalidade de investigação da citotoxicidade de adesivos cianoacrilatos (ECAc, ECAga, ECAgb, BCA, OCA) e de um adesivo tissular a base de veneno de cobra (VC), foi realizado o teste de viabilidade celular de FGH por meio de ensaio colorimétrico MTT após 24, 48 e 72 h em contato indireto com os produtos.

O ensaio por meio de contato indireto foi o procedimento escolhido para esta investigação por eliminar os vieses que o contato direto das células com os espécimes proporciona. Assim, pudemos desconsiderar a morte celular por meio de injúrias mecânicas ou de processos exotérmicos da polimerização dos produtos (INAL *et al.*,

2006; LEGGAT; SMITH; KEDJARUNE, 2007). Até porque, por serem produtos que promovem sua ação a partir de contato, os cianoacrilatos só atingiam a completa polimerização após contato com o meio condicionado. Corroborando nossa escolha, Chaves *et al.* (2012), em revisão sistemática, observou que grande parte de ensaios celulares avaliando citotoxicidade de bases de PTs foi por contato indireto (meio condicionado) .

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que todos os produtos testados apresentam algum grau de citotoxicidade quando comparados ao controle negativo (Ctrl-; meio de cultura), com exceção do grupo que não recebeu nenhum tratamento de superfície (ST) e do grupo VC (Tabela 2).

O grupo ST foi incluído nesta investigação, justamente por ser composto apenas pela resina acrílica utilizada na confecção de PTs sem nenhum tipo de revestimento, já que se sabe que este material por si só pode causar danos à mucosa, principalmente devido à liberação de monômero residual (GAUTAM *et al.*, 2012). Dessa forma, pensou-se ser importante a comparação da citotoxicidade causada entre a resina acrílica com e sem revestimentos. Nesta investigação, foi adotada a medida indicada pela ISO 1567:1988 de manter a resina acrílica em água destilada durante 48 h para que houvesse liberação do monômero residual anteriormente à execução dos ensaios. Os resultados indicaram que o monômero residual dos espécimes foi, de fato, em sua totalidade ou perto desta, liberado, já que o grupo ST (106, 104 e 75% em 24, 48 e 72 h, respectivamente) demonstrou valores de viabilidade semelhantes ao grupo controle negativo.

O grupo VC (104, 130 e 91%), da mesma forma, não apresentou diferença de viabilidade quando comparado ao Ctrl -, indicando a ausência de citotoxicidade do material. Assim como já relatado por Barbosa *et al.* (2008) e Rahal *et al.* (2004), que observaram histologicamente que o sítio em contato com VC apresentou melhor desempenho e menor inflamação quando comparado ao com sutura convencional.

Em todos os grupos cianoacrilatos (ECAc, ECAGa, ECAGb, BCA e OCA) houve diminuição da viabilidade dos FGH quando comparados ao grupo Ctrl -. No entanto, o grupo ECAc (80, 79, 57%), apesar de ter diminuído a viabilidade dos FGH, demonstrou valores estatisticamente semelhantes ao grupo ST (106, 104, 75%) e viabilidade em torno de 80% nas primeiras 48 h. Ao passo que, os grupos ECAGa (11, 9 e 3%), BCA (27, 24 e 20 %), e OCA (23, 20, 17 %) apresentaram resultados

semelhantes estatisticamente à água destilada (Ctrl +; 1, 5 e 2 %), demonstrando um elevado grau de citotoxicidade (Tabela 2).

O ECAc, ECAGA, ECAGb são produtos que tem como base o mesmo tipo de CA, o etil-cianoacrilato, porém o ECAc tem uma formulação líquida e o ECAGA e o ECAGb tem sua formulação em gel. Observa-se que, apesar do mesmo tipo de CA, há uma discrepância muito grande na viabilidade, de modo que o ECAc (80, 79 e 58%) e ECAGb (69, 63 e 42%) são semelhantes estatisticamente, enquanto o ECAGA (11, 9, 3%) é comparável ao Ctrl + (1, 5, 2%). Resultados semelhantes foram observados por Azevedo, Marques e Bombana (2003) ao investigarem duas marcas comerciais de ECA (Super Bonder® e Ultrabond®) (AZEVEDO; MARQUES; BOMBANA, 2003). Os autores perceberam que apesar dos dois produtos serem biocompatíveis, o Super Bonder® se comportou de forma semelhante ao grupo controle, enquanto o Ultrabond® demonstrou uma maior citotoxicidade, nos levando ao entendimento de que a cadeia molecular lateral do CA do material talvez não seja o principal determinante da sua toxicidade. Sabe-se que, quanto menor a cadeia lateral do cianoacrilato mais subprodutos, como o formaldeído e cianoacetato, são liberados no processo de degradação de maneira mais acelerada, e conseqüentemente, maior é a sua toxicidade (LENAERTS *et al.*, 1984; MULLER *et al.*, 1990; LEGGAT; SMITH; KEDJARUNE, 2007). No entanto, visando modificações na força de adesão, viscosidade, flexibilidade e tempo de polimerização, cada marca comercial adiciona em seus produtos aditivos químicos, como iniciadores e plastificantes, possivelmente explicando as diferenças de citotoxicidade entre produtos com o mesmo tipo de CA como base (SINGER; QUINN; HOLLANDER, 2008).

Em pesquisas mais antigas, era comum a constatação da relação direta entre o tamanho da cadeia lateral e a citotoxicidade do produto (TSENG *et al.*, 1990; CIAPETTI *et al.*, 1994b). No entanto, atualmente, como os resultados deste estudo apontam, esta relação não é mais tão evidente (da menor para a maior toxicidade: ECAc<ECAGb<BCA<OCA<ECAGA).

