UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JULIANA HOTTA

**Viabilidade do uso de dispositivo acrílico intra-oral
reembasado por material resiliente temporário
modificado por antimicrobianos:
estudo preliminar em ratos**

BAURU
2013

JULIANA HOTTA

**Viabilidade do uso de dispositivo acrílico intra-oral reembasado por
material resiliente temporário modificado por antimicrobianos:
estudo preliminar em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek

BAURU
2013

H797v Hotta, Juliana
Viabilidade do uso de dispositivo acrílico intra-oral reembasado por material resiliente temporário modificado por antimicrobianos: estudo preliminar em ratos/ Juliana Hotta. – Bauru, 2013.
184 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek

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

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo número: CEEPA 026/2011

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico a concretização dessa conquista a todos que estiveram ao meu lado, que através de palavras de incentivo, conhecimento, amor e companheirismo tornaram mais amena essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Ava e Takeo**, por todo o amor dispensado e pelo apoio incondicional para concretizar meus sonhos. Obrigada por me ensinar a enfrentar os obstáculos da vida e a superar meus limites, vocês foram meu ponto de apoio nessa caminhada.

Aos meus irmãos, **Fábio e Isabella**, pela amizade e companheirismo em todos os momentos. Obrigada pelos conselhos nos tempos difíceis, risadas sem horas e alegria de uma parceria incontestável.

Ao meu namorado, **Victor**, um grande incentivador e parceiro dessa conquista pessoal. Obrigada por me propiciar momentos de alegria e por ser meu equilíbrio. Durante esses anos foi reconfortante saber que você sempre estaria presente com um conselho, um sorriso ou uma palavra de estímulo. Agradeço também seus pais, **Gizele e Luiz Carlos Casaca**, que também me incentivaram nessa fase. Obrigada pelos momentos de descontração, compreensão e carinho.

À **toda minha família**, tios e primos, vocês são meu alicerce, obrigada por me acompanhar, por sempre estarem por perto e por não me deixarem esquecer da importância da minha origem. O meu obrigada se estende as minhas queridas avós, que infelizmente não puderam participar diretamente dessa etapa, mas que com toda certeza estariam orgulhosas dessa realização.

Aos **meus queridos amigos**, que sempre torceram pela minha realização e sucesso. Obrigada por todo carinho, fidelidade e prazerosa companhia. Em especial as minhas amigas **Ana Lívia, Fernanda, Liege, Mayara e Natália**, companheiras de longa data, cúmplices de cada momento especial da minha vida, serei eternamente grata a amizade de vocês, é imensurável minha alegria de tê-las por perto.

À todos aqueles que fizeram parte dos engrandecedores anos de especialização no **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP)**, especialmente aos professores (**Prof. Dr. José Fernando Scarelli Lopes, Prof. Dr. João Henrique Nogueira Pinto, Prof.^a Dr.^a Mônica Waldemarin Lopes, Prof. Dr. Flávio Monteiro Amado, Prof. Dr. Caio Márcio Figueiredo, Prof.^a Roberta Dias Pires Brosco e Prof.^a Rosângela Aparecida Garla Cerigatto**), as adoráveis e prestativas auxiliares **Adriana, Emília e Ivone** e as amigadas que ali conquistei (Danilo, Fábio, José Antônio, Letícia e Thaís).

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Bauru, especialmente aos professores do Departamento de Prótese, **Prof. Dr. Accácio Lins do Valle, Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Gerson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek, Prof.^a Dr.^a Lucimar Falavinha Vieira, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, Prof. Dr. Paulo Martins Ferreira, Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira, Prof. Dr. Renato de Freitas, Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho, Prof.^a Dr.^a Simone Soares, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela**, obrigada pelos conhecimentos científicos e pessoais compartilhados.

Agradeço em especial à **Prof.^a Dr.^a Simone Soares** pelo apoio financeiro para realização desse estudo, pelo alto astral contagiante e pelas prontas palavras de incentivo.

Não poderia deixar de enaltecer a importância do **Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira**, obrigada pelo carinho, atenção e ensinamentos profissionais, você foi fundamental na minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Prótese, **Cláudia, Deborah, Valquíria, Marcelo e Reivanildo**, que sempre se prontificaram a colaborar durante esses anos de mestrado.

Às funcionárias da clínica de pós-graduação, **Cleuza e Hebe**, por propiciar horas agradáveis e colaborar para o bom andamento das clínicas.

Aos meus colegas do curso de mestrado, **Adriana, Aline, André, Denise, Dylton, Josely, Letícia, Vinícius e Yuri**, obrigada por compartilharem comigo seus ensinamentos e pela boa convivência.

Às queridas amigas, **Karen, Mércia e Laís**, uma das maiores recompensas que conquistei nesses anos de mestrado, obrigada por sempre estarem presentes quando mais precisei, por colaborarem no meu enriquecimento acadêmico e profissional, por serem detalhistas e críticas, me estimulando a sempre buscar a perfeição. Por me propiciarem muitos momentos de felicidade e alegria, tornando mais amena essa longa caminhada que percorremos.

À todos os alunos de graduação, estagiários e pós-graduandos, em especial ao **Denis, Elen Juliana, Janaina, Vinícius e Wilson**, por disponibilizarem seu tempo para me ajudar no desenvolvimento prático dessa pesquisa, pelo comprometimento e parceria, vocês foram imprescindíveis para a realização desse estudo. Também agradeço a **Mírian Bueno**, pelo incentivo e ensinamentos compartilhados no início do meu mestrado.

Ao **Departamento de Patologia** da Faculdade de Odontologia de Bauru, por disponibilizar o laboratório e seus equipamentos, fundamentais para viabilização histopatológica dessa pesquisa, agradeço também a técnica Fátima por partilhar comigo seus conhecimentos de processamento histológico.

Ao **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, pela paciência, generosidade e principalmente pela prontidão em auxiliar cientificamente na elaboração e concretização do projeto dessa pesquisa.

À **Prof.^a Dr.^a Vanessa Soares Lara** e suas alunas de pós-graduação, **Ana Regina Casaroto e Priscila Lie Tobouti**, por colaborar na padronização metodológica desse estudo, obrigada por terem sido tão acessíveis e me repassar seus conhecimentos científicos.

Ao **Departamento de Histologia** da Faculdade de Odontologia de Bauru, por gentilmente permitir a utilização do laboratório e equipamentos, obrigada a todos os **professores, funcionários e pós-graduandos** desse departamento que me acolheram e colaboraram para a finalização desse estudo. Em especial, a pós-graduanda, **Andreia Espíndola Vieira**.

Às técnicas **Danielle Santi Ceolin** (Dani) e **Patrícia de Sá Mortágula Germino** (Paty) que transmitiram seus ensinamentos histológicos e realizaram os procedimentos técnicos das lâminas histológicas.

À **Dra. Tania Mary Cestari**, pelas horas dispensadas, por me orientar na elaboração das análises histológicas, pela prontidão e comprometimento em repassar seu conhecimento científico, sou muito grata pelo seu acolhimento, ele foi essencial para amenizar os obstáculos que encontrei nesse estudo.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, pela prontidão em esclarecer todas as dúvidas científicas e histológicas. Obrigada, pela orientação e conhecimento transmitido, sem eles seria impraticável a finalização dessa pesquisa.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (**Rafaela, Marcelo, Neusa e Renato**), do Biotério FOB-USP e ao Ovídio, pela prontidão e imensa ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Finalmente, agradeço **à Deus**, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

INSTITUCIONAIS

À instituição Faculdade de Odontologia de Bauru FOB – USP, por oferecer um programa de Pós-Graduação de excelência e propiciar enriquecimento profissional e pessoal aos seus alunos.

À CAPES, pela bolsa de Mestrado e pelo apoio a pesquisa.

À FAPESP, por possibilitar financeiramente o desenvolvimento deste trabalho, por meio dos auxílios à pesquisa concedidos (Processos nº 2010/07932-8 e 2012/11074-2).

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer em especial, à **Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek**, minha orientadora. Pela oportunidade, por transmitir humildemente seus ensinamentos e sabedoria, por se interessar nos detalhes e dificuldades que encarei ao longo dessa jornada e incansavelmente me ajudar a buscar soluções, por ser presente e estimular sempre que eu tentasse alcançar o meu melhor, me ensinando a ser persistente e detalhista, pela confiança depositada e por sua amizade. Espero que essas simples palavras transmitam minha gratidão e que fique aqui enaltecida sua importância no meu amadurecimento pessoal e científico.

Obrigada!

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

Resumo

RESUMO

O objetivo deste estudo preliminar foi obter padrões metodológicos para viabilizar a utilização de um dispositivo acrílico intra-oral adaptável à mucosa palatina de ratos e passível de reembasamento com material resiliente temporário (Trusoft) modificado com antimicrobianos em suas mínimas concentrações inibitórias (MCIs) para biofilme de *Candida albicans*. Para delinear essa adequação, foram determinados parâmetros em relação à dieta e alojamento dos animais enquanto usuários desses dispositivos. A amostra total dos ratos (n=115) foi dividida em seis grupos: Controle Negativo (CN): sem dispositivo acrílico intra-oral; Controle Geral (CG): dispositivo acrílico sem reembasamento; Controle Positivo (CP): dispositivo reembasado com Trusoft sem fármaco; Diacetato de Clorexidina (CLO): dispositivo reembasado com Trusoft contendo clorexidina (0,064 g/mL); Cetoconazol (CET): dispositivo reembasado com Trusoft contendo cetoconazol (0,128 g/mL) e Nistatina (NIS): dispositivo reembasado com Trusoft contendo nistatina (0,032 g/mL). Os animais foram eutanasiados após 7 ou 14 dias da instalação dos dispositivos intra-orais. As adaptações para a obtenção dos dispositivos incluíram a técnica de moldagem, método de reembasamento e formas de retenção à mucosa palatina dos animais. Para proporcionar a análise histopatológica descritiva padronizada, foram estabelecidos critérios em relação à obtenção das amostras histológicas, à seleção da região de interesse (RI) da análise e aos determinantes utilizados na descrição. Foi observado que a dieta pastosa e o alojamento em gaiolas com piso aramado sobre base de maravalha e papel craft possibilitaram melhores condições de sobrevivência aos animais. Os dispositivos intra-orais confeccionados individualmente e retidos via amarrilhos com fios ortodônticos nos incisivos e molares se mantiveram satisfatoriamente em posição durante todo o experimento para a maioria dos animais (72,6%), sobretudo no período inicial de 7 dias. O procedimento para o reembasamento dos dispositivos foi considerado apropriado em ambos os períodos testados. Houve perda de alguns animais por desnutrição (9,5%) ou durante a anestesia (4,1%). As amostras histológicas obtidas da mucosa palatina (tecido mole) foram descartadas por serem adequadas para a determinação da RI, sendo utilizadas apenas aquelas provenientes de tecidos mole e duro (n=12).

A RI mais satisfatória para análise histopatológica correspondeu à área entre os primeiros molares, de um feixe neurovascular ao outro. A simples comparação visual das fotomicrografias obtidas na análise histopatológica descritiva sugeriu a ausência de infiltrado inflamatório em todos os grupos testados para ambos os períodos de avaliação. Após 7 dias, a espessura da camada córnea, estratificação das camadas do epitélio e disposição das fibras colágenas, dos vasos e das células da lâmina própria dos grupos de estudo se apresentaram similares ao observado para o grupo CN, havendo sinais de reabsorção óssea palatina apenas no grupo CG. Aos 14 dias, foi observado aumento da espessura de ortoqueratina e compressão das células epiteliais e do tecido conjuntivo da lâmina própria de todos os grupos em relação ao CN. Neste período, a reabsorção óssea palatina foi presente em todos os grupos, exceto CN e CP, com maior intensidade no grupo CG. Foi possível sugerir que os dispositivos acrílicos intra-orais podem ser considerados funcionais e viáveis para os testes de materiais para base de próteses e avaliação de tratamento para estomatite protética em ratos, sobretudo em períodos de até 7 dias.

Palavras-chave*: Anti-Infeciosos; Estomatite sob Prótese; Metodologia; Modelos animais; Reembasadores de Dentadura; Ratos Wistar.

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

ABSTRACT

Viability of using an intraoral acrylic device relined by resilient material temporarily modified with antimicrobial agents: a preliminary study in rats

The purpose of this study was to produce preliminary methodological standards to allow the use of an intraoral acrylic device adjusted to the palatal mucosa of rats and capable of relining with temporary resilient material (Trusoft) modified with antimicrobial agents in the minimum inhibitory concentrations (MICs) for *Candida albicans* biofilm. To design this adjustment, parameters were determined in relation to the diet and housing of animals as users of these devices. The total sample (n= 115) was divided into six groups: Negative control (NC): without an acrylic intraoral device; Overall Control (OC): device without relining; Positive Control (PC): device relined with Trusoft without the addition of drugs; Chlorhexidine diacetate (CHL): device relined with Trusoft containing chlorhexidine diacetate (0.064 g/mL); Ketoconazole (KET): device relined with Trusoft containing ketoconazole (0.128 g/mL); and Nystatin (NYT): acrylic device relined with Trusoft containing nystatin (0.032 g/mL). The animals were sacrificed after 7 or 14 days from the installation of the intra-oral devices. The adaptations for obtaining the devices included the impression technique, the reline method and the means of retaining in the palatal mucosa of animals. To obtain the standard descriptive histopathological analysis, criteria had been established in relation to obtaining the histological samples, selecting the region of interest (RI) of analysis and the criteria utilized in the description. It was observed that a paste diet and housing in cages with a wired fence floor with an additional base of wood shavings and craft paper enabled the best possible survival conditions for the animals. The individually made intra-oral devices retained with stainless steel wires at the incisors and molars remained satisfactorily in position throughout the experiment for most animals (72.6%), mainly in the initial period of 7 days. The procedure for the relining of the devices was deemed appropriate for both test periods. Some animals were lost from malnutrition (9.5%) or failure to recover from the anaesthetic (4.1%). The obtained

histological samples of the palatine mucosa (soft tissue) were discarded as inappropriate for the determination of the RI, having utilized only those derived from hard and soft tissues (n = 12). The RI most satisfactory for the histopathological analysis corresponded to the area between the first molars from a palatal neurovascular bundle. A simple visual comparison of the photomicrographs obtained from the descriptive histopathological analysis suggested the absence of an inflammatory infiltrate in all the groups tested for both periods. After 7 days, the thickness of the keratin, the layers of the stratified epithelium and arrangement of the collagen fibers, cells and vessels of the lamina from the mucosa of the study groups presented similar findings to those observed for the NC group, having signals of palatine bone resorption only in the OC group. At 14 days, there was an increasing thickness of the keratin and compression of the epithelial cells and connective tissue of the lamina from the mucosa of all groups in relation to the NC group. In this period, the palatal bone resorption was present in all groups except the NC and PC groups, with a greater intensity in the OC group. It was possible to suggest that the intraoral acrylic devices may be considered as functional and viable for the testing of denture base materials and the evaluation of treatment for denture stomatitis in rats, especially in periods of up to 7 days.

Key-words*: Anti-Infective Agents; Stomatitis, Denture; Methodology; Models, Animal; Denture Liners; Rats, Wistar.