Semelhantemente aos nossos resultados, Landergren *et al.* (2010) observaram que em 24 h de contato com ECA (Evobond®), houve morte celular de apenas 11,3 % das células de linhagem neuronal SH-SY5Y. Assim, como de Melo *et al.* (2013) que

relataram citotoxicidade do ECA em osteoblastos de cultura primária semelhante ao controle. No entanto, a literatura não é homogênea quanto a citotoxicidade do ECA. Ciapetti *et al.* (1994a) observaram em cultura células de fibroblastos L929 e linfócitos humanos a grande citotoxicidade do ECA. E em avaliação em animais, Moretti Neto *et al.* (2008), observaram uma inflamação significativa na presença de ECA.

Na mesma investigação em que Azevedo, Marques e Bombana (2003) observaram a diferença de citotoxicidade entre as duas marcas comerciais de ECA (Super Bonder® e Ultrabond®), os autores relataram a capacidade do BCA (Hystoacryl®) de manter a viabilidade das células. Estes resultados vão de encontro aos nossos, em que o BCA (TekBond® 932) apresentou uma diminuição significativa da viabilidade das células (27, 24 e 20%). A formulação fornecida pelos fabricantes dessas duas marcas comerciais de BCA é semelhante. No entanto, as finalidades dos dois produtos são distintas. O Hystoacryl® é um adesivo cirúrgico utilizado comumente em cirurgias dermatológicas, já o TekBond 932 é utilizado como adesivo para uso doméstico. Essa diferença de citotoxicidade pode ser devido, em parte, à maior presença de impurezas ou componentes ainda não elucidados em produtos com finalidades domésticas, quando comparados àqueles com finalidade médica. Torna-se difícil afirmar algo mais concreto visto que a composição destes produtos não é bem descrita pelos fornecedores, o que representa muitas vezes um sigilo profissional.

No entanto, não se pode afirmar que por ser um material de uso médico ele não apresente potencial tóxico. Schneider e Otto (2012) observaram uma drástica diminuição de viabilidade dos fibroblastos de ratos NIH 3T3 em contato indireto com Hystoacryl® por 24 h e 4 dias (33 e 27 %, respectivamente). Uma possível explicação para esses resultados divergentes, pode ser pela metodologia diferente e quantidade de material utilizado. Azevedo, Marques e Bombana (2003) fizeram o ensaio com contato direto com uma lamínula de vidro revestida pelo ECA, sem indicação de quantidade de material, Schneider e Otto (2012) realizaram o ensaio por contato indireto com a concentração de 0,2 g/mL do produto. Enquanto em nosso estudo, obedeceu-se a norma que rege testes em biomateriais (ISO 10993-12), que indica a realização da extração na concentração de 3 cm²/mL, na qual para um espécime de tamanho 10 mm X 10 mm X 3 mm, o meio de cultura para a extração deve ter um volume de 1, 066 mL. Os espécimes do nosso trabalho, receberam 2 camadas finas

dos produtos, espalhadas com auxílio de um pincel. Dessa forma, a concentração utilizada em cada estudo pode ter influência na citotoxicidade.

Montanaro *et al.* (2001) verificaram essa relação direta entre a diluição dos extratos e a citotoxicidade, quando observaram que dois adesivos cirúrgicos à base de ECA e BCA e somente o BCA (Glubran e Glubran 2, respectivamente) demonstraram citotoxicidade significativa com extratos não diluídos (seguindo as normas ISO 10993-12) e diluído a 1:2, enquanto o extrato diluído a 1:10 apresentou viabilidade de células superior a 70%.

O grupo OCA, neste estudo, é composto por um adesivo cirúrgico aprovado pela ANVISA e amplamente utilizado, o Dermabond® (LEGGAT; SMITH; KEDJARUNE, 2007; LINS *et al.*, 2012). No entanto, o resultado da citotoxicidade desse grupo se mostrou controverso, já que seus valores (23, 20 e 17 %) foram equivalentes estatisticamente aos do grupo Ctrl +. O OCA, devido a sua ampla utilização clínica, muitas vezes é considerado como um parâmetro-controle de citotoxicidade. Como relata Lee *et al.* (2013), que ao investigar a citotoxicidade de um novo adesivo cirúrgico desenvolvido (alil-cianoacrilato; PACA), o compara com os resultados do OCA. Os autores observaram que em contato indireto na concentração de 5 µL/mL, o OCA apresentou viabilidade celular maior do que 80%. Levantando, novamente, a questão da diferença de concentração do produto, já que a quantidade utilizada por Lee *et al.* (2013) foi de 5 µL/mL e em nosso estudo, em 1,066 mL a quantidade de produto foi de aproximadamente 100 µL, já que os espécimes receberam 2 camadas com aproximadamente 50 µL cada uma, conforme a ISO 10993-12 (3 cm²/mL).

De forma semelhante aos nossos resultados, Nitsch *et al.* (2005) observaram uma maior toxicidade do OCA (Dermabond®) quando comparado ao ECA (Epiglu®) e ao BCA (Histoacryl®) em investigação *in vitro* de contato direto e indireto, com diluições de 1:1 a 1:512. Contudo, quando os autores avaliaram as características histomorfológicas em incisões tratadas com OCA em animais (mini porcos), não observaram evidência de histotoxicidade. Assim como Maw *et al.* (2000), que observaram que apesar da reação de corpo estranho de leve a moderada em animais em contato com OCA, não houve evidências de ulceração ou necrose da mucosa.