*In accordance with Health Sciences Descriptors (DeCS) available at <http://decs.bvs.br/>

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** A- Maca estabilizadora desenvolvida para manipulação dos animais sob anestesia durante os procedimentos experimentais; B- Crânio seco de um rato de 60 dias; C e D- Moldagem preliminar da maxila com silicone laboratorial; E- Molde preliminar de silicone..... 101
- FIGURA 2-** A- Moldeira individual; B- Moldagem individual das maxilas dos ratos com moldeira de resina acrílica autopolimerizável e poliéter; C- Molde de trabalho em poliéter. 102
- FIGURA 3-** A- Modelo de trabalho; B- Enceramento da porção palatina do dispositivo intra-oral; C- Fios ortodônticos posicionados na região anterior do enceramento. 103
- FIGURA 4-** A- Inclusão do modelo de trabalho com o enceramento em mufla; B- Muralha de silicone para proteção dos fios e modelo; C- Contra-mufla com a reprodução em gesso do enceramento; D- Inserção da resina acrílica termopolimerizável sobre a região palatina do modelo. 104
- FIGURA 5-** Sequência dos dispositivos acrílicos intra-orais após polimerização: A- Com excessos imediatamente a polimerização; B- Após procedimento de acabamento e polimento; C- Com orifícios para retenção dos amarriinhos metálicos na região interproximal dos molares; D- Dispositivo acrílico finalizado. 105
- FIGURA 6-** A; B; C- Sulcos transversais na região interna dos dispositivos acrílicos intra-orais; D- Sulcos transversais realizados orientando o desgaste dos dispositivos acrílicos para o reembasamento. 108
- FIGURA 7-** A- Pó do TrusoftTM proporcionado; B- Adição do fármaco ao pó do reembasador resiliente; C- Incorporação do fármaco ao pó do material; D- Inserção do líquido do TrusoftTM à mistura; E- Manipulação do material reembasador resiliente incorporado com fármaco; F- Dispositivos acrílicos mantidos em posição aguardando a plastificação do material; G- Dispositivo intra-oral reembasado; H- Remoção dos excessos do material reembasador; I- Aspecto final do dispositivo acrílico intra-oral após reembasamento. 109
- FIGURA 8-** A- Fios ortodônticos na região interproximal de segundo e terceiro molar; B- Fios ortodônticos na região anterior e posterior com o dispositivo acrílico em posição; C- Dispositivo acrílico intra-oral retidos por amarriinhos; D- Proteção dos amarriinhos com resina composta..... 110
-

FIGURA 9-	A- Incisão perpendicular a lateral da mucosa palatina; B- Incisão perpendicular contornando a área dos molares; C- Obtenção da amostra histológica de tecido mole após descolamento.	111
FIGURA 10-	A- Amostra histológica da maxila de um rato com tecido mole e duro após o processo de desmineralização, linhas tracejadas ilustrando corte transversal da amostra histológica; B- Delimitação da região de interesse (mesial do primeiro molar até a distal do terceiro molar). Imagens capturadas com Microscópio digital portátil Dino-Lite (modelo AM413TL, Compex Tecnologia Ltda, São Paulo, SP, Brazil) e programa Dino Capture 2.0 (Compex Tecnologia Ltda).	113
FIGURA 11:	Fotomicrografias de 10 cortes transversais semi-seriados com 200 µm de intervalo entre eles obtidos da região intermolares (M) do grupo CN no período de 7 dias. Nota-se a variabilidade quanto à espessura (seta azul) e contorno das cristas epiteliais (seta preta), à presença, tamanho e a quantidade das projeções epiteliais (seta verde) e à morfologia da estrutura palatina óssea (P) (seta cinza). HE.	125
FIGURA 12-	Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos controles no período de 7 dias: A, B e C evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em A', B' e C'. A camada córnea (Oq), o epitélio (Ep), a lâmina própria (LP) e o tecido ósseo (TO) dos grupos CG (B') e CG (C') não revelaram alterações histopatológicas em comparação ao grupo CN (A'). HE	129
FIGURA 13-	Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos experimentais no período de 7 dias: B, C e D evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em B', C' e D'. A camada córnea (Oq), o epitélio (Ep), a lâmina própria (LP) e o tecido ósseo (TO) dos grupos CLO (B'), CET (C') e NIS (D') não revelaram alterações histopatológicas em comparação ao grupo CN (A'). HE	131

FIGURA 14- Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos controles no período de 14 dias: A, B e C evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em A', B' e C'. A camada córnea (Oq), o epitélio (Ep), a lâmina própria (LP) e o tecido ósseo (TO) do grupo CP (C') não revelaram alterações histopatológicas em comparação ao grupo CN (A'). No grupo CG (B, B'), as setas vermelhas indicam intensa reabsorção do tecido ósseo palatino. HE	135
FIGURA 15- Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos experimentais no período de 14 dias: B, C e D evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em B', C' e D'. Nota-se a lâmina própria (LP) com densas fibras colágenas dispostas paralelamente a superfície epitelial e ausência de alterações na camada córnea (Oq), no epitélio (Ep) e no tecido ósseo (TO) dos grupos CLO (B'), CET (C') e NIS (D') em comparação ao grupo CN (A'). HE	137
FIGURA 16- Fotomicrografias da região do epitélio no período de 7 dias. Nota-se a ausência de alterações histológicas na espessura da camada córnea (Oq), no epitélio e na lâmina própria (LP) de todos os grupos de estudo (B a F) em relação ao grupo CN. HE	141
FIGURA 17- Fotomicrografias da região do epitélio no período de 14 dias. Nota-se maior espessura da camada córnea (Oq), alterações no contorno das cristas epiteliais (seta preta) e compressão (círculo) das células epiteliais (Ep) e do conjuntivo da lâmina própria (LP) de todos os grupos de estudo (B a F) em relação ao grupo CN (A). HE	143
FIGURA 18- Fotomicrografias da superfície óssea palatina adjacente ao epitélio no período de 7 dias. Nota-se alterações (seta azul) de contorno no tecido ósseo (TO) do grupo CG (B) e normalidade do tecido conjuntivo (TC) adjacente em todos os grupos de estudo (C-F) em relação ao grupo CN (A). HE	147
FIGURA 19- Fotomicrografias da superfície óssea palatina adjacente ao epitélio no período de 14 dias. Nota-se alterações de contorno (seta azul) no tecido ósseo (TO) dos grupos CG (B), CLO (D), CET (E) e NIS (F) e normalidade do tecido conjuntivo (TC) adjacente em todos os grupos de estudo em relação ao grupo CN (A). HE	149

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2.1	Estomatite protética: Etiologia, patogênese e terapêutica	33
2.2	Adição de antimicrobianos em materiais para base de prótese.....	56
2.3	Avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade de materiais para base de prótese	72
2.4	Modelos experimentais com utilização de dispositivos intra-orais em ratos	79
3	PROPOSIÇÃO	91
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
4.1	Animais de experimentação	97
4.1.1	Obtenção dos animais	97
4.1.2	Modificações na dieta alimentar	97
4.1.3	Modificações nas condições de alojamento	99
4.2	Adequação dos dispositivos acrílicos intra-orais	99
4.2.1	Manipulação dos animais	99
4.2.2	Obtenção de modelos preliminares	100
4.2.3	Moldagem individual	101
4.2.4	Enceramento e acrilização	102
4.3	Instalação dos dispositivos acrílicos intra-orais	105
4.3.1	Grupos experimentais e materiais	105
4.3.2	Instalação dos dispositivos intra-orais	107
4.4	Obtenção das amostras histológicas	111

4.5	Processamento das amostras histológicas.....	112
4.5.1	Tecido mole	112
4.5.2	Tecidos mole e duro	112
4.6	Determinação da área de interesse para análise histopatológica descritiva.....	114
4.7	Obtenção das fotomicrografias	114
4.8	Análise histopatológica descritiva	115
5	RESULTADOS	117
5.1	Viabilização do uso dos dispositivos intra-orais.....	119
5.1.1	Adequação da dieta alimentar e condições de alojamento.....	119
5.1.2	Adequação dos dispositivos acrílicos intra-orais	120
5.2	Amostragem final de animais	121
5.3	Obtenção das amostras histológicas	122
5.4	Região de interesse para análise histopatológica descritiva	123
5.5	Análise histopatológica descritiva	139
5.5.1	Descrição da mucosa palatina.....	139
5.5.2	Descrição do tecido ósseo adjacente a mucosa palatina	145
6	DISCUSSÃO	151
7	CONCLUSÕES	165
	REFERÊNCIAS	169
	ANEXOS	181

A histological section of skin tissue, stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing the epidermis and dermis. The epidermis is the upper layer, and the dermis is the lower layer. The word "Introdução" is written in a large, elegant, black cursive font across the middle of the image, partially overlapping the tissue. A thin black horizontal line is at the top, and a thin black vertical line is on the right side, forming a frame.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A infecção da cavidade bucal por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é considerada a infecção fúngica mais comum entre humanos (AKPAN; MORGAN, 2002). A forma mais frequente de candidose bucal é a estomatite protética, patologia que se manifesta clinicamente por diferentes níveis de inflamação e eritema nos tecidos sob as próteses totais de 11 a 67% dos usuários (BARBEAU et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004; COELHO; SOUSA; DARÉ, 2004; RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; RAMAGE et al., 2004; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005).

Os fatores etiológicos que desencadeiam a estomatite protética são tidos como multifatorial, porém a infecção por *Candida* tem sido relatada como o principal fator relacionado essa patologia (BANTING; HILL, 2001; BUDTZ-JÖRGENSEN; BERTRAM, 1970; RAMAGE et al., 2004; RITCHIE et al., 1969; WEBB et al., 1998). Tem sido relatado que 93% dos indivíduos com sinais clínicos de estomatite protética apresentam infecção fúngica (BAENA-MONROY et al., 2005; BANTING; HILL, 2001; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; PIRES et al., 2002) sendo a *Candida albicans* a espécie mais prevalente (BAENA-MONROY et al., 2005; COCO et al., 2008; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; PIRES et al., 2002; SANITÁ et al., 2011; VANDEN ABEELE et al., 2008). Fatores etiológicos sistêmicos como debilidade física, alergias, idade (WEERASURIYA; SNAPE, 2008), gênero, tabaco, álcool (BARBEAU et al., 2003; SOYSA; ELLEPOLA, 2005), endocrinopatologias (DORKO et al., 2001), deficiências nutricionais (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; RITCHIE et al., 1969), antibióticos de amplo espectro (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; DORKO et al., 2001; RITCHIE et al., 1969; SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2008), imunossupressores, terapias antineoplásicas (GOLECKA et al., 2006), e alterações nos mecanismos imunológicos podem influenciar no desenvolvimento dessa infecção fúngica (DOROCKA-BOBKOWSKA et al., 2010; PEREZOUS et al., 2005; SALERNO et al., 2011). Ainda, fatores locais associados às próteses têm sido considerados determinantes, sendo os principais a presença de biofilme (BANTING; GREENHORN; MCMINN, 1995; BUDTZ-JÖRGENSEN; BERTRAM, 1970; PEREIRA-CENCI et al., 2008; RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999), o trauma local causado pelas próteses, sobretudo as antigas e mal adaptadas

(ARENDORF; WALKER, 1987; BUDTZ-JÖRGENSEN; BERTRAM, 1970; COELHO; SOUSA; DARÉ, 2004; GENDREAU; LOEWY, 2011), a xerostomia (SHIP; PILLEMER; BAUM, 2002), o uso contínuo das próteses (BARBEAU et al., 2003; WEBB et al., 1998) e a alteração do pH da saliva (LOMBARDI; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993).

Existem descritos na literatura alguns protocolos para o tratamento da estomatite protética, incluindo terapia antifúngica tópica (BANTING; HILL, 2001; BERGENDAL; ISACSSON, 1980; SANITÁ et al., 2012), medicação antifúngica sistêmica (BLOMGREN; BERGGREN; JONTELL, 1998; KULAK; ARIKAN; DELIBALTA, 1994), cuidados com a higiene bucal (PIRES et al., 2002), procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses (BANTING; HILL, 2001; KULAK; ARIKAN; DELIBALTA, 1994; NEPPELENBROEK et al., 2008; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005), substituição de próteses antigas (AMANLOU et al., 2006; NEPPELENBROEK et al., 2008), eliminação de irregularidades anatômicas, restabelecimento de oclusão não traumática, restituição nutricional (LOMBARDI; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993) e remoção das próteses no período noturno (NEPPELENBROEK et al., 2008). A seleção de um ou mais protocolos de tratamento deve ser realizada com base nos aspectos inerentes a cada paciente.

A medicação antifúngica sistêmica para o tratamento da estomatite protética pode ser recomendada para pacientes imunocomprometidos (PEREZOUS et al., 2005). No entanto, além de causarem potenciais efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos, esses fármacos podem apresentar interação com outros medicamentos, potencializando efeitos sistêmicos adversos à saúde (CHOI et al., 2010). Outro aspecto que merece ser ressaltado é a frequente ocorrência de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após a suspensão da terapia antifúngica sistêmica (BANTING; HILL, 2001; BERGENDAL; ISACSSON, 1980; KULAK; ARIKAN; DELIBALTA, 1994; NEPPELENBROEK et al., 2008). A falha desse tratamento tem sido atribuída ao uso indiscriminado dos antifúngicos sistêmicos, sobretudo dos azólicos, o que resultou no desenvolvimento de espécies fúngicas resistentes (PFALLER, 2012; ROGERS, 2002; ZOMORODIAN et al., 2011b). Além disso, a sobrevivência de *Candida* spp. após a terapia sistêmica pode ser justificada pela concentração insuficiente da medicação nas superfícies de contato das próteses (MATHABA; DAVIES; WARMINGTON, 1995).

A terapia antifúngica tópica com fármacos como a nistatina, o miconazol e a clorexidina é convencionalmente a mais utilizada para a estomatite protética (BANTING; HILL, 2001; LOMBARDI; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993; NEPPELENBROEK et al., 2008). Apesar de serem eficazes no alívio dos sinais e sintomas da estomatite associada à *Candida* spp., esses medicamentos não eliminam os micro-organismos das superfícies teciduais das próteses (BANTING; HILL, 2001; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; DAVENPORT, 1970). O sucesso da aplicação tópica de fármacos na cavidade oral pode ser comprometido por vários fatores, incluindo a falta de percepção da infecção pelos pacientes, necessidade de gastos com medicação, uso contínuo das próteses, sabor desagradável do medicamento (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994) e posologia rigorosa (SCHNEID, 1992). Ainda, é difícil manter uma concentração terapêutica da medicação nas superfícies e nos tecidos infectados em decorrência do fluxo salivar, dos movimentos da língua e da deglutição, que rapidamente dissolvem e eliminam o fármaco da cavidade bucal (BANTING; HILL, 2001; MIMA et al., 2012).

Para que a terapêutica da estomatite protética seja eficaz, é imprescindível adotar métodos que reduzam ou, de preferência, eliminem os micro-organismos das superfícies teciduais das próteses (BUDTZ-JÖRGENSEN; LÖE, 1972; IACOPINO; WATHEN, 1992; NEPPELENBROEK et al., 2008). Tem sido relatado que após a adesão inicial dos blastóporos de *Candida* spp. a substratos como a resina acrílica, uma camada de biofilme é rapidamente formada (CHANDRA et al., 2001; FERREIRA et al., 2009; KUHN et al., 2002). As células neste sistema são menos susceptíveis a ação de agentes antimicrobianos, havendo aumento do grau de resistência com a maturação do biofilme (MAH; O'TOOLE, 2001). Além disso, o contato do biofilme protético com a mucosa de suporte traumatiza os tecidos, tornando-os mais propensos às infecções por aumentar sua permeabilidade às toxinas microbianas (ZOMORODIAN et al., 2011a).

Para eliminar o contato do biofilme protético da base acrílica com os tecidos infectados é possível realizar o reembasamento das próteses, sobretudo com materiais resilientes (MARÍN ZULUAGA; GOMEZ VELANDIA; RUEDA CLAUIJO, 2011). Além de romperem o ciclo da reinfecção pelos micro-organismos presentes na base acrílica (DAVENPORT, 1972), os reembasadores resilientes promovem a recuperação dos tecidos injuriados, proporcionando maior conforto ao paciente (FARRELL, 1975). Entretanto, uma grande desvantagem associada ao uso

desses materiais é a dificuldade em mantê-los limpos, já que são significativamente mais macios e menos resistentes à escovação que as resinas acrílicas convencionais (MÄKILÄ; HONKA, 1979). Outro problema refere-se à sua porosidade e incompatibilidade com certas soluções de limpeza para próteses mesmo em curtos períodos de imersão (NIKAWA et al., 1994). Dessa forma, os materiais resilientes, principalmente os temporários, são facilmente degradáveis e susceptíveis à colonização microbiana (MÄKILÄ; HOPUSU-HAVU, 1977; PAVAN et al., 2010).

Visando prolongar a longevidade clínica dos condicionadores de tecido e reembasadores resilientes temporários, reduzir a possibilidade de acúmulo de biofilme e minimizar o trauma tecidual, alguns autores propuseram a incorporação direta de agentes antimicrobianos nesses materiais (ADDY, 1981; DOUGLAS; WALKER, 1973; MATSUURA et al., 1997; NIKAWA et al., 1997; SCHNEID, 1992; THOMAS; NUTT, 1978). Os fármacos incorporados à matriz polimérica são liberados gradualmente na cavidade bucal tratando de maneira simultânea os tecidos paraprotéticos injuriados e a infecção por *Candida* (CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986). Além disso, há redução da necessidade de participação dos pacientes durante o tratamento, o que é vantajoso, sobretudo àqueles idosos, institucionalizados e portadores de deficiências físicas e/ou mentais (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994).

A associação de fármacos antifúngicos e antimicrobianos aos materiais resilientes torna-se pertinente em uma terapêutica contra a estomatite protética previamente à confecção de novas próteses já que é instituída por um período relativamente curto de tempo. A degradação e enrijecimento gradual apresentada pelos materiais resilientes temporários implica em sua substituição por similares ou por reembasadores de longo prazo, não devendo ultrapassar 14 dias, período esse semelhante ao de um tratamento de estomatite protética com antifúngico tópico convencional (SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994). Nos casos de perda de adaptação das bases das próteses com a área de suporte, o uso de reembasadores resilientes contendo antimicrobianos minimiza o trauma tecidual e previne o acúmulo de biofilme até que o problema seja solucionado por novas próteses ou reembasamento laboratorial. Em feridas cirúrgicas, essa combinação poderia auxiliar na recuperação tecidual e prevenção de infecção devido à ação antimicrobiana dos agentes incorporados (MATSUURA et al., 1997).

A modificação de condicionadores de tecido pela incorporação de agentes antimicrobianos em concentrações padronizadas tem demonstrado ser efetiva e viável na inibição de *C. albicans* (CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986; FALAH-TAFTI et al., 2010; QUINN, 1985; RADNAI et al., 2010; SCHNEID, 1992; THOMAS; NUTT, 1978; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994). Entretanto, estudos prévios demonstraram que a adição de fármacos em concentrações comercialmente disponíveis a materiais poliméricos/plásticos, incluindo algumas marcas comerciais de condicionadores de tecido e reembasadores resilientes, pode afetar suas características estruturais (ADDY; HANDLEY, 1981), (URBAN et al., 2009), módulo de elasticidade e peso (ADDY; HANDLEY, 1981), além de outras propriedades como resistência à tração (SCHNEID, 1992; URBAN et al., 2006), dureza (ADDY; HANDLEY, 1981; SCHNEID, 1992), rugosidade superficial (URBAN et al., 2009) e resistência da união ao descolamento da resina acrílica (ALCANTARA et al., 2012). Dessa forma, seria pertinente determinar concentrações menores que fossem eficientes para inibição fúngica e, ao mesmo tempo, não interferisse com as propriedades dos materiais resilientes para base de próteses.

Considerando os aspectos anteriormente mencionados, Bueno et al. (2013) determinaram as mínimas concentrações inibitórias (MCIs) de biofilme de *C. albicans* para cinco agentes antifúngicos/antimicrobianos incorporados a dois materiais resilientes temporários para base de prótese (Trusoft e Softone). Em 14 dias de incubação, os melhores resultados (menores MCIs) para ambos os materiais foram observados para a nistatina, clorexidina e cetoconazol. Além disso, em até 14 dias de avaliação, esses três fármacos em suas MCIs não interferiram de forma deletéria nas propriedades de dureza Shore A (BUENO et al., 2012), rugosidade superficial (NEPPELENBROEK et al., 2012a), resistência à tração e porcentagem de alongamento (GALITESI et al., 2012; NEPPELENBROEK et al., 2012b) do material Trusoft. Apesar desses resultados favoráveis, para que a incorporação dos fármacos nas MCIs possa ser indicada como alternativa terapêutica para estomatite protética, ainda é necessária a avaliação da biocompatibilidade desse protocolo com os tecidos bucais.

Durante sua vida útil, os reembasadores resilientes à base de resina acrílica liberam substâncias solúveis no meio bucal (CRAIG; GODWIN, 2002), as quais podem ser potencialmente tóxicas aos tecidos bucais tais como metil metacrilato, formaldeído, ácido metacrílico, dibutilftalato e ácido benzóico (CHAVES

et al., 2010; LEFEBVRE; KNOERNSCHILD; SCHUSTER, 1994; LEWIS; CHESTNER, 1981). Esses componentes tóxicos, liberados na saliva, podem atuar até mesmo em locais distantes da área de contato do reembasador (LEFEBVRE et al., 1995). Os reembasadores resilientes à base de resina acrílica quimicamente ativada consistem de um pó, geralmente constituído de polietil metacrilato ou copolímero, e um líquido contendo etanol e plastificantes. O agente plastificante é comumente formado por moléculas grandes como ocorre no éster aromático dibutilftalato, que é amplamente utilizado nos líquidos dos reembasadores resilientes (BRADEN, 1970; SINGH et al., 2010). A distribuição das largas moléculas de plastificante minimiza o entrelaçamento das cadeias poliméricas e, assim, permite que cadeias individuais “deslizem” umas sobre as outras. Essa movimentação promove alterações rápidas na forma dos materiais resilientes quimicamente ativados, levando ao efeito de amortecimento aos tecidos de suporte das próteses (BRADEN, 1970). Os líquidos dos materiais utilizados com essa finalidade clínica não contêm monômeros acrílicos. Por conseguinte, esses reembasadores são considerados temporários, diferentemente daqueles ativados termicamente, que são mais duráveis (SINGH et al., 2010).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* (CAMPANHA et al., 2006; CHAVES et al., 2010; HUANG et al., 2001; KANIE et al., 2009; LEFEBVRE et al., 2001; OKITA; HENSTEN-PETTERSEN, 1991; OZDEMIR; YILMAZ; YILMAZ, 2009; PARK et al., 2004; TAY et al., 2012) e *in situ* (KALLUS, 1984; NAGEM-FILHO; CHIODI-NETTO; DE ARAUJO, 1973; PASSERI; DE CARVALHO, 1985) dos materiais para base de prótese. A citotoxicidade *in vitro* dos condicionadores teciduais e reembasadores resilientes tem sido investigada pelo método de cultura de fibroblastos de camundongos (KANIE et al., 2009; LEFEBVRE et al., 2001; OKITA; HENSTEN-PETTERSEN, 1991; OZDEMIR; YILMAZ; YILMAZ, 2009; PARK et al., 2004; TAY et al., 2012). Esse tipo de pesquisa é considerado restrito do ponto de vista clínico, pois os efeitos de testes *in vitro*, diretamente realizados em células, são mais acentuados do que em condições bucais *in vivo* (CHAVES et al., 2010; HUANG et al., 2001). Embora investigações *in situ* tenham sido realizadas para avaliar a biocompatibilidade de resinas acrílicas (KALLUS, 1984; NAGEM-FILHO; CHIODI-NETTO; DE ARAUJO, 1973) e materiais resilientes para base de prótese (TOMIDA et al., 2011), sua metodologia é limitada clinicamente uma vez que utiliza a implantação do substrato testado no tecido

subcutâneo dos animais, não reproduzindo as condições dinâmicas do ambiente bucal. Da literatura pertinente disponível se tem conhecimento apenas de uma avaliação *in vivo* sobre a biocompatibilidade dos materiais reembasadores para base de prótese nos tecidos bucais (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997). Nesse estudo, os autores observaram que ambos os reembasadores testados, sendo um rígido e um resiliente, na forma comercialmente disponível (sem adição de fármacos), causaram aumento da espessura da camada queratinizada do epitélio palatino de ratos.

Tendo em vista os aspectos anteriormente mencionados, observa-se a falta de informação sobre a biocompatibilidade *in vivo* dos materiais para base de prótese. Além disso, não se tem conhecimento dessa propriedade para os reembasadores resilientes quando modificados pela adição de fármacos para o tratamento de estomatite protética. Pelos resultados favoráveis de inibição fúngica obtidos com os trabalhos *in vitro* que utilizaram a incorporação de agentes antimicrobianos em materiais resilientes (DOUGLAS; WALKER, 1973; MATSUURA et al., 1997; NIKAWA et al., 1997; SCHNEID, 1992; SPIECHOWICZ et al., 1990; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994), é possível supor que esse tratamento apresente boas perspectivas em suprir as limitações encontradas com as terapias convencionais para estomatite protética. A partir desse pressuposto e considerando achados promissores obtidos *in vitro* com as MCIs de nistatina, clorexidina e cetoconazol sobre o biofilme de *C. albicans* e seu efeito inócuo a diversas propriedades de um reembasador resiliente temporário (Trusoft), seria pertinente avaliar o efeito *in vivo* deste protocolo sobre os tecidos bucais. Entretanto, há uma grande variabilidade na metodologia dos estudos que utilizaram ratos como animal experimental em testes envolvendo dispositivos intra-orais (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; JENNINGS; MACDONALD, 1992; JOHNSON et al., 2012; LAMB; MARTIN, 1983; LEE et al., 2011; MARTIN, 1989; MORI et al., 1997; OLSEN; BONDEVIK, 1978; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981; 1986; TSURUOKA et al., 2008). Essas variáveis incluem condições relacionadas aos animais (alojamento e dieta alimentar), aos dispositivos intra-orais (métodos de confecção e retenção) e à análise histopatológica (obtenção das amostras, seleção da área de interesse e forma de descrição morfológica). Assim, é necessário um estudo preliminar para viabilizar uma metodologia reprodutível do uso de dispositivos intra-orais acrílicos simuladores de próteses removíveis em ratos. Para permitir a avaliação futura da

biocompatibilidade in vivo de fármacos incorporados em materiais resilientes, é fundamental que os dispositivos intra-orais previamente testados possam ser reembasados na mucosa palatina dos ratos, permanecendo adequadamente adaptados por um período médio de tratamento convencional para estomatite protética (14 dias).

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA: ETIOLOGIA, PATOGÊNESE E TERAPÊUTICA

A estomatite protética foi classificada por Newton (1962) de acordo com os sinais clínicos da infecção, em três estágios: (I) Hiperemia puntiforme: caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos nos ductos das glândulas salivares palatinas menores; (II) Hiperemia difusa: refere-se à inflamação generalizada sobre a mucosa recoberta pela prótese, que se apresenta lisa e atrófica e (III) Hiperemia granular: a mucosa encontra-se hiperêmica, com aparência nodular, que pode estar presente em toda a região recoberta pela prótese ou, mais frequentemente, restrita à região central do palato, sobretudo nas áreas sob câmara de sucção das próteses totais. A estomatite não tratada pode progredir do estágio I para o II, e deste para o III. Newton sugeriu que o nível da inflamação está relacionado com o acometimento dos ductos salivares, visto que os tecidos periductais são menos resistentes aos processos inflamatórios.

Ritchie et al. (1969) avaliaram a etiologia da estomatite protética, relacionando-a com fatores locais e sistêmicos. Foram selecionados 100 pacientes usuários de próteses removíveis superiores, parciais ou totais, com diagnóstico de estomatite protética segundo a classificação de Newton. A presença de trauma pelo uso das próteses foi clinicamente avaliada. Informações como idade, frequência de utilização e higienização das próteses foram coletadas dos pacientes. Foi também obtida sua história médica de alergias, discrasias sanguíneas, alterações hormonais, nutricionais e uso de medicamentos também foi obtida. Testes alérgicos e exames de sangue foram realizados nos pacientes com histórico de alergias ou que não responderam a tratamentos prévios. A mucosa palatina dos pacientes foi examinada quanto à presença de infecção por bactérias e fungos a partir de semeadura do material coletado dessa área por *swab* oral. A presença de *Candida* e/ou bactérias na mucosa palatina dos pacientes foi ainda analisada por exames citológicos por esfregaço e a avaliação histológica desse sítio foi realizada por biópsias. O tratamento dos pacientes com hiperemia inicial na mucosa palatina consistiu apenas em substituição das próteses antigas. Aqueles com hiperemia difusa que

apresentaram infecção fúngica na análise dos esfregaços foram tratados com nistatina tópica. Para os pacientes com hiperemia difusa que demonstraram nos exames de esfregaço outros patógenos além de fungos, o tratamento foi realizado com um agente tópico de ação antibiótica e antifúngica (Remiderm). Os pacientes com intolerância à nistatina foram tratados com anfotericina B e para os com queilite angular severa e infecção mista (bacteriana e fúngica), utilizou-se um creme preparado com várias substâncias ativas, incluindo nistatina, gramicidina, neomicina e triancinolona (Triadcortyl). Os pacientes foram avaliados após 1, 3, 6 e 12 meses da suspensão do tratamento. Os resultados demonstraram que os principais agentes etiológicos da estomatite protética foram o trauma causado pelas próteses e a infecção por *C. albicans*. Os pacientes com doenças debilitantes apresentaram maior predisposição à estomatite e a incidência foi maior em mulheres na fase de menopausa. A presença de alergias não demonstrou ser um fator etiológico para essa patologia. No entanto, segundo os autores, possíveis reações de hipersensibilidade na mucosa bucal podem ocorrer devido à presença de monômero residual nas resinas acrílicas das bases após a polimerização e à absorção de agentes de limpeza pelas irregularidades da superfície interna das próteses. Foi observado que 74% dos pacientes com estomatite protética não removiam as próteses da cavidade bucal no período noturno, o que foi associado a menor resistência dos tecidos bucais aos processos infecciosos. Os agentes antifúngicos utilizados (nistatina e anfotericina B) foram considerados efetivos para o tratamento da estomatite protética e a nistatina foi mais aceita quando administrada na forma de creme. O tratamento com anfotericina B foi considerado satisfatório para a maioria dos pacientes, com a vantagem de apresentar sabor mais agradável que a nistatina. O Triadcortyl foi sugerido como o tratamento mais efetivo para a queilite angular. A recorrência de infecção por *Candida* foi observada em 48% dos pacientes após 30 dias do término do tratamento. As avaliações após os tratamentos realizados também demonstraram que a infecção fúngica foi recorrente em cinco pacientes após 3 meses, em um paciente após 6 meses e em dois pacientes após 12 meses.

Em 1970, Davenport avaliou a distribuição e a concentração de associadas à estomatite protética. Foram selecionados pacientes usuários de próteses removíveis, 50 com estomatite protética e 50 sem alterações na mucosa como grupo controle. Exames citológicos por esfregaço foram obtidos da mucosa palatina e da superfície interna das próteses removíveis, parciais ou totais, de todos

os pacientes. Para diferenciar a *C. albicans* de outras espécies, amostras de saliva estimulada dos pacientes foram cultivadas em ágar cornmeal e soro de cavalo. A presença de *Candida* na mucosa palatina e na superfície interna das próteses foi também avaliada por meio de culturas em placas de ágar Sabouraud. Foram realizadas biópsias da mucosa palatina inflamada de dez pacientes. A análise dos esfregaços das próteses revelou a presença de leveduras em 94% dos pacientes com estomatite protética e em 30% dos pacientes do grupo controle. A avaliação quantitativa dos esfregaços evidenciou maior número de células de *Candida* nos esfregaços obtidos das próteses em relação aos obtidos na mucosa palatina. As culturas das amostras de saliva demonstraram a presença de *C. albicans* em 70% dos pacientes com estomatite protética e 14% do grupo controle. As culturas em ágar Sabouraud evidenciaram o mesmo padrão de distribuição de *Candida* obtido com os esfregaços. Não foram observadas células de *Candida* em nenhuma das secções das biópsias obtidas. O autor sugeriu que a estomatite protética está relacionada à proliferação de *Candida*, a qual é primariamente associada à presença de placa na superfície interna das próteses.

O estudo de Budtz-Jørgensen e Løe (1972) avaliou o efeito da desinfecção de próteses totais com clorexidina no tratamento de estomatite protética. Usuários de próteses totais (n= 53) com sinais clínicos de estomatite protética na mucosa palatina foram instruídos a realizar a imersão de suas próteses por 15 s, durante 14 dias em digluconato de clorexidina a 2% ou na solução placebo (água deionizada). Cada paciente foi avaliado por cinco vezes: antes, durante e ao término do tratamento e após uma e cinco semanas da suspensão do mesmo. A efetividade do tratamento foi avaliada clinicamente por fotografias do palato dos pacientes, exames citológicos por esfregaços obtidos da mucosa palatina e da língua e biópsias de sítios do palato dos pacientes antes e imediatamente após o término do tratamento. A análise dos esfregaços obtidos antes do tratamento demonstrou a presença de *Candida* spp. em 94% dos pacientes, sendo a *C. albicans* identificada em 90% dos casos. Após uma semana do término do tratamento, houve melhora clínica em 78% dos pacientes que realizaram a desinfecção das próteses com clorexidina. A solução de clorexidina promoveu eliminação das hifas de *Candida* spp. em 90% dos esfregaços obtidos da mucosa palatina dos pacientes após duas semanas do término do tratamento. No entanto, nesse período, as formas de blastóporos foram observadas em 75% dos esfregaços.

Antes do tratamento com clorexidina, 16 pacientes (59%) apresentaram hifas de *Candida* nos esfregaços obtidos da língua e, após o mesmo, somente cinco deles ainda continuaram com esse resultado. Porém, a presença de blastóporos foi observada em 78% dos esfregaços da língua após o tratamento com clorexidina. A solução placebo não apresentou efeitos sobre as células de *Candida* e não promoveu melhora clínica da inflamação da mucosa palatina dos pacientes. Histologicamente, o tratamento com clorexidina produziu uma redução significativa das alterações epiteliais, reduzindo o grau de infiltração leucocitária e o acúmulo de glicogênio. A recorrência de hifas de *Candida* foi observada nos esfregaços dos palatos da maioria dos pacientes (69%) imediatamente após o tratamento com clorexidina e, em todos eles, exceto um, após cinco semanas do término do mesmo. Nesse mesmo período de avaliação, foi observada a presença de hifas em 75% dos esfregaços da língua. O tratamento com clorexidina produziu alteração de cor no epitélio da língua (cor amarronzada) de dez pacientes e causou manchamento nas próteses de outros cinco.