Ao analisar o crescimento celular nos períodos de 24, 48 e 72 h de avaliação deste estudo, observou-se uma tendência descendente da viabilidade celular em todos os grupos experimentais (tabela 2 e figura 4). Contrariamente aos nossos resultados, Azevedo, Marques e Bombana (2003), em investigação a longo prazo (1, 3, 5 e 7 dias), observaram que o grupo Super Bonder® (ECA), que inicialmente, não apresentava viabilidade favorável de células (menor do que 70%), a partir do dia 5, teve um aumento e se equiparou ao controle, indicando uma característica transitória da citotoxicidade deste produto. No entanto, nossa investigação se limitou ao 3º dia de contato com os produtos, provavelmente a transitoriedade da citotoxicidade seja aparente em períodos de avaliação maiores.

Da mesma forma, Landegren *et al.* (2010) observaram a transitoriedade da citotoxicidade de cianoacrilatos (ECA-Evobond®; BCA-Histoacryl®) em contato direto com células de linhagem neuronal SH-SY5Y por 1, 7, 14 e 28 dias através da detecção de morte celular por liberação de cromo radioativo (^{51}Cr). Houve uma diminuição de morte celular de 11,3 para 1,2 % no ECA e de 15,6 para 0,9 % no grupo BCA, quando avaliados os períodos de 1 e 14 dias, respectivamente. A partir da segunda semana, a citotoxicidade continuou diminuindo mas em ritmo mais lento e no 28º dia, já não havia diferença entre os grupos cianoacrilatos e o controle.

A avaliação da citotoxicidade é um procedimento inicial para a verificação da biocompatibilidade de biomateriais. Os resultados desse ensaio *in vitro* trazem indícios de como cada produto tende a agir. No entanto, estudos mais abrangentes *in vivo*, visando o contato com a mucosa bucal íntegra, devem ser realizados.

No sentido de limitar a quantidade de grupos para o ensaio subsequente, consideramos manter apenas um ECA em forma de gel. Então, avaliando os resultados da citotoxicidade de ECAGA, decidimos por manter apenas o ECAGB para o ensaio de estresse oxidativo (ERO).

5.2 Estresse Oxidativo

Para avaliar de que forma os produtos experimentais dessa pesquisa influenciam às células de *C. albicans* quando organizadas em biofilme, foi realizado o ensaio de estresse oxidativo. Os resultados (tabela 3 e figura 8) demonstraram que a produção de ERO por *C. albicans* causada pelos cianoacrilatos e pelo VC, com

exceção do OCA, foram significativamente maiores do que as causadas pelo meio de cultura (controle negativo; Ctrl -), indicando a indução de estresse oxidativo. Não há indícios na literatura de que qualquer produto testado nesta pesquisa tenha sido investigado quanto ao estresse oxidativo induzido em biofilme de *C. albicans*. Por esta razão, apenas comparações indiretas podem ser estabelecidas.

A real função das espécies reativas de oxigênio, principalmente em biofilmes, ainda não foi totalmente esclarecida. Acredita-se que a liberação controlada de ERO pode desempenhar um papel importante na sinalização intracelular (DROGE, 2002). No entanto, quando há uma liberação descontrolada e grande acúmulo intracelular destes compostos, estes causam o estresse oxidativo, podendo levar até morte celular (MESA-ARANGO *et al.*, 2014).

A qualidade fungicida de certos produtos, como anfotericina B, depende em grande parte da indução da produção de ERO. Quando esta produção é suprimida, o poder fungicida deste medicamento declina significativamente (MESA-ARANGO *et al.*, 2014; LIAO *et al.*, 2015). Ainda assim, os valores da produção de ERO não podem ser relacionados diretamente ao efeito fungicida do produto testado. Como verificaram Mesa-arango *et al.* (2014), em estudo que observou uma menor produção de ERO pela espécie *C. tropicalis* quando em contato com um antifúngico, mesmo esta espécie mostrando susceptibilidade similar a diferentes espécies de *Candida*. Os autores atribuíram este resultado às diferenças na membrana e na composição da parede celular entre as espécies de *Candida* (MESA-ARANGO *et al.*, 2014). No presente estudo, apenas *C. albicans* foi utilizada.

O grupo OCA apresentou os menores valores de produção de ERO entre os cianoacrilatos (OCA<ECAc<BCA<ECAgb). No entanto, os seus valores de citotoxicidade se mostraram os mais elevados, atrás apenas do ECAGA (ECAc<ECAgb<BCA<OCA<ECAGA). Tanto o poder de indução de ERO como a citotoxicidade podem ser, em grande parte, decorrentes da liberação de subprodutos da degradação do adesivo. Acredita-se que talvez, os subprodutos do OCA possam ser mais letais aos FGH do que às células de *Candida*, principalmente devido a presença da parede celular no fungo e às características de proteção do biofilme. Sabe-se que biofilmes de *C. albicans* de 24h de desenvolvimento, como utilizado

neste estudo, tem presente na matriz extracelular a proteína β -1-3-glucan que funciona como proteção física para as células (NETT *et al.*, 2010). Além disso, biofilmes possuem um sistema antioxidante mais eficiente e bem delineado do que células planctônicas (DELATTIN; CAMMUE; THEVISSSEN, 2014; KOS *et al.*, 2016).

De forma inversa, ocorreram com os resultados de VC. Esse grupo, teoricamente, deveria causar uma menor produção de ERO, já que em resultados de estudo prévio ainda não publicado, não diminui a contagem de colônias e nem o metabolismo do biofilme de *C. albicans* (MARCILLO, 2015). Não sabemos a razão pela qual há indução de produção de ERO neste grupo. No entanto, sabe-se que por ser um composto orgânico, há a possibilidade de algum dos produtos que o compõe estimular a produção de ERO. Sabe-se que a trombina estimula a produção de ERO em plaquetas (BEGONJA *et al.*, 2005; BAKDASH; WILLIAMS, 2008). No entanto, na literatura, não há relatos quanto o seu efeito em *C. albicans*. Investigações dos compostos individuais do VC devem ser realizadas para que possamos ter uma melhor entendimento.