Hennessey (1973) realizou vários pequenos estudos para avaliar as propriedades antibacterianas da clorexidina, usada tanto no tratamento como na prevenção de patologias bucais. O espectro bacteriostático do fármaco para diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas foi determinado pelo método convencional de diluição em ágar para a obtenção da MCI. Para as bactérias do tipo cocos, as MCIs variaram de 0,19 a 2,0 µg/mL. As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram as menos sensíveis à clorexidina (MCI ≥ 100 µg/mL), seguidas pelas de *Salmonella* spp., que apresentaram MCIs intermediárias (4,65 µg/mL). As cepas que exibiram menor sensibilidade à clorexidina foram as de *Escherichia coli* (MCI=0,93 µg/mL). Também foi observado que as MCIs foram dependentes do tamanho do inóculo, sendo necessárias concentrações superiores de fármacos quando maiores números de células foram testados. O autor também investigou a atividade bactericida da clorexidina para diferentes micro-organismos. Quando suspensões bacterianas foram expostas à clorexidina 0,02% por 10 min em temperatura ambiente, houve redução dos micro-organismos viáveis em 99,99% na maioria dos casos. A metade dessa concentração (0,01%) ainda foi efetiva em exercer atividade antibacteriana significativa. Esses testes foram realizados em água destilada, mas considerando a interferência dos fluidos biológicos sobre o potencial de ação de antimicrobianos, o autor avaliou o efeito da clorexidina em alguns meios

específicos. Para o mesmo tempo de exposição (10 min), quando o soro de cavalo foi utilizado ao invés da água, foi necessária uma concentração de clorexidina cerca de quatro vezes maior para produzir os mesmos efeitos sobre *P. aeruginosa*. A extensão da ação bacteriana da clorexidina também foi reduzida quando cepas de *Streptococcus mutans* foram cultivadas na presença de sacarose a 5%. Na tentativa de selecionar cepas resistentes de *E. coli* e *S. mutans*, o autor submeteu esses micro-organismos a várias exposições sucessivas de clorexidina e concluiu que esse resultado foi difícil de ser observado. Por outro lado, bactérias resistentes a ampicilina e estreptomicina foram facilmente encontradas. Esses achados laboratoriais foram confirmados in vivo com a observação da mesma susceptibilidade de micro-organismos intestinais de ratos a uma dose de 50 mg/kg de clorexidina administrada por sonda gástrica diariamente por 28 dias. Entretanto, uma dose diária de 100 mg/kg do fármaco pelo mesmo período rapidamente causou enterite letal nos animais. O autor ainda realizou um pequeno estudo in vivo com três pacientes e observou que o uso de um enxaguatório bucal contendo digluconato de clorexidina a 0,2%, duas vezes ao dia por sete semanas, resultou em uma pequena, mas significativa alteração na susceptibilidade dos micro-organismos salivares à ação bacteriostática do fármaco. Foi concluído que a clorexidina é um agente bactericida e bacteriostático de amplo espectro, embora seja mais eficaz contra bactérias gram-positivas. O autor sugeriu que a importância de se conhecer a susceptibilidade através da MCI está no fato de que doses subletais dos antimicrobianos podem levar ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes aos mesmos.

A importância da *C. albicans* na patogenia da estomatite protética foi discutida por Budtz-Jørgensen (1974). Segundo o autor, a presença de próteses removíveis parciais ou totais na cavidade bucal é considerada um fator predisponente primário para o desenvolvimento dessa patologia. Sua patogenia pode ser agravada pela infecção por *C. albicans*, comumente associada à utilização de próteses com bases acrílicas. Apesar de a infecção fúngica ser facilmente tratada, as recorrências são frequentes e o comprometimento de outras áreas da cavidade bucal, como língua e comissura labial, é habitualmente verificado. Em indivíduos saudáveis, a estomatite protética não é considerada uma condição patológica grave. Entretanto, a candidose bucal pode evoluir para quadros de infecções sistêmicas em pacientes debilitados, principalmente quando submetidos a

terapias prolongadas com antibióticos, corticosteróides ou medicamentos imunossupressores. Os efeitos patogênicos das espécies de *Candida* estão ligados à degradação da superfície epitelial da mucosa pela ação de enzimas e ao desenvolvimento de resposta hipersensitiva tardia, não sendo observada a penetração tecidual na mucosa palatina de pacientes infectados. As endotoxinas produzidas por *Candida* spp. podem agravar as lesões decorrentes do uso de próteses removíveis. Considerando a significância das espécies de *Candida* no desenvolvimento da estomatite protética, o autor sugeriu ser imprescindível prevenir a colonização da mucosa palatina e da superfície protética por estes micro-organismos. Entre as medidas de prevenção, foram citadas higienização adequada das próteses, cuidados com a higiene bucal, eliminação de traumas locais e remoção das próteses no período noturno. Para a recuperação das mucosas infectadas, a terapia antifúngica tópica pode ser recomendada, porém, para o tratamento de estomatite protética, é necessário que o método promova a eliminação de *Candida* spp. da superfície interna das próteses.

Em 1975, Olsen avaliou, isoladamente e em associação, os efeitos de terapias com clorexidina e anfotericina B sobre o biofilme fúngico de pacientes com estomatite protética. Foram selecionados 100 pacientes usuários de prótese total superior, com sinal de inflamação no palato e exames positivos para culturas fúngicas relativas à mucosa palatina e a superfície interna das próteses. Os pacientes foram divididos em cinco grupos, de acordo com os diferentes tratamentos adotados. O grupo 1 recebeu terapia oral placebo e foi instruído a imergir suas próteses apenas em água. O grupo 2 recebeu comprimidos de anfotericina B de 10 mg e fez imersão das próteses em água. Para o grupo 3, foi administrado comprimidos placebo e a imersão das próteses realizada em clorexidina a 2%. Já o grupo 4 utilizou comprimidos de anfotericina B e imersão das próteses em clorexidina a 2%. Para o grupo 5, foram administrados aos pacientes comprimidos de clorexidina a 5%, utilizando-se clorexidina a 2% para a imersão das próteses. As mesmas instruções terapêuticas foram dadas a todos os pacientes, os quais receberam 56 comprimidos de cada terapia e 1000 mL de cada solução para imersão das próteses. Os pacientes foram instruídos a não utilizarem outros métodos de higienização. Os exames clínicos e microbiológicos foram realizados no dia anterior ao tratamento e após 14 dias do início do mesmo, sendo a reincidência analisada 14 dias após o fim da terapia. Para a semeadura em ágar, foram

recolhidos materiais da superfície de toda a cavidade bucal dos pacientes bem como da superfície das próteses. Posteriormente, foram realizados esfregaços micológicos e as lâminas analisadas em microscópio ótico. Ao 14º dia de tratamento, a anfotericina B reduziu de forma significativa a quantidade de fungos na mucosa bucal, mas não alterou a colonização nas superfícies protéticas. A imersão em clorexidina resultou em redução significativa do número de micro-organismos, tanto na mucosa quanto nas próteses. Após 14 dias do término do tratamento, a flora microbiana dos pacientes foi restabelecida. Os resultados levaram à conclusão de que o tratamento da superfície da prótese é tão importante quanto o da mucosa, devido à contaminação dos materiais das bases protéticas.

Os fatores relacionados à etiologia e patogenia da candidose bucal, bem como os métodos para tratamento e profilaxia dessa infecção foram discutidos por Budtz-Jørgensen (1990). Segundo o autor, as espécies de *Candida* causam infecção por indução de hipersensibilidade ou produção de toxinas durante a invasão tecidual. A adesão das células microbianas às camadas epiteliais é condição determinante nos processos de colonização e infecção das superfícies mucosas por esses fungos. O processo de aderência in vitro de *Candida* spp. pode ser influenciada por diversos fatores relacionados ao micro-organismo (concentração, fase e meio de crescimento, espécies e cepas), às células epiteliais do hospedeiro e às condições ambientais (temperatura, concentração de íons de hidrogênio, bactérias e anticorpos). A *C. albicans*, a mais patogênica das espécies desse gênero, apresenta alta capacidade de se aderir firmemente às células epiteliais in vitro. Essa aderência parece envolver interações entre a porção protéica das nanoproteínas localizadas nas fibrilas superficiais da levedura e os receptores de glicosídeo das células epiteliais. O autor sugeriu que o processo de adesão de *C. albicans* in vitro pode ser favorecido pela incubação prévia de células epiteliais com certas espécies de bactérias bem como pela adição de carboidratos ao substrato. Além das interações específicas com as células epiteliais do hospedeiro, outro aspecto que deve ser considerado na patogenia da *C. albicans* são as interações não específicas de afinidade e ligação desse micro-organismo às resinas acrílicas das bases das próteses, o que frequentemente proporciona o desenvolvimento de estomatite protética. A presença de carboidratos pode ser considerada um importante fator na maioria dos casos de colonização de *Candida* spp. nas bases acrílicas das próteses imediatamente após a suspensão da terapia com antifúngicos.

Após a adesão e colonização, as células de *Candida* spp. invadem os tecidos pela ação de enzimas hidrolíticas. Com a invasão tecidual, inicia-se um processo de resposta inflamatória aguda caracterizada pela predominância de neutrófilos. As condições sistêmicas predisponentes para a candidose bucal envolvem fatores fisiológicos (idade avançada, infância, gravidez, menopausa), desordens endócrinas (diabetes, hipotireoidismo), deficiências nutricionais (deficiências de ferro, vitamina B e ácido fólico) e deficiências imunológicas ou imunossupressão (AIDS, corticoterapia, leucemia aguda). Entre as condições locais predisponentes para essa patologia foram citadas as seguintes: câncer bucal, xerostomia, antibióticos de amplo espectro, fumo, dieta rica em carboidratos, leucoplasias, uso de próteses, higiene bucal inadequada e traumas locais. O autor conclui que o tratamento para a estomatite protética deveria envolver cuidados com as próteses como higiene, remoção da cavidade bucal durante a noite e imersão em clorexidina e também terapia antifúngica tópica com nistatina, anfotericina B ou miconazol. A terapia com antifúngico sistêmico (fluconazol) deveria ser indicada apenas para os pacientes imunocomprometidos.

A eficácia antifúngica da nistatina, do acetato de clorexidina e de um polipeptídeo homólogo da histidina na superfície de uma resina acrílica para base de prótese foi avaliada in vitro por Spiechowicz et al. (1990). Trinta discos de resina acrílica termopolimerizável (20 mm x 1 mm) foram confeccionados e esterilizados com óxido de etileno para serem imersos nos antimicrobianos testados, simulando a armazenagem noturna das próteses removíveis em água. Metade (n=15) dos discos (pré-tratados) foi submetida aos tratamentos selecionados previamente à contaminação com *C. albicans*. Para isso, quatro discos foram armazenados por 8 h em 20 mL de um dos fármacos testados nas seguintes concentrações: nistatina de 100.000 U/mL (suspensão oral), gluconato de clorexidina a 0,12% (Peridex) e poli-L-histidina de 1 mg/mL solubilizada em ácido acético 0,04 M. Após esse período, os discos pré-tratados com os antimicrobianos juntamente com 15 discos adicionais sem tratamento prévio foram individualmente colocados em placas de Petri contendo *C. albicans* (10^7 células/mL) isolada de paciente com estomatite protética. Todos os discos inoculados foram mantidos em temperatura ambiente por 24 h. Após esse período, durante 8 h, seis discos pré-tratados foram expostos ao ar ambiente e seis armazenados em água destilada. Como controle, três discos pré-tratados e não contaminados foram também expostos ao ar por 8 h. Doze dos discos de resina

acrílica não pré-tratados foram primeiramente inoculados com *C. albicans* e, após enxague por 5 min, submetidos por 8 h aos mesmos procedimentos que os pré-tratados, ou seja, deixados ao ar, imersos em água destilada ou expostos a um dos antimicrobianos testados. Três discos não pré-tratados foram mantidos ao ar ambiente e serviram como controle. Para avaliar o efeito antifúngico dos fármacos, swabs orais foram friccionados na superfície de todos os discos de resina acrílica durante 1 min e, então, submetidos às diluições seriadas. O crescimento de *C. albicans* foi monitorado por um colorímetro em comprimento de onda de 600 nm. Foi evidenciado que, independentemente do momento do tratamento, a poly-L-histidina não inibiu a adesão e o crescimento de *C. albicans* tanto nos discos deixados ao ar quanto nos imersos em água por 8 h, o que foi atribuído à falta de aderência desse antimicrobiano à resina acrílica. Ao contrário desses resultados, a clorexidina aplicada nos discos antes ou após a contaminação com *C. albicans*, foi efetiva na prevenção da aderência e do crescimento fúngico à resina acrílica, mesmo após 8 dias. Tais resultados foram relacionados à rápida capacidade de união da clorexidina a esse substrato. O pré-tratamento com a nistatina apresentou resultados contraditórios haja vista que os discos secos ao ar demonstraram eficácia semelhante à da clorexidina. Entretanto, os discos pré-tratados e imersos em água não evidenciaram inibição fúngica efetiva, o que também foi observado quando a nistatina foi aplicada aos discos acrílicos após a contaminação com *C. albicans*. Segundo os autores, isso ocorreu porque a nistatina, durante o pré-tratamento provavelmente tenha formado uma fina camada sobre a superfície de resina acrílica, a qual foi removida com a imersão em água. Os autores concluíram que, entre os tratamentos testados e para todas as condições estudadas, o acetato de clorexidina a 0,12% foi o único capaz de eliminar a *C. albicans* da resina acrílica termopolimerizável para base de prótese.

Iacopino e Wathen (1992) discutiram, por meio de uma revisão de literatura, os principais fatores etiológicos, as técnicas de diagnóstico e os métodos de tratamento para estomatite protética e outras infecções bucais causadas por *Candida* spp. Segundo os autores, a colonização da cavidade bucal por *Candida* geralmente ocorre em associação a um fator predisponente que promova algum tipo de deficiência nos mecanismos imunológicos do indivíduo. Esses fatores podem ser locais tais como trauma causado pela prótese e xerostomia e também sistêmicos incluindo medicamentos (antibióticos, imunossupressores), regimes de tratamentos

(quimioterapia e radioterapia) e desordens (debilidade física, deficiências nutricionais, alterações endócrinas e imunológicas). A infecção por *Candida* pode ser controlada por terapias antifúngicas em indivíduos com boas condições de saúde bucal e geral. Entretanto, para os pacientes debilitados, imunocomprometidos ou portadores de doenças sistêmicas, a candidose bucal pode se tornar crônica e causar risco à vida. Os autores relataram que há várias doenças associadas a essa patologia entre as quais neutropenia, diabetes mellitus e desordens endócrinas. Quanto à morfologia, a *C. albicans* pode adotar forma de blastósporo (levedura) ou formas miceliais. Ambas as formas podem colonizar superfícies, mas apenas as miceliais são capazes de invadir tecidos. As hifas mais alongadas não são passíveis de fagocitose, sendo eliminadas por mecanismos relacionados às células gigantes. Os mecanismos de defesa do hospedeiro à colonização e invasão por *Candida* envolvem processos de confinamento e proliferação epitelial com posterior descamação. Esses mecanismos são conduzidos por células imunológicas mediadoras, que respondem à injúria tecidual com produção de citocinas. Assim, quando as células imunológicas mediadoras são comprometidas, ocorre o desenvolvimento do processo infeccioso. A forma mais comum de candidose bucal é a estomatite protética, patologia que acomete mais frequentemente a região palatina da mucosa bucal, embora outras superfícies que mantêm contato com as próteses também possam ser infectadas. A *C. albicans* pode ser responsável pelo início, pela manutenção e pela exacerbação da estomatite protética. O diagnóstico clínico dessa patologia é facilmente confirmado por cultura quantitativa e exame citológico por esfregaços. Para o tratamento de estomatite protética, a nistatina tópica pode ser utilizada, entretanto, seu gosto amargo pode causar náuseas e vômitos. Além disso, tem sido relatado que as espécies de *Candida* podem desenvolver resistência à nistatina. Outros fármacos podem ser também recomendados para o tratamento de candidose bucal, como o cetoconazol e outros derivados dos azóis. A higienização das próteses deve ser eficiente, podendo-se realizar a imersão em agentes de limpeza como clorexidina, ácido benzóico e enzimas. Considerando que a *C. albicans* pode proliferar, infectar e reinfectar os tecidos via bases acrílicas, os autores concluíram que o tratamento deveria ser primariamente direcionado à eliminação desses micro-organismos da superfície interna das próteses.