Após o desenvolvimento do biofilme de 24 h, os produtos experimentais e o controle negativo ficaram em contato com as células durante 1 h. Esse tempo de contato foi escolhido principalmente com a finalidade de minimizar o efeito sobre a viabilidade das células que alguns produtos apresentam. Ainda assim, caso algum produto causasse diminuição da contagem de células foi adotada a normalização dos valores pela contagem de unidades formadoras de colônias de cada grupo, como descreve Liao *et al.* 2015. Além disso, as espécies reativas de oxigênio possuem uma característica instável, em que as horas iniciais após o contato são as mais representativas, como observam Komalapriya *et al.* (2015) que identificaram a dispersão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie reativa de oxigênio, após 60 min em meio de cultura.

De forma geral, o cianoacrilato mais promissor segundo os resultados dessa pesquisa, é o ECAC, por demonstrar uma biocompatibilidade aceitável, comparável a resina acrílica por si só. Além disso, o ECAC é um material viável de fácil aquisição e de baixo custo, o que é coerente, já que a maioria dos usuários de PTs a utilizam por ser um tratamento comparativamente mais barato. Apesar de se mostrar um material não citotóxico no presente estudo, o VC talvez seja melhor utilizado quando empregado como carreador de medicamentos para o tratamento da EP, considerando

os seus resultados negativos de antiaderência de *C. albicans* em estudo prévio (MARCILLO 2015).

Como uma continuação da investigação dos materiais para revestimentos de PTs, considerando principalmente os cianoacrilatos que obtiveram melhores resultados na viabilidade celular, estudos futuros podem abranger a avaliação das características físico-químicas e a degradação de termociclagem, assim como frente a desafios químicos e mecânicos. E num estágio final, estabelecer parcerias com empresas para desenvolver um produto voltado para a utilização clínica como revestimento de superfície e que atenda às necessidades da população usuária de PTs.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia e limitações deste estudo *in vitro* pode-se concluir que:

Os cianoacrilatos apresentaram diferentes graus de citotoxicidade sobre fibroblastos gengivais humanos. O OCA, BCA e o ECAGa foram os que apresentaram maior citotoxicidade, o ECAGb e ECAC apresentaram menor citotoxicidade. Já o VC não comprometeu a viabilidade dos fibroblastos gengivais.

A citotoxicidade de todos os grupos apresentou uma característica ascendente durante os tempos avaliados.

Todos os grupos experimentais causaram estresse oxidativo em células de biofilme de *C. albicans*.

Referências

Al-Belasy FA, Amer MZ. Hemostatic effect of n-butyl-2-cyanoacrylate (histoacryl) glue in warfarin-treated patients undergoing oral surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Dec;61(12):1405-9.

Al-Dwairi ZN, Al-Quran FA, Al-Omari OY. The effect of antifungal agents on surface properties of poly(methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res*. 2012 Oct;56(4):272-80.

Alavarce RA, Saldanha LL, Almeida NL, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. The Beneficial Effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015 2015(939625).

Ali AA, Alharbi FA, Suresh CS. Effectiveness of coating acrylic resin dentures on preventing *Candida* adhesion. *J Prosthodont*. 2013 Aug;22(6):445-50.

Allison RT, Douglas WH. Micro-colonization of the denture-fitting surface by *Candida albicans*. *J Dent*. 1973 Jun;1(5):198-201.

Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S, et al. Clinical and Histological Findings of Denture Stomatitis as Related to Intraoral Colonization Patterns of *Candida albicans*, Salivary Flow, and Dry Mouth. *Journal of Prosthodontics-Implant Esthetic and Reconstructive Dentistry*. 2013 Jan;22(1):13-22.

Amarante MT, Constantinescu MA, O'Connor D, Yaremchuk MJ. Cyanoacrylate fixation of the craniofacial skeleton: an experimental study. *Plast Reconstr Surg*. 1995 Apr;95(4):639-46.

Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):6023-31.

Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr;54(8):1110-22.

Arai T, Ueda T, Sugiyama T, Sakurai K. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. *J Oral Rehabil*. 2009 Dec;36(12):902-8.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987 May;14(3):217-27.

Azevedo C, Marques M, Bombana A. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials. An in vitro analysis. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 17(2):113-8.

Azevedo MS, Correa MB, Azevedo JS, Demarco FF. Dental prosthesis use and/or need impacting the oral health-related quality of life in Brazilian adults and elders: Results from a National Survey. *J Dent*. 2015 Dec;43(12):1436-41.

Bakdash N, Williams MS. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jul 15;45(2):158-66.

Barbizan R, Castro MV, Rodrigues AC, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira AL. Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *PLoS One*. 2013 8(5):e63260.

Barbosa FI, Correa DS, Zenobio EG, Costa FO, Shibli JA. Dimensional changes between free gingival grafts fixed with ethyl cyanoacrylate and silk sutures. *J Int Acad Periodontol*. 2009 Apr;11(2):170-6.

Barbosa MDS, Gregh SLA, Passanezi E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *Journal of Periodontology*. 2007 Oct;78(10):2026-31.

Barbosa MDS, Stipp AC, Passanezi E, Greghi SLA. Fibrin Adhesive Derived from Snake Venom in Periodontal Surgery. *Histological analysis. Journal of Applied Oral Science*. 2008 Sep-Oct;16(5):310-5.