O objetivo da revisão da literatura realizada por Lombardi e Budtz-Jørgensen (1993) foi discutir os principais procedimentos adotados para o

tratamento da estomatite protética. Segundo os autores, o controle de placa microbiana na superfície interna das próteses removíveis, parciais ou totais, deve ser sempre indicado, independentemente da terapia adotada. A higienização inadequada das próteses é considerada um dos fatores etiológicos locais da estomatite protética. O uso contínuo das próteses também favorece o desenvolvimento da patologia, uma vez que prolonga o trauma local sobre a mucosa de contato. As próteses antigas também podem traumatizar a mucosa bucal em decorrência da falta de suporte promovida pela reabsorção do rebordo alveolar. Até que possam ser substituídas, próteses com condições inadequadas de suporte e estabilidade devem ser periodicamente reembasadas. A confecção de novas próteses deve ser somente realizada quando a mucosa de suporte estiver saudável e houver boas condições de higiene bucal. Os pacientes devem ser instruídos a remover suas próteses durante a noite e higienizá-las após cada refeição. Vários agentes antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento da estomatite protética. A escolha de um agente específico é determinada por diversos fatores, como interação medicamentosa, função dos órgãos vitais (toxicidade) e aceitação (tolerância) pelo paciente. A utilização de agentes sistêmicos deve ser limitada aos pacientes que não responderem à terapia tópica ou quando fatores sistêmicos predisponentes estiverem presentes (diabetes não controlada, neutropenia, disfunções imunológicas e endócrinas). Entre os agentes antifúngicos, a nistatina (Micotatin) deve ser utilizada apenas como tratamento tópico, pois é tóxica quando administrada parenteralmente. Devido ao gosto amargo, esse medicamento pode produzir efeitos colaterais como náuseas e intolerância. A anfotericina B pode ser administrada via intravenal (candidose sistêmica) ou como agente tópico (candidose superficial). No entanto, esse fármaco pode produzir efeitos hepatotóxicos e náuseas. O cetoconazol (Nizoral) é administrado sistemicamente, sendo indicado para os casos de candidose mucocutânea crônica em pacientes com imunodeficiências. Esse antifúngico é pouco absorvido na ausência de acidez gástrica e pode reduzir a ação de alguns antibióticos. O miconazol (Daktarin) é amplamente utilizado para o tratamento de candidose por apresentar ação fungicida e bacteriostática para micro-organismos gram-positivos, uma vez que bloqueia simultaneamente a síntese de esteróides e as proteínas das membranas das células microbianas. Esse fármaco também pode ser utilizado para o tratamento de lesões associadas à estomatite protética, como a queilite angular. O fluconazol (Diflucan)

pode ser indicado para o tratamento de candidose bucal em pacientes HIV-positivos, entretanto, pode produzir efeitos colaterais como desconforto gástrico e dor de cabeça. Além disso, o fluconazol pode não apresentar o efeito terapêutico desejado por causa da resistência desenvolvida por algumas espécies de *Candida*. Como tratamento adjunto, pode-se realizar a imersão das próteses em agentes de limpeza como hipoclorito de sódio, enzimas, peróxidos alcalinos e ácidos. A utilização de substâncias antimicrobianas como a clorexidina também pode ser uma alternativa para a redução da inflamação da mucosa acometida pela estomatite protética. De acordo com os autores, independentemente da terapia antifúngica e do tratamento adjunto selecionados, os pacientes devem ser instruídos quanto à importância da adoção dos procedimentos de higienização das próteses e remoção das mesmas no período noturno. Esses cuidados não atuam apenas no controle da infecção causada pela estomatite protética, mas também na sua prevenção.

A efetividade de uma solução de nistatina para imersão de próteses como método adjunto para o tratamento de estomatite protética foi avaliada por Banting, Greenhorn e McMinn (1995). Todos os pacientes receberam medicação antifúngica tópica (Nistatina) na forma de pastilhas, 3 vezes ao dia, durante 7 dias. As próteses totais dos pacientes foram imersas durante a noite em solução de nistatina ou água (controle) no mesmo período de tratamento com antifúngico tópico. Foram realizados exames citológicos por esfregaço da mucosa bucal e da superfície interna das próteses totais ao final do tratamento e após 1, 4 e 12 semanas do seu início. Os resultados demonstraram que, ao final do tratamento, todos os pacientes apresentaram melhora significativa dos sintomas e sinais clínicos de estomatite protética. No entanto, a presença de formas invasivas (hifas) de *C. albicans* foi observada na mucosa bucal e/ou superfície interna das próteses de aproximadamente 80% dos pacientes, independentemente da solução de imersão utilizada. A probabilidade de recorrência de estomatite protética (presença de hifas de *C. albicans*) ao longo das 12 semanas de avaliação foi de 66% para os pacientes que realizaram imersão das próteses em solução de nistatina e de 78% para aqueles as imergiram em água. Os autores concluíram que o tratamento foi efetivo para resolver os sintomas e sinais clínicos da estomatite protética, mas não para remover o agente etiológico da mucosa palatina e das próteses, o que resultou, na maioria dos casos, em recorrência da patologia.

O objetivo da revisão de literatura de Radford, Challacombe e Walter (1999) foi analisar o mecanismo e o significado clínico da adesão de *C. albicans* em materiais para bases de próteses em relação ao biofilme e à estomatite protética. Os autores discutiram a etiologia dessa patologia e relataram a participação de outros micro-organismos além da *C. albicans*. Observaram que as taxas de prevalência da estomatite protética foram constantemente variáveis entre os estudos, o que pode ser explicado pelas diferentes metodologias utilizadas e pelos diversos fatores etiológicos relacionados a essa infecção. Em alguns casos, a causa da estomatite protética parece estar associada a um biofilme não específico em combinação à presença de *C. albicans*. Segundo os autores, a formação de qualquer placa microbiana, sua relação com as bases das próteses e a colonização dessas por micro-organismos devem ser consideradas. Enfatizaram a importância da rugosidade superficial do substrato na adesão dos micro-organismos, havendo maior aderência em superfícies protéticas menos polidas. Por meio dos estudos revisados, os autores concluíram que a aderência in vitro da *C. albicans* aos materiais para bases de próteses removíveis está relacionada à capacidade hidrofóbica do micro-organismo e à rugosidade do substrato. Entretanto, relataram que o significado clínico para os resultados observados da literatura consultada e o mecanismo do desenvolvimento do biofilme formado por *C. albicans* ainda têm que ser entendidos.

Pires et al. (2002) avaliaram a associação entre estomatite protética e o fluxo salivar, bem como a quantificação e a identificação das espécies de *Candida*, antes e seis meses após a substituição de próteses totais superiores. Foram avaliados 77 pacientes, com idade entre 36 e 84 anos, sendo a maioria mulheres (63,6%). A estomatite protética foi classificada de acordo com os critérios de Newton e a higiene da prótese foi qualificada como boa, regular, deficiente ou inadequada. Para a determinação do fluxo salivar, amostras de saliva não estimulada foram coletadas dos pacientes durante 5 min. Alíquotas das amostras coletadas foram semeadas em ágar Sabouraud e, após 48 h de incubação, foi realizada a contagem de colônias viáveis (ufc/mL). As espécies de *Candida* foram identificadas pelos testes de tubo germinativo, produção de clamidósporos e assimilação e fermentação de carboidratos. Todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal após a substituição das próteses totais e não foram medicados, sendo que, após seis meses, retornaram para uma segunda avaliação na qual os mesmos procedimentos clínicos e laboratoriais realizados previamente foram repetidos. Os resultados

demonstraram que, na primeira avaliação, 50,6% dos pacientes apresentavam estomatite protética e 63% demonstravam higienização inadequada das próteses. Na segunda avaliação, a porcentagem de pacientes com estomatite protética foi reduzida a 18,2% e a higienização das próteses foi considerada regular em 100% dos casos. Em ambas as avaliações, a prevalência de estomatite protética foi maior em pacientes do gênero feminino. O fluxo salivar dos pacientes variou de 0,02 mL/min a 1,66 mL/min e foi semelhante nas duas avaliações. Espécies de *Candida* foram identificadas em 84,4% dos pacientes na primeira avaliação e em 79,2% na segunda, sendo a maioria mulheres. Todos os portadores de estomatite protética apresentaram *Candida* spp. na saliva, e o número de ufc/mL da maioria desses pacientes foi superior a 400. A *C. albicans* foi a espécie mais comum em ambas as avaliações (50%), e a associação mais encontrada foi entre esse micro-organismo e a *Candida tropicalis* (15,4%). Os autores concluíram que a substituição das próteses e a melhora da higiene bucal promoveram a resolução dos sinais clínicos de estomatite protética. Entretanto, a persistência de elevada contagem de *Candida* spp. na saliva dos pacientes deveria ser considerada como um fator importante na recorrência da patologia. Os autores sugeriram que a substituição periódica das próteses e as instruções adequadas de higiene bucal são fundamentais para prevenir o desenvolvimento da estomatite protética.

Rogers (2002) revisou a literatura com o propósito de estudar os mecanismos de ação de antifúngicos disponíveis e discutir a resistência aos fármacos pelos micro-organismos. Os antifúngicos da classe dos polienos, como a nistatina, possuem um amplo espectro de ação, podendo ser fungicidas e fungistáticos e, por serem tóxicos, seu uso foi restringido à administração tópica. O efeito inibitório da nistatina é resultado da interação de seus polienos com os esteróides da membrana plasmática do fungo, em especial o ergosterol. Isso leva à formação de poros ou canais na membrana que ocasionam a liberação de potássio e de outros componentes citoplasmáticos, causando a morte celular. Uma explicação possível para o desenvolvimento de resistência aos polienos é uma menor quantidade de ergosterol na membrana celular, mas os mecanismos genéticos envolvidos nesse processo ainda não são totalmente definidos. Os antifúngicos azólicos, como o miconazol, o cetoconazol e o itraconazol também agem diretamente na membrana plasmática, porém interferem principalmente na biossíntese do ergosterol, inibindo o citocromo P-450. Embora os azólicos exibam

atividade fungistática principalmente *in vitro*, podem ser fungicidas sob certas circunstâncias *in vivo*. A resistência a esse tipo de antifúngico pela *C. albicans* ocorre principalmente por uma mutação no gene ERG11, que impede ou diminui a ação do antifúngico na produção de ergosterol. De acordo com os achados da literatura, o autor sugeriu que a resistência aos medicamentos antifúngicos é de grande importância clínica e deve ser levada em consideração no tratamento específico de cada infecção.

A relação entre a presença de *C. albicans* e a estomatite protética foi avaliada por Barbeau et al. (2003). Foram selecionados 68 usuários de próteses totais superiores. O tipo de estomatite protética foi determinado de acordo com a classificação de Newton, bem como por uma classificação modificada, desenvolvida pelos autores. Essa última classificação foi utilizada para determinar tanto o tipo quanto a extensão da inflamação nos tecidos acometidos por essa patologia. Para a avaliação clínica, foram realizadas 3 fotografias da região palatina de cada paciente. As leveduras foram coletadas da mucosa palatina e da superfície interna das próteses com *swab* oral. As culturas das suspensões obtidas dos *swabs* foram realizadas em ágar Sabouraud. Para isolar as leveduras, foi adicionado cloranfenicol aos meios de cultura Sabouraud e Lee, sendo as colônias isoladas congeladas a – 80°C. Para a identificação das espécies de *Candida*, alíquotas das suspensões das colônias isoladas foram cultivadas em meio cromogênico (ChromAgar). Para a diferenciação final das espécies, as suspensões também foram submetidas à avaliação por um sistema comercial de identificação (ID *Candida*). Os resultados demonstraram que a presença de leveduras nas próteses não foi associada à estomatite protética de acordo com a classificação de Newton. Os maiores números de colônias e índices de placa nas próteses foram associados à maior extensão de inflamação, independentemente do tipo de estomatite protética segundo Newton. A presença de *C. albicans* e da associação de mais de uma espécie de *Candida* foi observada mais comumente nos usuários de próteses totais com estomatite protética. As espécies mais associadas com a *C. albicans* foram a *C. tropicalis* e a *Candida glabrata*. A utilização contínua das próteses e o fumo foram considerados fatores de risco associados à extensão da inflamação observada nos pacientes com estomatite protética. Os autores concluíram que a presença de leveduras nas próteses foi significativamente relacionada à extensão da inflamação e não ao tipo de estomatite protética segundo a classificação de Newton. Foi sugerido que a

colonização por *Candida* spp. foi favorecida pelo processo de inflamação causado pela estomatite protética e que, portanto, deveria ser considerada no diagnóstico e tratamento dessa patologia.

Coelho et al. (2004) determinaram a frequência de lesões bucais associadas ao uso de próteses em 305 pacientes. Os autores também verificaram a relação entre a frequência das lesões e a idade e o gênero dos pacientes bem como o tipo, o tempo de uso e o método de limpeza das próteses. Essas informações foram registradas em um questionário respondido pelos pacientes, que foram divididos em sete grupos de acordo com o tempo de uso da prótese. O exame clínico da cavidade bucal foi realizado por três patologistas previamente treinados e calibrados. Os autores observaram maior prevalência de lesões no gênero feminino (72%) em relação ao masculino (56%) e que a maioria das mulheres (60 a 70 anos) era mais idosa que os homens (50 a 60 anos). Do total de 444 próteses, 302 eram totais e 142 eram parciais removíveis. A maior parte dos pacientes utilizava prótese total superior (43,24%) há pelo menos 20 anos. Os usuários de próteses totais estavam na 6ª década de vida, enquanto os portadores de próteses parciais removíveis estavam entre a 3ª e a 5ª década. As lesões bucais predominantemente encontradas em usuários de próteses totais foram as seguintes: estomatite protética (atrófica e hiperplásica), hiperplasia inflamatória fibrosa, úlcera traumática, queilite angular e flacidez de rebordo. A candidose atrófica crônica (estomatite protética) foi a lesão mais frequente, sobretudo nos pacientes com tempo de uso das próteses entre 16 a 20 anos. O método mais comum de higienização foi escovação com dentifrício e escova dental (80,1%). Segundo os autores, a maior frequência de lesão em mulheres poderia ser atribuída à utilização das próteses por períodos maiores em relação aos homens devido a preocupações estéticas. Além disso, com a atrofia da mucosa bucal concomitante à diminuição da secreção ovariana durante ou após a menopausa, o epitélio bucal se torna mais susceptível a traumas e reações inflamatórias. Outro fator a ser considerado é que o tempo de uso das próteses é maior em idosos, que são mais relutantes em substituí-las. Essas próteses antigas podem promover maior acúmulo de placa microbiana, além de traumatizar a mucosa de suporte pela falta de adaptação. Os resultados obtidos sugeriram que as próteses removíveis, parciais ou totais, podem causar comumente vários tipos de lesões na mucosa bucal dos pacientes. De acordo com os autores, essas lesões poderiam ser prevenidas por meio de um programa de preservação

que avalie as condições das próteses e forneça as informações de higiene e manutenção da saúde bucal.

O objetivo do estudo de Baena-Monroy et al. (2005) foi avaliar a prevalência de *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *S. mutans* na mucosa palatina e na superfície interna das próteses totais de pacientes com e sem estomatite protética bem como estabelecer fatores predisponentes dessa patologia. Para medir o pH salivar, amostras de 2 mL de saliva foram coletadas de 105 pacientes. Além disso, o material presente na mucosa palatina e na superfície interna das próteses totais superiores dos pacientes foi coletado com algodão estéril. Para o isolamento e a identificação de *C. albicans*, foi utilizado um meio cromogênico (CandiSelect) específico para crescimento fúngico. Os meios seletivos selecionados para o isolamento e a identificação de *S. aureus* foram ágar Chapman ou ágar manitol salgado. O *S. mutans* foi identificado por meio de semeadura em placas de Petri contendo ágar mitis salivarius. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após essa identificação inicial das bactérias, foram realizadas as provas enzimáticas de catalase e coagulase. Os autores observaram colônias viáveis de *C. albicans* nas placas referentes à mucosa palatina de 54 pacientes, dos quais 43 apresentavam estomatite protética. As culturas em CandiSelect também demonstraram a presença desse micro-organismo na superfície interna de 70 próteses. O *S. aureus* foi isolado da mucosa palatina de 55 pacientes, sendo 42 desses portadores de estomatite protética. Esse micro-organismo também foi isolado da superfície interna de 52 próteses. As culturas da mucosa palatina de 71 pacientes demonstraram a presença de *S. mutans* e desses, apenas oito apresentaram estomatite protética. Os resultados também demonstraram elevada acidez do pH da saliva nos pacientes com estomatite protética bem como nos indivíduos que adotavam dieta rica em carboidratos. A presença simultânea de *C. albicans* e *S. aureus* foi observada na mucosa palatina de 39 pacientes do total de 50 que apresentavam estomatite protética. Essa infecção assim como a colonização microbiana da mucosa palatina e das próteses foram encontradas preferencialmente em indivíduos do gênero feminino e nos portadores de diabetes mellitus e hipertensão arterial, evidenciando a etiologia multifatorial desse tipo de candidose bucal. Os autores concluíram que o tratamento da estomatite protética deveria reduzir tanto a presença de fungos quanto a de bactérias uma vez que foi observada a presença de biofilmes mistos na

mucosa palatina e superfície interna das próteses totais de pacientes com essa patologia.