Barkhordar RA, Javid B, Abbasi J, Watanabe LG. Cyanoacrylate as a retrofilling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988 Apr;65(4):468-73.

Barros LC, Ferreira RS, Jr., Barraviera SR, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ, et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009 Oct;12(8):553-71.

Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, et al. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates α IIb β 3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2757-60.

Benitez SU, Barbizan R, Spejo AB, Ferreira RS, Jr., Barraviera B, Goes AM, et al. Synaptic plasticity and sensory-motor improvement following fibrin sealant dorsal root reimplantation and mononuclear cell therapy. *Front Neuroanat*. 2014 8(96).

Bhaskar SN, Cutright DE. Healing of skin wounds with butyl cyanoacrylate. *J Dent Res*. 1969 Mar-Apr;48(2):294-7.

Bhaskar SN, Frisch J. Use of cyanoacrylate adhesives in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 1968 Oct;77(4):831-7.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2008 May;8(3):442-50.

Bourlidi S, Qureshi J, Soo S, Petridis H. Effect of different initial finishes and Parylene coating thickness on the surface properties of coated PMMA. *J Prosthet Dent*. 2016 Mar;115(3):363-70.

Brennan M. Fibrin glue. *Blood Rev*. 1991 Dec;5(4):240-4.

Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Buchaim DV, Rosa Junior GM, et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury*. 2015 Apr;46(4):655-60.

Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974 82(2):151-90.

Bulad K, Taylor RL, Verran J, McCord JF. Colonization and penetration of denture soft lining materials by *Candida albicans*. *Dent Mater*. 2004 Feb;20(2):167-75.

Cao Y, Dai B, Wang Y, Huang S, Xu Y, Cao Y, et al. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Jul;32(1):73-7.

Capistrano HM, de Assis EM, Leal RM, Alvarez-Leite ME, Brener S, Bastos EM. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013 2013(947980).

Catalan A, Pacheco JG, Martinez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Mar;105(3):327-32.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001a Sep;183(18):5385-94.

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*. 2001b Mar;80(3):903-8.

Chaves CA, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2012 Feb;107(2):114-27.

Chen WL, Lin CT, Hsieh CY, Tu IH, Chen WY, Hu FR. Comparison of the bacteriostatic effects, corneal cytotoxicity, and the ability to seal corneal incisions among three different tissue adhesives. *Cornea*. 2007 Dec;26(10):1228-34.

Chiquito GCM. Comparison between suture and fibrin adhesive derived from snake venom for fixation of connective tissue graft in correction of marginal tissue

recession. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2007 13(2):559-.

Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Sudanese A, Marraro D, Toni A, et al. Cytotoxicity Testing of Cyanoacrylates Using Direct-Contact Assay on Cell-Cultures. *Biomaterials*. 1994a Jan;15(1):63-7.

Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Sudanese A, Marraro D, Toni A, et al. Toxicity of cyanoacrylates in vitro using extract dilution assay on cell cultures. *Biomaterials*. 1994b Jan;15(2):92-6.

Cobb AR, Ahmad S, Kumar M. Use of n-butyl 2-cyanoacrylate tissue adhesive to splint traumatised teeth in the emergency department. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Sep;49(6):483-5.

Cochis A, Fracchia L, Martinotti MG, Rimondini L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Jun;113(6):755-61.

Coleman DC, Bennett DE, Sullivan DJ, Gallagher PJ, Henman MC, Shanley DB, et al. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. *Crit Rev Microbiol*. 1993 19(2):61-82.

Coover HW, Joyner FB, Jr NHS, Jr THW. Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesive. *J Soc Plast Eng*. 1959 15(4):13-17.

Costa SF, Marinho I, Araujo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect*. 2000 May;45(1):69-72.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995 49(1):11-45.

Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci*. 2007 64(4):180-9.

Craven NM, Telfer NR. An open study of tissue adhesive in full-thickness skin grafting. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Apr;40(4):607-11.

da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*. 2011 Nov;54(6):e712-7.

da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008 19(4):364-9.

da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jul;94(1):149-56.

Dantas Ada S, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*. 2015 5(1):142-65.

de Albuquerque DS, Gominho LF, Dos Santos RA. Histologic evaluation of pulpotomy performed with ethyl-cyanoacrylate and calcium hydroxide. *Braz Oral Res*. 2006 Jul-Sep;20(3):226-30.

de Barros CN, Miluzzi Yamada AL, Junior RS, Barraviera B, Hussni CA, de Souza JB, et al. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair- Experimental study and preliminary results. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016 Jul;241(13):1410-5.

De Melo WM, Maximiano WM, Antunes AA, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT. Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Jan;71(1):35-41.

de Oliveira Neto PJ, Cricchio G, Hawthorne AC, Okamoto R, Sennerby L, Lungren S, et al. Tomographic, histological, and immunohistochemical evidences on the use of N-butyl-2-cyanoacrilate for onlay graft fixation in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Dec;14(6):861-71.

Delattin N, Cammue BP, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem*. 2014 Jan;6(1):77-90.

Dikbas I, Koksall T, Calikkocaoglu S. Investigation of the cleanliness of dentures in a university hospital. *Int J Prosthodont*. 2006 May-Jun;19(3):294-8.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep;8(9):881-90.

Douglas LJ. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *Crit Rev Microbiol*. 1987 15(1):27-43.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol*. 1998 Dec;43(12):999-1007.

Ercalik-Yalcinkaya S, Ozcan M. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *Journal of Prosthodontics-Implant Esthetic and Reconstructive Dentistry*. 2015 Jun;24(4):271-8.

Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods*. 2011 Aug;86(2):238-42.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical M, Infectious D. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect*. 2000 Sep;6(9):509-15.

Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012 8(4):e1002585.

Ferreira AS, Barraviera B, Barraviera SR, Abbade LP, Caramori CA, Ferreira RS, Jr. A success in Toxinology translational research in Brazil: bridging the gap. *Toxicon*. 2013 Jul;69(50-4).

Frade JP, Arthington-Skaggs BA. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. *Mycoses*. 2011 Jul;54(4):e154-62.

Frenkel H, Harvey I, Newcombe RG. Improving oral health in institutionalised elderly people by educating caregivers: a randomised controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2001 Aug;29(4):289-97.

Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga FC, Oliveira ALR, Simoes GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014 Jun 10;5(

Gatti M, Vieira L, Barraviera B, Barraviera S. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2011 17(2):226-9.

Gautam R, Singh RD, Sharma VP, Siddhartha R, Chand P, Kumar R. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. 2012 Jul;100B(5):1444-50.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011 Jun;20(4):251-60.

Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*. 1984 198(1):179-82.

Gosain AK, Lyon VB, Plastic Surgery Educational Foundation DC. The current status of tissue glues: part II. For adhesion of soft tissues. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Nov;110(6):1581-4.

Grimoud AM, Lodter JP, Marty N, Andrieu S, Bocquet H, Linas MD, et al. Improved oral hygiene and *Candida* species colonization level in geriatric patients. *Oral Dis*. 2005 May;11(3):163-9.

Hahnel S, Ettl T, Gosau M, Rosentritt M, Handel G, Burgers R. Influence of saliva substitute films on the initial adhesion of *Candida albicans* to dental substrata prior to and after artificial ageing. *Arch Oral Biol*. 2010 May;55(5):391-6.

Harada RN, Pressler VM, McNamara JJ. Fibrin glue reduces seroma formation in the rat after mastectomy. *Surg Gynecol Obstet*. 1992 Nov;175(5):450-4.

Hazen KC, Glee PM. Cell surface hydrophobicity and medically important fungi. *Curr Top Med Mycol*. 1995 6(1-31).

Inal S, Yilmaz N, Nisbet C, Guvenc T. Biochemical and histopathological findings of N-butyl-2-cyanoacrylate in oral surgery: an experimental study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Dec;102(6):e14-7.

Iuan FC, Thomazini IA, Gianini MJ, Viterbo F, Toscano E, Moraes RA, et al. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. *Sao Paulo Med J*. 1995 Sep-Oct;113(5):1000-2.

Jacobina M. Formação do biofilme de *Candida albicans* na superfície de uma resina acrílica termopolimerizável tratada com polimento líquido [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de bauru/USP; 2012.

Jones DS, McGovern JG, Woolfson AD, Gorman SP. The effects of hexetidine (Oraldene) on the adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in vitro and ex vivo and on in vitro morphogenesis. *Pharm Res*. 1997 Dec;14(12):1765-71.

Kamikawa Y, Fujisaki J, Nagayama T, Kawasaki K, Hirabayashi D, Hamada T, et al. Use of *Candida*-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of *Candida* to denture base materials: prevention of denture stomatitis. *Gerodontology*. 2016 Sep;33(3):342-7.

Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, et al. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May;57(5):2226-30.

Kang SH, Lee HJ, Hong SH, Kim KH, Kwon TY. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Candida albicans* to various denture lining materials. *Acta Odontol Scand*. 2013 Jan;71(1):241-8.

Kim YM, Gupta BK. 2-octyl cyanoacrylate adhesive for conjunctival wound closure in rabbits. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2003 May-Jun;40(3):152-5.

Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985 Oct;50(1):97-101.

Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozawa S, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Oct;46(10):3113-7.

Koch C, Burgers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology*. 2013 Dec;30(4):309-13.

Komalapriya C, Kaloriti D, Tillmann AT, Yin Z, Herrero-de-Dios C, Jacobsen MD, et al. Integrative Model of Oxidative Stress Adaptation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS One*. 2015 10(9):e0137750.

Kos I, Patterson MJ, Znaidi S, Kaloriti D, da Silva Dantas A, Herrero-de-Dios CM, et al. Mechanisms Underlying the Delayed Activation of the Cap1 Transcription Factor in *Candida albicans* following Combinatorial Oxidative and Cationic Stress Important for Phagocytic Potency. *MBio*. 2016 7(2):

Kucharikova S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdakova H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol*. 2011 Sep;60(Pt 9):1261-9.

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.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Dec;5(6):608-11.

Landegren T, Risling M, Persson JK, Sonden A. Cyanoacrylate in nerve repair: transient cytotoxic effect. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jul;39(7):705-12.

Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DM, Vergani CE. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Arch Oral Biol*. 2013 Jan;58(1):1-9.

Lee YJ, Jung GB, Choi S, Lee G, Kim JH, Son HS, et al. Biocompatibility of a novel cyanoacrylate based tissue adhesive: cytotoxicity and biochemical property evaluation. *PLoS One*. 2013 8(11):e79761.

Leggat PA, Smith DR, Kedjarune U. Surgical applications of cyanoacrylate adhesives: a review of toxicity. *Anz Journal of Surgery*. 2007 Apr;77(4):209-13.

Lenaerts V, Couvreur P, Christiaens-Leyh D, Joiris E, Roland M, Rollman B, et al. Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials*. 1984 Mar;5(2):65-8.

Lerner R, Binur NS. Current status of surgical adhesives. *J Surg Res*. 1990 Feb;48(2):165-81.