Pereira-Cenci et al. (2008) discutiram os fatores relativos à adesão e espécies de *Candida* associadas à estomatite protética em materiais para base de prótese. Os autores observaram que, embora exista um consenso sobre a importância das propriedades superficiais das próteses na adesão microbiana, há outros fatores relativos à infecção por *Candida* que têm se mostrado contraditórios. Os autores atribuíram essas divergências aos diferentes protocolos de pesquisa e análises isoladas dos fatores relacionados à estomatite protética pelos estudos científicos disponíveis. É preciso conhecer o mecanismo de adesão das células nas superfícies mucosas e protéticas, bem como a formação do biofilme para evitar ou ao menos reduzir a contaminação por esses fungos. Há evidências de que as espécies de *Candida* são capazes de aderir às resinas acrílicas das próteses, o que é considerado como o primeiro passo no processo de infecção. Essa aderência está diretamente relacionada às propriedades superficiais do substrato polimérico como energia livre, hidrofobicidade e rugosidade. A energia livre de superfície tem sido considerada um dos principais fatores relacionados à estomatite protética, sendo definida como a interação entre as forças de coesão e de adesão. Quanto maior a energia livre de superfície, maior a adesão celular. Outros fatores relacionados ao hospedeiro também devem ser levados em consideração no desenvolvimento da patologia como dieta, composição da saliva e imunologia. Uma maior adesão de outras espécies de *Candida* não-albicans pode ser atribuída à energia livre de superfície e à hidrofobicidade desses micro-organismos que parecem ser mais aderentes às resinas acrílicas por serem mais hidrofóbicos. A rugosidade é determinada pela média aritmética entre os valores de vales e picos de uma superfície, influenciando diretamente a aderência inicial do micro-organismo, o desenvolvimento do biofilme e a colonização microbiana. Superfícies mais rugosas geralmente apresentam maior número de leveduras, pois podem servir como um reservatório microbiano, aumentando a retenção do biofilme e sua resistência às forças de cisalhamento da escovação. A saliva pode ter um papel importante na prevenção da infecção, pois a formação de uma película salivar na superfície protética pode diminuir a rugosidade superficial e a energia livre de superfície, dificultando o processo de formação do biofilme. Materiais reembasadores para base de próteses, rígidos ou resilientes, têm sido amplamente utilizados com a finalidade

de distribuir as forças oclusais que podem causar danos aos tecidos paraprotéticos, além de atuarem na prevenção e tratamento de traumas na mucosa de suporte. Entretanto, a colonização por *Candida* spp. pode interferir nas propriedades de superfície desses materiais pelo aumento da rugosidade e pelas altas concentrações de exotoxinas e produtos metabólicos produzidos por esses fungos, o que resulta na redução da vida útil dos reembasadores. As espécies de *Candida* também interagem com outros tipos de micro-organismos presentes na cavidade bucal, formando com eles um biofilme complexo e de difícil remoção. O biofilme bucal não é uma mistura aleatória de espécies de micro-organismos, mas uma estrutura organizada que varia com o tempo, com as propriedades metabólicas das células e com a condição local. A análise à literatura consultada mostrou que a saliva tem um papel importante no processo de infecção, porém sua contribuição ainda não é totalmente esclarecida. Os autores enfatizaram a importância das bactérias na colonização de *Candida* em biofilmes, mecanismo este que ainda requer um significado clínico. Em conclusão, os autores sugeriram a necessidade de padronizar os procedimentos experimentais para preencher a lacuna entre os estudos in vitro e in vivo.

O estudo Neppelenbroek et al. (2008) avaliou a efetividade da desinfecção de próteses totais no tratamento de estomatite protética associada à *Candida* spp. Sessenta pacientes com estomatite protética foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento instituído: Controle- foram orientados a escovarem suas próteses com sabão de coco e dentífrico, deixando-as imersas em água durante a noite; Mw- as próteses totais superiores dos pacientes foram irradiadas por micro-ondas (650 W/ 6 min), três vezes por semana, durante 30 dias; MwMz- os pacientes receberam o mesmo tratamento do grupo Mw associado à aplicação tópica de miconazol três vezes ao dia, por 30 dias; Mz- apenas receberam terapia antifúngica tópica com miconazol de acordo com a prescrição indicada ao grupo MwMz. Antes do início do tratamento, exames citológicos por esfregaço e culturas micológicas quantitativas foram obtidos da superfície interna das próteses totais superiores e da mucosa palatina de suporte de todos os pacientes. Os esfregaços e as culturas foram repetidos durante (dia 15), ao final do tratamento (dia 30) e após a sua suspensão (dias 60 e 90). Para a avaliação clínica, foram realizadas fotografias da mucosa palatina dos pacientes em cada consulta. Utilizou-se o teste de qui-quadrado para determinar diferenças entre os tratamentos dos grupos de estudo. A influência de fatores predisponentes na efetividade dos

tratamentos também foi avaliada estatisticamente. Nos períodos durante (15 dias) e imediatamente após o tratamento (30 dias), os esfregaços citológicos e culturas quantitativas referentes à mucosa palatina e a superfície interna das próteses dos pacientes dos grupos Mw e MwMz não demonstraram formas miceliais e colônias viáveis de *Candida* spp. Em até 90 dias de avaliação, não foram observadas formas miceliais na mucosa palatina dos pacientes desses dois grupos. No entanto, cinco pacientes do grupo Mw (33,33%) e seis do MwMz (40%) demonstraram recorrência de formas miceliais e colônias de *Candida* spp., e essa diferença não foi estatisticamente significativa. Para esses pacientes com recorrência de ambos os grupos, o tempo de uso da mesma prótese total superior foi significativamente superior (39,4 anos) em comparação com aqueles que não apresentaram reinfecção (15,1 anos). As fotografias da mucosa palatina dos pacientes dos grupos Mw e MwMz demonstraram uma evidente e progressiva redução da inflamação ao longo das avaliações clínicas. A aplicação tópica de miconazol (Mz) promoveu uma melhora considerável na inflamação palatina, mas não eliminou as formas miceliais e as colônias de *Candida* spp., exceto para dois pacientes. Os exames clínicos e micológicos do grupo controle não evidenciaram redução da infecção fúngica em até 90 dias de avaliação. Os autores concluíram que a desinfecção das próteses totais superiores por micro-ondas foi efetiva para o tratamento da estomatite protética associada à *Candida* spp. Independentemente da associação à terapia antifúngica tópica, a recorrência de formas miceliais das espécies de *Candida* na superfície interna das próteses após a suspensão do tratamento foi significativamente reduzida nos pacientes cujas próteses foram submetidas à desinfecção por micro-ondas.

Em 2011, Marín Zuluaga, Gómez Velandia e Rueda Clauijo compararam os resultados do controle da estomatite protética por um condicionador tecidual (Coe-Confort) e um reembasador autopolimerizável rígido (Kooliner). Os autores se propuseram a buscar uma terapia alternativa para essa patologia e, ao mesmo tempo, obter informações sobre o tempo necessário para sua resolução. Quarenta e quatro usuários de prótese total superior com diagnóstico de estomatite protética foram selecionados. Um grupo de pacientes teve a prótese reembasada com Coe-Confort e outro com Kooliner, que foram substituídos semanalmente, durante 4 semanas. Inicialmente e a cada período de substituição dos materiais, foram realizadas fotografias oclusais digitais do palato de cada indivíduo. As imagens

foram obtidas por um cirurgião-dentista e o diagnóstico clínico estabelecido de forma cega por outro profissional. O diagnóstico foi comparado com as imagens, que foram entregues a um patologista para análise final. Tanto o condicionador tecidual quanto o reembasador rígido foram eficazes no controle da estomatite protética. Entretanto, o condicionador de tecido necessitou de um período de tempo significativamente maior para produzir os mesmos resultados que o reembasador. Em 26% dos casos, os pacientes com estomatite protética Tipo III de Newton tiveram os sinais de infecção resolvidos em até duas semanas. Os autores sugeriram que os materiais testados podem ser considerados como uma terapia alternativa para a estomatite protética e recomendaram estudos futuros para avaliar a mesma proposta com outros tipos materiais para base de prótese.

Salerno et al. (2011) fizeram uma revisão de literatura para descrever a associação de *Candida* com a estomatite protética. A *C. albicans* é uma levedura gram-positiva capaz de viver como comensal na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo a mais comumente encontrada em isolados clínicos. De acordo com alterações locais (traumas, pH da saliva, uso de próteses e presença de placa microbiana) e sistêmicas (diabetes, deficiências nutricionais, disfunções renais e xerostomia), as espécies de *Candida* podem se tornar virulentas, causando a infecção conhecida como candidose bucal. Tem sido demonstrado que a presença de próteses removíveis é um fator predisponente para o desenvolvimento desta infecção, visto que a *C. albicans* é capaz de se aderir à superfície protética tanto quanto à mucosa. Por isso o acúmulo de placa microbiana e uma higienização inadequada contribuem para a virulência dessa espécie de *Candida*, que é capaz de se proliferar em tecidos duros e moles da cavidade bucal, unindo-se a bactérias e formando um biofilme complexo e heterogêneo. Como estratégias terapêuticas, têm sido adotadas as medicações antifúngicas tópicas e/ou sistêmicas e a limpeza das próteses por ação mecânica e outros métodos como utilização de antissépticos, desinfetantes e irradiação por micro-ondas. A candidose pode se manifestar em diferentes sítios da cavidade bucal, estando presente em 60% dos usuários de prótese removível. Embora a *C. albicans* seja a espécie mais comumente associada a esta patologia, outras espécies como *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis* e, sobretudo, *C. glabrata* também tem sido encontradas com frequência em isolados clínicos. De acordo com os achados da literatura, os autores concluíram que o tratamento da candidose bucal e, em

especial, a estomatite protética, é complexo devido a sua etiologia multifatorial, sendo necessária a atuação em cada fator etiológico.

O estudo de Sanitá et al. (2011) comparou a prevalência de *Candida* spp. entre usuários de próteses totais portadores ou não de diabetes mellitus. Foram selecionados 90 pacientes saudáveis, sem diabetes ou estomatite protética como grupo controle, 80 pacientes não diabéticos e com diagnóstico de estomatite protética e 40 pacientes com estomatite protética e diabetes tipo 2 controlada. Os históricos médico e odontológico de cada paciente foram avaliados, tendo sido obtidas informações como idade, gênero, uso de medicamentos, uso de tabaco e tempo de uso da prótese. Exames bucais clínicos detalhados foram realizados pelo mesmo investigador e as características da mucosa de suporte foram classificadas de acordo com os critérios propostos por Newton: 0 (ausência de inflamação), tipo I (inflamação localizada simples), tipo II (inflamação generalizada simples) e tipo III (hiperplasia inflamatória). Amostras micológicas foram obtidas com *swab* oral da superfície interna das próteses totais superiores de todos os pacientes para a identificação da presença de *Candida* spp. Do material coletado, produziu-se uma suspensão que foi inoculada em CHROMagar e incubada a 30°C por 5 dias. As colônias foram então identificadas por testes bioquímicos e os resultados mostraram que a *C. albicans* foi a espécie predominante, com prevalência em 81,9% dos pacientes, seguida pela *C. tropicalis* e pela *C. glabrata*, com prevalência de 15,71% e 15,24%, respectivamente. Os autores observaram que as complexas interações entre estas três espécies não são bem definidas, mas os resultados sugeriram que uma relação sinérgica pode estar envolvida, aumentando o potencial patogênico dessa combinação. A prevalência dessas espécies de *Candida* foi significativamente maior nos grupos de pacientes com estomatite protética, quando comparados ao grupo controle. Outras espécies de *Candida* foram identificadas em todos os grupos, mas não foram encontradas diferenças entre pacientes diabéticos e saudáveis em relação à prevalência de *Candida* spp.

Mima et al. (2012) desenvolveram um estudo clínico randomizado para comparar a eficácia clínica e micológica da terapia fotodinâmica (PDT) com a terapia antifúngica tópica no tratamento da estomatite protética bem como identificar a prevalência das espécies de *Candida* envolvidas com essa patologia. Foram selecionados pacientes edêntulos, usuários de prótese total e com diagnóstico de estomatite protética (Faculdade de Odontologia de Araraquara), classificados de

acordo com os critérios de Newton. Os critérios de exclusão foram definidos com base nos fatores que pudessem influenciar a viabilidade da *Candida* spp.: diabetes, anemia, imunossupressão, radioterapia e/ou quimioterapia, administração de antibióticos, antifúngicos ou esteróides nos últimos três meses. Utilizou-se a randomização estratificada para a obtenção dos dois grupos de estudo (n=20) de forma semelhante em relação aos fatores de risco que poderiam influenciar no prognóstico (idade das próteses, tabagismo, uso de medicamentos, hábitos de higiene das próteses totais e uso noturno). Para os pacientes do grupo controle (NYT), foi administrada a suspensão oral de nistatina tópica (100.000 UI), 4 vezes ao dia, durante 15 dias. No grupo experimental (PDT), o palato e as próteses dos pacientes foram pulverizados com 500 mg/L de fotossensibilizador derivado da hematoporfirina (Photogem®) e, após 30 min de incubação, foram iluminados por um diodo emissor de luz a 455 nm, 3 vezes por semana, durante 15 dias. Adicionalmente, todos os pacientes foram orientados em relação à limpeza das próteses com escova e sabão de coco e à necessidade de remoção das mesmas durante a noite por todo o período do experimento (3 meses). Culturas micológicas quantitativas (UFC/mL) foram obtidas da mucosa palatina e da superfície interna das próteses totais e a severidade da infecção foi avaliada clinicamente por fotografias padronizadas dos palatos dos pacientes antes (0 dia), ao final (15 dias) e após 30, 60 e 90 dias do início do tratamento. Nesses mesmos períodos de avaliação, as espécies de *Candida* foram identificadas por testes bioquímicos nos dois grupos de tratamento. Os resultados demonstraram que ambas as terapias avaliadas reduziram significativamente os valores de UFC/mL de *Candida* spp. ao final do tratamento e após 30 dias do seu início. Apesar disso, a porcentagem do sucesso clínico demonstrada com a avaliação das fotografias foi maior para o grupo NYT (53%) em relação ao grupo PDT (45%). A espécie isolada mais prevalente em todos os períodos investigados foi a *C. albicans* (NYT=63,3%; PDT=54%), seguida respectivamente pela *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Os autores sugeriram que a terapia fotodinâmica proposta demonstrou ser tão efetiva para o tratamento da estomatite protética quanto a terapia convencional com nistatina tópica.

2.2 ADIÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM MATERIAIS PARA BASE DE PRÓTESE

Em 1978, Thomas e Nutt estudaram o efeito in vitro do condicionador de tecido Visco-gel modificado pela incorporação de nistatina ou anfotericina B sobre o crescimento de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Quatro combinações entre o Visco-gel e os fármacos foram obtidas a partir da adição de nistatina de 500.000 e 1.000.000 UI e anfotericina B de 10 e 20 mg. Os antifúngicos foram adicionados ao pó do material, que posteriormente foi manipulado conforme indicações do fabricante. Então, o material manipulado foi espalhado uniformemente em placas de Petri, sendo coberto com 15 mL de ágar Sabouraud. Um grupo controle foi obtido apenas com o meio de cultura. As placas foram semeadas com inóculos das espécies de *Candida*, em concentrações de 10^3 e 10^4 células/mL. As placas foram incubadas por um período variável entre 3 e 7 dias. Nesses períodos, as contagens de colônias foram realizadas, o meio substituído e uma nova cultura obtida para todas as placas. Durante os experimentos, foi observado que a anfotericina B incorporada ao Visco-gel não apresentou qualquer efetividade antifúngica sobre os micro-organismos e, por isso, esse fármaco foi posteriormente adicionado apenas ao meio de cultura. As porcentagens de inibição de todas as condições avaliadas foram calculadas. Os resultados mostraram que a anfotericina B tornou-se ineficaz quando misturada ao Visco-gel, mas quando utilizada isoladamente permaneceu ativa na inibição do crescimento fúngico. Ao longo do período de tempo avaliado, a mistura de nistatina com o condicionador tecidual foi efetiva na inibição do crescimento das espécies de *Candida*.