Liao Z, ZhangGuan X, Zhu Z, Yao X, Yang Y, Jiang Y, et al. Enhancement of the antibiofilm activity of amphotericin B by polyamine biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jul;46(1):45-52.

Lim JI, Lee WK. Enhanced biocompatibility and adhesive properties by aromatic amino acid-modified allyl 2-cyanoacrylate-based bio-glue. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Oct 1;122(669-73.

Lins RDAU, Gomes RCB, dos Santos KSA, da Silva PV, da Silva RTM, Ramos IA. Use of cyanoacrylate in the coaptation of edges of surgical wounds. *Anais Brasileiros De Dermatologia*. 2012 Nov-Dec;87(6):871-6.

Liu J, Du X, Chen J, Hu L, Chen L. The induction expression of human beta-defensins in gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1415-21.

Lu Y, Su C, Liu H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends Microbiol*. 2014 Dec;22(12):707-14.

Malakhov A, Wen J, Zhang BX, Wang H, Geng H, Chen XD, et al. Rechargeable anticandidal denture material with sustained release in saliva. *Oral Dis*. 2016 Jul;22(5):391-8.

Marcillo O. Anti-adherent and antifungal activity of synthetic and organic adhesive polymers on *Candida albicans* biofilms. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo; 2015.

Marin Zuluaga DJ, Gomez Velandia OC, Rueda Clauijo DM. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. *Gerodontology*. 2011 Dec;28(4):258-63.

Matsumoto T, Hardaway RM, 3rd, Pani KC, Margetis PM. Disposable aerosol tissue adhesive spray. *Arch Surg*. 1967 Oct;95(4):685-8.

- Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *J Dent*. 1997 Sep;25(5):373-7.
- Maw JL, Kartush JM, Bouchard K, Raphael Y. Octylcyanoacrylate: a new medical-grade adhesive for otologic surgery. *Am J Otol*. 2000 May;21(3):310-4.
- Mayahara M, Kataoka R, Arimoto T, Tamaki Y, Yamaguchi N, Watanabe Y, et al. Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J Investig Clin Dent*. 2014 Nov;5(4):307-12.
- Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Roman E, Sanchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Nov;58(11):6627-38.
- Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relined resin. *J Prosthodont*. 2008 Jun;17(4):312-7.
- Mizrahi B, Stefanescu CF, Yang C, Lawlor MW, Ko D, Langer R, et al. Elasticity and safety of alkoxyethyl cyanoacrylate tissue adhesives. *Acta Biomater*. 2011 Aug;7(8):3150-7.
- Montanaro L, Arciola CR, Cenni E, Ciapetti G, Savioli F, Filippini F, et al. Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use. *Biomaterials*. 2001 Jan;22(1):59-66.
- Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK, Jr., Reed SD. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 May;28(5):433-5.
- Moretti Neto RT, Mello I, Moretti AB, Robazza CR, Pereira AA. In vivo qualitative analysis of the biocompatibility of different cyanoacrylate-based adhesives. *Braz Oral Res*. 2008 Jan-Mar;22(1):43-7.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- Muller RH, Lherm C, Herbort J, Couvreur P. In vitro model for the degradation of alkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials*. 1990 Oct;11(8):590-5.

- Nawasrah A, AlNimr A, Ali AA. Antifungal Effect of Henna against *Candida albicans* Adhered to Acrylic Resin as a Possible Method for Prevention of Denture Stomatitis. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 May 23;13(5):
- Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil*. 2008 Nov;35(11):836-46.
- Nett JE, Andes DR. Fungal Biofilms: In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs. *Microbiol Spectr*. 2015 Jun;3(3):
- Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis*. 2010 Jul 1;202(1):171-5.
- Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *Br Dent J*. 1962 112(357-60).
- Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent*. 1992 Nov;68(5):804-8.
- Nikawa H, Jin C, Makihiro S, Hamada T, Samaranayake LP. Susceptibility of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-positive patients to histatin-5. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 2002 Sep;88(3):263-7.
- Nitsch A, Pabyk A, Honig JF, Verheggen R, Merten HA. Cellular, histomorphologic, and clinical characteristics of a new octyl-2-cyanoacrylate skin adhesive. *Aesthetic Plast Surg*. 2005 Jan-Feb;29(1):53-8.
- O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *PLoS One*. 2015 Sep 14;10(9):
- O'Donnell LE, Smith K, Williams C, Nile CJ, Lappin DF, Bradshaw D, et al. Dentures are a Reservoir for Respiratory Pathogens. *J Prosthodont*. 2016 Feb;25(2):99-104.
- Oliveira DG. Estudo *in vitro* da formação do biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica termopolimerizável revestida por nanopartículas de dióxido de silício [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia/USP; 2013.
- Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam WC, Samaranayake LP. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):46-64, Table of Contents.
- Park SE, Blissett R, Susarla SM, Weber HP. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. *J Prosthodont*. 2008 Jul;17(5):365-9.

Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007 May-Jun;20(3):308-10.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008 Mar-Apr;16(2):86-94.

Perez M, Fernandez I, Marquez D, Bretana RM. Use of N-butyl-2-cyanoacrylate in oral surgery: biological and clinical evaluation. *Artif Organs*. 2000 Mar;24(3):241-3.

Petersen B, Barkun A, Carpenter S, Chotiprasidhi P, Chuttani R, Silverman W, et al. Tissue adhesives and fibrin glues. *Gastrointest Endosc*. 2004 Sep;60(3):327-33.

Pineros-Fernandez A, Rodeheaver PF, Rodeheaver GT. Octyl 2-cyanoacrylate for repair of peripheral nerve. *Ann Plast Surg*. 2005 Aug;55(2):188-95.

Pinto LdR. Efeito da desinfecção química sobre a microdureza e rugosidade superficial de resinas para base de dentaduras e resinas rígidas para reembasamento: Estudo longitudinal. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru 2007.

Rahal S, Amaral M, Pai V, Barraviera S, Caporali E, Crocci A. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2004 10(2):161-72.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jul;98(1):53-9.

Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001 Dec;18(4):163-70.

Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 May;107(5):669-72.

Sartori EA, Schmidt CB, Walber LF, Shinkai RS. Effect of microwave disinfection on denture base adaptation and resin surface roughness. *Braz Dent J*. 2006 17(3):195-200.

Saska S, Gaspar AM, Hochuli-Vieira E. [Cyanoacrylate adhesives for the synthesis of soft tissue]. *Anais Brasileiros De Dermatologia*. 2009 Nov-Dec;84(6):585-92.

Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, Gabrielli MF, Capela MV, Gabrielli MA. Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Feb;38(2):180-6.

Schneider G, Otto K. In vitro and in vivo studies on the use of Histoacryl((R)) as a soft tissue glue. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012 Jul;269(7):1783-9.

Shepherd MG. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidosis. *N Z Dent J*. 1986 Jul;82(369):78-81.

Shirley KP, Windsor LJ, Eckert GJ, Gregory RL. In Vitro Effects of Plantago Major Extract, Aucubin, and Baicalein on Candida Albicans Biofilm Formation, Metabolic Activity, and Cell Surface Hydrophobicity. *J Prosthodont*. 2015 Nov 30;

Silva MJ, de Oliveira DG, Marcillo OO, Neppelenbroek KH, Lara VS, Porto VC. Effect of denture-coating composite on Candida albicans biofilm and surface degradation after disinfection protocol. *Int Dent J*. 2016 Apr;66(2):86-92.

Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont*. 2006 May-Jun;19(3):288-93.

Singer AJ, Hollander JE, Valentine SM, Turque TW, McCuskey CF, Quinn JV. Prospective, randomized, controlled trial of tissue adhesive (2-octylcyanoacrylate) vs standard wound closure techniques for laceration repair. *Stony Brook Octylcyanoacrylate Study Group. Acad Emerg Med*. 1998 Feb;5(2):94-9.

Singer AJ, Quinn JV, Hollander JE. The cyanoacrylate topical skin adhesives. *American Journal of Emergency Medicine*. 2008 May;26(4):490-6.

Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: a research composition and update. *J Prosthodont*. 2014 Jun;23(4):284-90.

Stolf H. The use of fibrin adhesive derived from snake venom and the evaluation of skin grafting using skin from the patient's nasolabial fold. *J Venom Anim Toxins*. 1999 5(227).

Sun X, Cao Z, Yeh CK, Sun Y. Antifungal activity, biofilm-controlling effect, and biocompatibility of poly(N-vinyl-2-pyrrolidinone)-grafted denture materials. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Oct 1;110(96-104).

Távora FFF. Efeito do etil-cianoacrilato (Super Bonder) e do polidor líquido de baixa viscosidade (Biscover) sobre biofilme de Candida albicans em resina acrílica para reembasamento. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo; 2011.

Taylor GW, Loesche WJ, Terpenning MS. Impact of oral diseases on systemic health in the elderly: diabetes mellitus and aspiration pneumonia. *J Public Health Dent.* 2000 Fall;60(4):313-20.

Thumwanit V, Kedjarune U. Cytotoxicity of polymerized commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aust Dent J.* 1999 Dec;44(4):248-52.

Tse R, Ko JH. Nerve glue for upper extremity reconstruction. *Hand Clin.* 2012 Nov;28(4):529-40.

Tseng YC, Tabata Y, Hyon SH, Ikada Y. In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method. *J Biomed Mater Res.* 1990 Oct;24(10):1355-67.

Tsutsumi C, Takakuda K, Wakabayashi N. Reduction of Candida biofilm adhesion by incorporation of prereacted glass ionomer filler in denture base resin. *J Dent.* 2016 Jan;44(37-43).

Uludamar A, Ozyesil AG, Ozkan YK. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. *Gerodontology.* 2011 Jun;28(2):104-10.

Vastani A, Maria A. Healing of Intraoral Wounds Closed Using Silk Sutures and Isoamyl 2-Cyanoacrylate Glue: A Comparative Clinical and Histologic Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2013 Feb;71(2):241-8.

Viudes A, Peman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot JL, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Nov;21(11):767-74.

Vote BJ, Elder MJ. Cyanoacrylate glue for corneal perforations: a description of a surgical technique and a review of the literature. *Clin Exp Ophthalmol.* 2000 Dec;28(6):437-42.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, 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.* 1998a Feb;43(1):45-50.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by candida species. *Aust Dent J.* 1998b Jun;43(3):160-6.

Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonca G, McGraw K, Stoner L. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont.* 2016 Jun;25(4):288-301.

- Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil*. 2005 Jul;32(7):518-25.
- Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses*. 2010 May;53(3):221-6.
- Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses*. 2011 Sep;54(5):e344-51.
- Zhang K, Ren B, Zhou X, Xu HH, Chen Y, Han Q, et al. Effect of Antimicrobial Denture Base Resin on Multi-Species Biofilm Formation. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 29;17(7):
- Zhou L, Tong Z, Wu G, Feng Z, Bai S, Dong Y, et al. Parylene coating hinders *Candida albicans* adhesion to silicone elastomers and denture bases resin. *Arch Oral Biol*. 2010 Jun;55(6):401-9.