Em 1981, Addy realizou um estudo in vitro sobre o potencial de liberação de clorexidina em resinas acrílicas para base de próteses. Foram confeccionados corpos de prova circulares (25 x 3 mm) de duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (Trevalon e Croform) e um condicionador de tecido (Visco-gel), com ou sem incorporação de acetato de clorexidina nas concentrações de 2, 5 e 10%. Inicialmente, foi realizado um estudo piloto com clorexidina a 5% incorporada ao pó dos materiais, os quais demonstraram liberação do fármaco em nível antibacteriano (*S. mutans* em 24 h, de acordo com o método dos halos de inibição). Após esse período inicial, os corpos de prova foram reinoculados diariamente nas placas de Petri até que não houvesse mais inibição do crescimento bacteriano. A

liberação de fármaco foi também observada em água, simulando sua liberação na cavidade bucal em presença de saliva. Corpos de prova dos mesmos materiais foram obtidos com ou sem adição de fármaco, sendo três amostras de cada condição deixadas separadamente em frascos contendo 10 mL de água destilada a 37°C. Diariamente, a água da liberação dos fármacos era analisada espectrofotometricamente para comparação com os resultados obtidos em 24h. A cada semana, uma amostra de 150 µL da água destilada que continha os corpos de prova era inoculada em placas contendo *S. mutans* para incubação por 24 h a 37°C. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição eram mensurados. Também foram realizadas análises das superfícies dos corpos de prova em microscópio eletrônico de varredura (MEV) após polimento com lixa de granulação 1200 e irrigação com água destilada. Os resultados dos testes de halos de inibição de *S. mutans* mostraram que a liberação de clorexidina se manteve nas resinas acrílicas por até 32 dias e para o condicionador de tecido por 39 dias. Nenhuma inibição bacteriana foi observada nos grupos sem adição do fármaco. Nas leituras espectrofotométricas, observou-se que o nível de clorexidina liberada sofreu uma queda progressiva para todos os materiais avaliados. No entanto, os períodos de liberação aumentaram com maiores concentrações de fármaco de modo que a adição de acetato de clorexidina a 10% apresentou ação antibacteriana por um período superior a 100 dias. As análises em MEV demonstraram a presença do fármaco em toda a matriz polimérica para os corpos de prova não imersos em água e em apenas em suas superfícies para aqueles que foram imersos.

Addy e Handley, em 1981, estudaram algumas propriedades de uma resina acrílica termopolimerizável (Croform) e um condicionador tecidual (Visco-gel) após a incorporação de acetato de clorexidina. Concentrações de 2, 5 e 10% desse fármaco foram incorporadas ao pó dos materiais, que foram manipulados seguindo as recomendações do fabricante. Grupos controles sem adição de clorexidina foram obtidos nas condições avaliadas. Para a análise de perda de peso e absorção de água, os corpos de prova discoides (25 x 3 mm) foram submetidos a secagem até atingirem massa constante e depois imersos em água destilada para serem pesados três vezes por semana durante 87 dias. Para os testes de dureza e resistência à flexão, os corpos de prova dos materiais (70 x 2,5 e 10 mm) foram submetidos a cargas crescentes até o momento da fratura. As cargas de fratura e deflexão obtidas foram analisadas e, desses valores, obteve-se o módulo de elasticidade. Para a

resina acrílica (controle), a porcentagem de ganho de peso foi mais acentuada nos dez primeiros dias e, após 30 dias, praticamente não houve mais alterações. Nos corpos de prova de resina acrílica contendo clorexidina, o ganho de peso máximo também ocorreu nos dez primeiros dias, sendo verificada perda gradativa de peso após esse período. Todos os corpos de prova do condicionador tecidual apresentaram um progressivo aumento de peso ao longo do período de avaliação, embora o aumento tenha sido mais considerável durante 60 dias. A dureza e o módulo de elasticidade foram significativamente reduzidos na resina acrílica com adição de clorexidina. De acordo com os autores, as mudanças observadas seriam coerentes com o padrão de incorporação de clorexidina na matriz polimérica. Apesar dos resultados, a incorporação de clorexidina nos materiais avaliados é válida para reembasamento de próteses já existentes.

O trabalho de Quinn (1985) estudou o efeito da associação de miconazol (Daktarin) e cetoconazol (Nizoral) a três condicionadores teciduais (Ivoseal, Visco-gel e Fitt) na inibição do crescimento de *C. albicans*. Como parâmetro para comparação, foi utilizada a incorporação de nistatina e anfotericina B aos materiais resilientes. A proporção e a manipulação dos condicionadores de tecido seguiram as instruções dos fabricantes. Sete medidas do pó de cada material foram obtidas, sendo duas mantidas separadamente. Os comprimidos dos agentes antifúngicos foram triturados, pesados e misturados ao pó dos materiais de forma a produzir cinco combinações diferentes para cada um deles: nistatina (500.000 UI); anfotericina B (10 mg); anfotericina B (20 mg); miconazol (250 mg); cetoconazol (200 mg). O líquido dos materiais foi adicionado a cada mistura bem como às duas medidas separadas de pó, as quais foram utilizadas como controles, sem a incorporação de fármacos. Após a manipulação, as sete misturas de cada material foram vertidas e espalhadas uniformemente em placas de Petri estéreis. Como controle negativo, uma placa de cada material sem antifúngico não recebeu meio de cultura nem inoculação com *C. albicans*. Sobre a camada de material das outras seis placas, sendo cinco experimentais (com adição dos antifúngicos) e um controle positivo (sem adição de fármacos), foram vertidos 15 mL de ágar Sabouraud. As superfícies do ágar dessas seis placas de cada condicionador tecidual foram inoculadas com suspensões contendo 10^3 e 10^4 células/mL de *C. albicans* e incubadas a 37°C por 14 dias. Neste período, as colônias viáveis foram contadas três vezes por semana e o ágar substituído e reinoculado no 7º dia. Ao término dos

14 dias de incubação, uma contagem final das colônias foi realizada. Os autores selecionaram duas semanas como período de avaliação por ser este equivalente ao tempo médio de duração de um condicionador tecidual aplicado a uma prótese removível. Aos 14 dias, a verificação de menor quantidade de colônias nas placas experimentais em relação às controles foi considerada como indicativa de inibição de crescimento. Para comparar as várias combinações de antifúngicos e condicionadores, a diferença em número de colônias foi calculada como a porcentagem de inibição do crescimento fúngico. As placas do controle positivo de todos os materiais apresentaram o mesmo padrão de crescimento de *C. albicans* observado com as suspensões utilizadas na inoculação. Não houve crescimento fúngico visível nas placas do controle negativo dos três condicionadores de tecido. Para todos os materiais, não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos com anfotericina B em ambas as concentrações testadas. No 3º dia, uma discreta inibição de *C. albicans* foi observada nas placas de Visco-gel e Fitt com anfotericina B, ao passo que nas de Ivosel essa inibição foi maior. O crescimento fúngico nas placas de Visco-gel e Fitt com anfotericina B se igualou ao observado naquelas referentes ao controle positivo no 6º dia. Neste mesmo período, uma sutil inibição de *C. albicans* ainda era presente nas placas de Ivoseal, mas após 9 dias a anfotericina B perdeu seu efeito antifúngico. Todas as combinações dos materiais testados com nistatina, miconazol e cetoconazol foram inibitórias do crescimento fúngico ao longo dos 14 dias de avaliação. Segundo os autores, os resultados obtidos comprovaram a ineficácia da anfotericina B como agente antifúngico quando incorporada a materiais resilientes. Foi concluído que, quando adicionados aos condicionadores teciduais testados, o miconazol e o cetoconazol foram tão efetivos quanto a nistatina na inibição completa do crescimento fúngico visível.

Schneid (1992) investigou a viabilidade de um sistema de liberação de quatro agentes antifúngicos (clorexidina, clotrimazol, fluconazol e nistatina) para o tratamento da estomatite protética. Os antifúngicos foram adicionados ao material nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg para a clorexidina, o clotrimazol e o fluconazol e de 125, 250 e 500 mg para a nistatina. Os fármacos foram incorporados ao líquido (4 mL), sendo a manipulação com o pó (1,6 g) realizada de acordo com as instruções do fabricante. Como controle, utilizou-se o material sem adição de fármaco. Os corpos de prova constituíram-se de discos confeccionados com uma camada de 6 mm de condicionador tecidual sobre 2 mm de resina acrílica

termopolimerizável para base de prótese. A mensuração da dureza foi realizada diariamente por um durômetro Shore A, durante 14 dias. Nesse período, os corpos de prova ficaram armazenados em saliva artificial a 37°C. Para os testes de resistência à tração, foram confeccionadas barras cilíndricas do condicionador tecidual (5 mm) com resina acrílica aderida às suas extremidades. Utilizou-se uma máquina de ensaio universal para os ensaios dos corpos de prova e os valores foram obtidos em megapascal (MPa). As falhas resultantes da tração foram classificadas em adesivas ou coesivas. A avaliação da atividade antifúngica consistiu de placas de Petri contendo uma camada de condicionador tecidual impregnado com um dos antifúngicos, coberta por outra camada de ágar Sabouraud. Diariamente, por 16 dias, e semanalmente, por 42 dias, essas amostras eram inoculadas com suspensões de *C. albicans* contendo 10^2 células/mL para o fluconazol ou 10^5 células/mL para os demais fármacos. Avaliações quantitativas do crescimento fúngico eram realizadas cinco dias após cada inoculação. A dureza de todos os grupos experimentais aumentou proporcionalmente com a concentração de fármaco e o tempo de avaliação, entretanto, os valores obtidos foram considerados aceitáveis clinicamente (Shore A $\leq$ 49). As médias de resistência à tração aumentaram em todos os grupos experimentais e foram significativamente superiores às obtidas com o controle. Todas as falhas foram caracterizadas como coesivas. Os fármacos testados demonstraram inibição do crescimento de *C. albicans*, o que não ocorreu no grupo controle. Essa inibição foi mais acentuada com maiores concentrações dos fármacos, sendo reduzida ao longo do tempo de avaliação. Os autores concluíram que os quatro antifúngicos testados poderiam ser combinados com o condicionador tecidual para inibição fúngica. Foi sugerido que a modificação do material pelos fármacos não alterou clinicamente sua dureza e que, apesar de ter aumentado sua resistência à tração, não interferiu com a união à resina acrílica termopolimerizável.

Truhlar, Shay e Sohnle (1994) avaliaram a atividade antifúngica de reembasadores resilientes temporários para base de próteses removíveis modificados pela adição de nistatina, bem como o comportamento a longo prazo desse sistema em um ambiente aquoso. O pó da nistatina foi incorporado às proporções de pó dos materiais Lynal e Visco-gel, nas seguintes dosagens: 0 (controle), 100.000, 300.000, 500.000 e 1.000.000 UI. O líquido dosado (5 mL) de cada material foi adicionado à mistura de pós em uma placa de Petri. Após a

plastificação dos materiais, o meio de cultura ágar Sabouraud dextrose contendo cloranfericol e ciclohexamina foi dispensado sobre os mesmos em uma inclinação que permitiu espessuras de ágar variáveis entre 1 e 9 mm. A superfície do ágar foi inoculada com *swab* estéril contendo *C. albicans* (10^4 células/mL) e todas as placas foram incubadas por 48 h a 37°C. Então, a profundidade máxima na qual se observou inibição de *C. albicans* foi mensurada com sonda periodontal. Após esse procedimento, o ágar de cada placa foi removido da superfície do material, sendo repostado, reinoculado e novamente mensurado. Esse processo foi repetido aos 7, 10 e 14 dias. Para cada concentração de nistatina de ambos os materiais, três placas foram confeccionadas, sendo obtidas seis mensurações por placa. Para avaliar o efeito da exposição em condições aquosas, amostras dos materiais modificados com as mesmas concentrações de nistatina foram preparadas da forma como descrito previamente, cobertas com 40 mL de água destilada e incubadas a 37°C. Decorridos 4 dias, a água foi removida e sobre os materiais secos, o ágar inclinado foi aplicado, inoculado e as mensurações obtidas. Água destilada foi novamente dispensada sobre as mesmas placas e, após 14 dias a 37°C, o ágar foi substituído e inoculado para que novas mensurações fossem efetuadas ao final de um novo período de incubação de 48 h. Com o intuito de simular a constante alteração do ambiente bucal, foi realizado outro experimento com substituição da água das placas em 2, 4, 7, 10 e 14 dias. Ao final do tempo de exposição ao ambiente aquoso, a água foi removida das placas e o material resiliente presente no fundo das mesmas foi seco ao ar. Uma alíquota de 25 mL de ágar inclinado foi dispensada sobre o material de cada placa e, então, inoculada com *C. albicans*. Após 48 h a 37°C, o crescimento fúngico presente nas placas foi mensurado. A média das mensurações de todos os experimentos foi expressa em valores máximos de profundidade de inibição em ágar (mm). Em cada condição, uma placa controle sem adição de nistatina foi confeccionada. A atividade antifúngica da água removida das placas também foi avaliada. Para isso, 1 mL da água de cada amostra foi colocado em tubos de ensaio contendo 1 mL de caldo Sabouraud inoculado com 0,1 mL de *C. albicans* (10^3 células/mL). Posteriormente à incubação por 24 h, os tubos foram centrifugados e visualmente avaliados quanto à turvação, indicativa de crescimento fúngico. Para expressar as profundidades de ágar mensuradas em unidades disponíveis de nistatina, utilizou-se o método de calibração do dimetilsulfóxido (DMSO). Para ambos os materiais, os resultados revelaram significativa perda inicial

da atividade antifúngica das amostras, com a maior redução observada entre os dias 0 e 2. Entretanto, comparado ao Lynal, o material Visco-gel demonstrou menor perda inicial da atividade antifúngica até o dia 4. Entre os dias 7 e 14, os dois reembasadores demonstraram similarmente constantes efeitos inibitórios. Maiores concentrações de nistatina evidenciaram maior inibição do crescimento de *C. albicans*. Os controles de ambos os materiais apresentaram atividade antifúngica insignificante ao longo da avaliação. Quando expostos ao meio aquoso por 14 dias, os materiais demonstraram perda ainda maior das propriedades antifúngicas em relação às condições a seco, sobretudo para as concentrações de nistatina de 300.000 U e 500.000 U. No entanto, amostras de Lynal e Visco-gel contendo 1.000.000 U de nistatina não foram acentuadamente afetadas pelo ambiente aquoso. A análise visual da água removida das amostras de ambos os materiais com 1.000.000 U de nistatina revelou inibição de *C. albicans* até o dia 2, com perda de efetividade antifúngica após o dia 4. Foi concluído que a incorporação de nistatina nos materiais resilientes reembasadores testados permitiu a liberação de fármaco em até 14 dias. Com base nos resultados, os autores sugeriram que a metodologia empregada no estudo poderia ser considerada como uma modalidade terapêutica promissora para a estomatite protética, com a vantagem de menor necessidade participação ativa dos pacientes, sobretudo os idosos e institucionalizados.

A investigação de Matsuura et al. (1997) avaliou o efeito antimicrobiano do zeólito de prata (ZP), um aluminossilicato cristalino com íons de metal, quando incorporado a condicionadores teciduais (Visco-gel, GC Soft Liner, Fitt, Ivoseal e Shofu). Metade (n=9) dos corpos de prova (10 x 10 x 2,5 mm) com e sem adição do ZP foi utilizada para os testes antimicrobianos e metade foi imersa em saliva artificial por quatro semanas. Os corpos de prova foram inoculados com um dos micro-organismos avaliados (*C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e incubados por 24 h para a contagem de células viáveis. Os resultados mostraram que todos os corpos de prova modificados com ZP, imersos ou não em saliva, demonstraram ausência de crescimento viável para todos os patógenos testados. Para os corpos de prova controle (sem adição de ZP) e não armazenados em saliva, houve crescimento microbiano, exceto com o material Visco-gel. Nos controles imersos em saliva, a porcentagem das células viáveis de *C. albicans* foi superior àquela observada sem a imersão. Foi concluído que, independentemente da armazenagem em saliva, o ZP,

quando incorporado aos condicionadores de tecido testados, apresentou efeitos inibitórios sobre o crescimento fúngico e bacteriano por até quatro semanas.

O estudo de Chow, Matear e Lawrence (1999) avaliou a efetividade da incorporação de antifúngicos em condicionadores teciduais e o uso desse método para a liberação apropriada de fármacos e tratamento da estomatite protética. Os antifúngicos nistatina, fluconazol e itraconazol nas concentrações de 1, 3, 5, 7, 9 e 11%, com e sem saliva, foram incorporados aos materiais Coe Soft, Visco-gel e Fitt. Isolados clínicos de *C. albicans* deram origem a um inóculo com 10^3 células/mL. Uma alíquota de 0,1 mL do inóculo foi colocada em cada placa de cultura contendo Sabouraud para incubação a 37°C por 72 h. Foram obtidas cavidades nas placas inoculadas por meio de perfurações no ágar de 6 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade. Os materiais, modificados ou não pelos fármacos, foram injetados após a manipulação nas cavidades das placas de cultura e incubados por 14 dias para a mensuração diária dos halos de inibição (mm). Foi demonstrado que as placas contendo apenas os condicionadores teciduais não apresentaram inibição do crescimento fúngico. O pico de atividade dos materiais modificados foi entre 65 e 89 h, período após o qual se observou um platô. O itraconazol apresentou maior atividade fungicida do que o fluconazol ao passo que os menores diâmetros de halos de inibição foram observados com a nistatina. Para todos os fármacos, a concentração de 5% demonstrou maior efeito antifúngico que as misturas com 7, 9 e 11%. Os corpos de prova com saliva apresentaram maior inibição de *C. albicans* quando comparados àqueles sem esse meio, sendo as combinações mais efetivas as de itraconazol a 5% com Coe-soft e Fitt, respectivamente. Os autores concluíram que a incorporação de antifúngicos em condicionadores teciduais poderia ser utilizada para o tratamento da estomatite protética. Ainda, recomendaram a utilização de itraconazol a 5% incorporado aos materiais Coe Soft ou Fitt para avaliações clínicas. O pico de atividade antifúngica ao terceiro dia sugeriu que os materiais modificados com fármacos poderiam ser substituídos neste período para obter máxima eficácia do método.

Urban et al. (2006) estudaram a resistência à tração de um condicionador de tecido (Dura Conditioner) com e sem incorporação de nistatina, após 24 h e 7 dias de armazenagem em água. Corpos de prova em forma de haltere com área útil central retangular (33 x 6 x 3 mm) foram divididos em três grupos de estudo (n= 7) em cada período de armazenagem 37°C: G I (controle – sem nistatina), G II

(Nistatina 500.000 UI ou 82,25 mg) e G III (Nistatina 1.000.000 UI ou 164,5 mg). Então, os corpos de prova foram submetidos aos testes de tração em um extensômetro com velocidade de 40 mm/min. Em 24 h, os resultados para os grupos I, II e III foram de 634,29 gf, 561,92 gf e 547,30 gf, respectivamente. Em 7 dias foram de 536,68 gf pra G I, 467,50 pra G II e 500,62 para G III. Diferenças significativas foram observadas entre os períodos de armazenagem, mas não entre os grupos controle e os grupos experimentais. Em relação ao período de 24 h, a imersão em água por 7 dias causou redução na resistência à tração do material, independentemente da adição de nistatina. De acordo com os condições estudadas, foi possível concluir que, a incorporação de nistatina em até 1.000.000 UI não afetou a de resistência à tração do Dura Conditioner.

Amin et al. (2009) investigaram a liberação do fluconazol, da clorexidina e da combinação desses fármacos quando incorporados em resina acrílica autopolimerizável para bases de próteses. Ainda, foi avaliado o efeito da liberação dos agentes antimicrobianos sobre o crescimento de *C. albicans*. Foram confeccionados três grupos de corpos de prova da resina acrílica, que foi manipulada na proporção de 5 g do pó para 3 mL do monômero. No primeiro grupo, adicionou-se fluconazol em pó a 10% ao pó do material, anteriormente à sua manipulação. Da mesma forma, a clorexidina em pó a 10% foi incorporada à resina acrílica no segundo grupo. Para o terceiro grupo, ambos os fármacos foram acrescentados ao material na concentração de 5% cada. Após manipulação e plastificação inicial, a resina acrílica modificada pelos fármacos foi colocada em matrizes em forma de disco de 3,8 mm de diâmetro por 1 mm de espessura. Os corpos de prova obtidos foram imersos em água destilada por 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 1 dia, 2 dias, 4 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas. Uma análise da liberação de fármacos foi realizada na água de imersão dos corpos de prova por meio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Após cada período, alíquotas da água de imersão foram inoculadas em orifícios confeccionados em placas de Sabouraud semeadas com *C. albicans*, para que a inibição do crescimento fúngico fosse avaliada por meio da mensuração dos halos formados. Os resultados mostraram que os dois fármacos isolados ou em associação puderam ser adequadamente incorporados à resina acrílica uma vez que foi evidenciada a liberação dos mesmos em água destilada de forma contínua ao longo de 28 dias. Conclui-se que a inibição do crescimento de *C. albicans* foi observada em até 28

dias com a resina acrílica modificada pelo fluconazol, pela clorexidina e pela combinação de ambos os fármacos.

O padrão de incorporação de agentes antimicrobianos em um condicionador tecidual foi avaliado por Urban et al. (2009). Os autores utilizaram MEV para analisar se a adição dos fármacos em diferentes concentrações poderia promover mudanças morfológicas na superfície do material. Além disso, foi utilizada a espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDX) para identificar os antimicrobianos (nistatina, miconazol, cetoconazol e diacetato de clorexidina) e os componentes do condicionador tecidual (Softone). Ao pó do material, foram acrescentadas duas concentrações de cada fármaco testado: nistatina (500.000 e 1.000.000 U), miconazol (125 e 250 mg), cetoconazol (100 e 200 mg) e diacetato de clorexidina (5% e 10%). Para possibilitar comparações, um grupo sem adição de fármaco (controle) foi obtido. O líquido do material foi adicionado à mistura de pós e procedeu-se a manipulação de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, o material modificado ou não pela adição de fármaco foi colocado em matrizes de teflon de 36 mm x 7 mm x 6 mm e prensado entre duas placas de vidro até sua plastificação (10 min). Três áreas aleatórias dos corpos de prova de cada grupo (n = 5) foram selecionadas para as análises em MEV e EDX. Os corpos de prova contendo nistatina apresentaram distribuição uniforme de partículas com formas e tamanhos aleatórios, variando de 10 a 50 μm . As partículas de miconazol dispersas no material se mostraram irregulares, com dimensões entre 25 e 50 μm , enquanto as de cetoconazol eram esféricas e uniformes, variando entre 10 e 25 μm . A análise em MEV exibiu partículas disformes de clorexidina de até 50 μm . A presença de íons de enxofre e cálcio na matriz do condicionador tecidual foi observada na análise em EDX do controle e, conseqüentemente, em todos os demais grupos de estudo. Íons cloro foram também identificados nos grupos contendo miconazol e clorexidina. A quantidade de agentes antimicrobianos dispersos nas superfícies do material não foi significativamente alterada quando diferentes concentrações foram incorporadas. Os autores concluíram que o condicionador tecidual modificado demonstrou diferenças quanto à distribuição e tamanho das partículas dos agentes antimicrobianos adicionados à sua matriz plastificada, mas as concentrações dos fármacos não causaram mudanças morfológicas superficiais no material.

O estudo de Pavan et al. (2010) avaliou a adesão in vitro dos patógenos *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* em reembasadores macios para bases de próteses (Molloplast B e Ufi Gel P), bem como o efeito inibitório desses materiais sobre os micro-organismos. Inóculos dos micro-organismos foram confeccionados com 10^7 células/mL e corpos de prova dos materiais foram obtidos em matrizes de 15 x 15 x 6. Em placas de cultura inoculadas com os micro-organismos, foi colocado um corpo de prova de cada material. Então, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h para avaliar o efeito inibitório dos materiais sobre o crescimento microbiano. Como controle, utilizou-se uma placa inoculada contendo um disco de papel embebido em gluconato de clorexidina a 0,05%. Após o período de incubação, os halos de inibição foram mensurados (mm). Para o ensaio de aderência microbiana, corpos de prova dos materiais foram colocados individualmente em tubos de cultura contendo meio líquido de TSB inoculado, sendo incubados por 24 h. As amostras foram então transferidas para outros tubos contendo TSB estéril e agitadas por 1 min para a remoção das células aderidas. Diluições seriadas foram obtidas da solução resultante, sendo inoculadas em placas de Sabouraud para a contagem de colônias. Os testes de rugosidade superficial (Ra) foram realizados em três áreas de cada corpo de prova para avaliar a relação dessa propriedade com a adesão dos micro-organismos. Os resultados mostraram que nenhum dos materiais provocou a formação de halo de inibição nos testes de efeito inibitório, ao contrário da clorexidina utilizada como controle. Os números de colônias obtidos foram significativamente maiores para *C. albicans* do que para os outros micro-organismos testados. O Ufi Gel apresentou maior aderência de células que o Molloplast e não foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre a adesão de micro-organismos e a rugosidade superficial. Isso levou à conclusão de que a rugosidade superficial não é o único fator que interfere com a adesão de micro-organismos.

Radnai et al. (2010) analisaram a efetividade da incorporação de antifúngicos em gel a um condicionador de tecido na inibição in vitro do crescimento de *C. albicans*. O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi avaliado e comparado o efeito antifúngico de dois fármacos (clorexidina a 1% e miconazol 24 mg/mL) adicionados em diferentes concentrações a um condicionador tecidual (Visco-gel). Para permitir a incorporação dos géis antifúngicos, o material foi manipulado em uma proporção mais viscosa (3 g de pó para 1,8 mL de líquido) que a recomendada pelo fabricante. Ao material manipulado foi adicionado um dos géis

antifúngicos testados nas concentrações em volume de 5, 10, 15, 20 e 25%. A mistura resultante de cada condição experimental foi geleificada por 30 min entre duas placas de vidro com o objetivo de formar uma camada de 2 mm de espessura, da qual foram cortados discos de 9 mm de diâmetro. Foram obtidos seis discos de cada uma das concentrações dos antifúngicos utilizados. Como controle geral, o Visco-gel foi manipulado de acordo com as condições do fabricante (3 g de pó para 2,2 mL de líquido) e não recebeu a incorporação dos fármacos. Para a avaliação do efeito antifúngico, uma alíquota de 0,5 mL de *C. albicans* (NCYC 1467) na concentração de 10^7 células/mL foi semeada em placas de Petri contendo Sabouraud. Em cada placa inoculada, foram colocados quatro discos, sendo dois experimentais (um por fármaco em cada concentração), um controle geral e um controle positivo representado por um disco de papel de 5 mm de diâmetro impregnado com 10 µL de clorexidina a 0,2% (Corsodyl). Esses procedimentos foram realizados em duplicata e todas as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição do crescimento de *C. albicans* foram mensurados em milímetros com o auxílio de um paquímetro. Os diâmetros médios foram calculados a partir de três mensurações realizadas em cada disco. Na segunda etapa, a inibição de *C. albicans* pelo condicionador de tecido modificado pela adição do gel de miconazol a 20% foi avaliada após longos períodos de imersão em água. Discos experimentais e controles foram obtidos como descrito na etapa anterior bem como as placas de Sabouraud inoculadas com *C. albicans*. Os discos foram imersos individualmente em 10 mL de água destilada estéril e armazenados a 37°C. Três discos foram obtidos para cada um dos seguintes períodos de armazenagem: 1, 2, 4, 6 e 8 h; 1, 3, 6, 7, 14, 21 e 28 dias. Depois de serem removidos da água, os discos foram enxaguados para remoção de resíduos do antifúngico, suavemente secos em papéis absorventes e colocados nas placas de Sabouraud semeadas com *C. albicans*. Em cada placa, foram colocados três discos experimentais e um controle positivo (disco de papel de 5 mm de diâmetro impregnado com 10 µL de clorexidina a 0,2%). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e os halos de inibição foram mensurados como previamente descrito. Na primeira etapa, a inibição do crescimento de *C. albicans* não foi observada nos discos do controle geral e naqueles contendo clorexidina nas diversas concentrações utilizadas. Por isso, este antifúngico não foi avaliado na segunda etapa. Os diâmetros dos halos de inibição do Visco-gel contendo miconazol foram

proporcionalmente maiores com o aumento da concentração. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os halos médios das várias concentrações do antifúngico, exceto entre as de 15 e 20% (21,16 e 21,49 mm, respectivamente). Os discos de papel do controle positivo apresentaram halos de inibição com média de 8,06 mm. Na segunda fase, foi observada uma diminuição gradativa do efeito inibitório do miconazol ao longo do tempo de imersão em água. Ao final de 28 dias, a porcentagem de redução média de inibição atingiu 34%. O estudo mostrou que o gel de miconazol incorporado a um condicionador de tecido foi efetivo em inibir o crescimento de *C. albicans* in vitro, sendo o grau de inibição diretamente proporcional à concentração de fármaco. A ação antifúngica do miconazol foi diminuída ao longo do tempo de imersão em água. Os autores sugeriram que o método de inibição de *C. albicans* avaliado no estudo tem a vantagem de não requerer a colaboração do paciente.

A investigação de Falah-Tafit et al. (2010) teve por objetivo avaliar a eficácia in vitro da combinação de dois antifúngicos (nistatina e fluconazol) com um condicionador de tecido (Acrosoft) na adesão e colonização de *C. albicans*. Foram confeccionados oito corpos de prova (5 mm x 1 mm) do material para a adição dos agentes antifúngicos em uma das concentrações testadas (1, 3, 5 e 10%). Um grupo controle negativo, composto apenas pelo condicionador de tecido, também foi obtido. O inóculo de *C. albicans* foi produzido a uma concentração de 10^6 células/mL e colocado em poços de placas de cultura, nos quais foram imersos os corpos de prova para a incubação a 35°C por 48 h sob agitação de 150 rpm. Após esse período, os corpos de prova foram lavados cinco vezes com água estéril para remoção das células não aderidas e, então, imersos individualmente em tubos contendo solução salina. Os tubos foram deixados em ultrassom por 5 min para remover os micro-organismos aderidos à superfície do material. Do líquido de cada tubo foram realizadas dez diluições seriadas e 100 µL de cada suspensão foram semeados em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas por 48 h previamente à contagem de colônias de *C. albicans*. Todas as concentrações de nistatina foram eficazes na inibição da adesão celular e do crescimento de *C. albicans* na superfície do condicionador tecidual. Para o fluconazol, apenas a concentração de 10% promoveu completa inibição. De acordo com as condições do estudo, os autores concluíram que, quando incorporadas ao

condicionador de tecido, as concentrações 1 a 10% de nistatina e de 10% do fluconazol foram capazes de inibir a adesão e o crescimento fúngico.

O estudo de Bueno et al. (2012) avaliou a dureza Shore A de dois materiais resilientes temporários (Trusoft e Softone) para base de prótese modificados pela incorporação da MCI para o biofilme de *C. albicans* (SC 5314) de cinco fármacos utilizados no tratamento de estomatite protética. Corpos de prova retangulares (36 x 7 x 6 mm) dos materiais resilientes (n= 8) foram confeccionados sem (controle) ou com incorporação dos fármacos em suas MCIs (nistatina= 0,032 g/mL; clorexidina= 0,064 g/mL; cetoconazol= 0,128 g/mL; miconazol= 0,256 g/mL; itraconazol= 0,256 g/mL). Após armazenamento em água destilada a 37°C por 24 h, 7 e 14 dias, foram realizados os testes de dureza em durômetro Shore A (Woltest, GSD-709A). A adição dos antimicrobianos em ambos os materiais não alterou os valores de dureza ou resultou na sua diminuição em relação ao controle, exceto para a incorporação de miconazol ao Softone, que demonstrou significativamente maiores médias após 14 dias. Em todas as condições, as médias de dureza do Softone foram inferiores às aquelas observadas para o Trusoft. Os autores concluíram que a adição de todos os fármacos testados, exceto o miconazol no Softone, não causou alterações deletérias à dureza dos materiais resilientes no período avaliado.

Em 2012, Galitesi et al. avaliaram a resistência à tração de um reembasador resiliente temporário (Trusoft) modificado pelas MCIs de agentes antimicrobianos para biofilme de *C. albicans* (SC5314). Amostras em forma de halteres (n= 7) com área de secção transversal central (6 x 3 x 33 mm) foram confeccionadas para os grupos testados. Estes consistiram de corpos de prova de Trusoft sem (controle) ou com a incorporação das MCIs de três fármacos: nistatina= 0,032g/mL; diacetato de clorexidina= 0,064g/mL; cetoconazol= 0,128g/mL. Após a plastificação, as amostras foram imersas em água destilada a 37°C por 24 h, 7 e 14 dias e, então, testadas em tensão em máquina universal de ensaios (EMIC_DL-500_MF) a 40 mm/min para a determinação da resistência à tração e porcentagem de alongamento. Para todos os grupos, não houve diferença significativa nas médias de resistência à tração para o Trusoft após 14 dias de avaliação em comparação às 24h. A única diferença significativa para as médias de resistência à tração entre os grupos foi observada com o cetoconazol em 7 dias em relação aos demais períodos. Similarmente, o material modificado com cetoconazol demonstrou maiores porcentagens de alongamento após 14 dias que em 24 h. Nas condições in vitro testadas, foi

concluído que em comparação ao controle, a adição das MCIs de clorexidina e nistatina no Trusoft não resultou em efeitos deletérios em suas propriedades de resistência à tração e alongamento em até 14 dias de imersão em água.

Neppelenbroek et al. (2012a) avaliaram o efeito da incorporação de MCIs de agentes antimicrobianos para biofilme o biofilme de *C. albicans* (SC 5314) na rugosidade superficial de materiais resilientes temporários para base de próteses. Corpos de prova retangulares (36 x 7 x 6 mm) dos materiais resilientes (n= 8) foram confeccionados sem (controle) ou com incorporação dos fármacos em suas MCIs (nistatina= 0,032 g/mL; clorexidina= 0,064 g/mL; cetoconazol= 0,128 g/mL; miconazol= 0,256 g/mL; itraconazol= 0,256 g/mL). Após armazenamento em água destilada a 37°C por 24 h, 7 e 14 dias, os corpos de prova foram submetidos à análise da rugosidade superficial em rugosímetro (Surftest SJ-301). A incorporação de nistatina aos dois materiais, de clorexidina ao Trusoft e de cetoconazol ao Softone não alterou os valores de rugosidade em relação ao controle após 7 e 14 dias. Nesses períodos, o itraconazol aumentou a rugosidade dos materiais. Em relação às 24 h iniciais, o período de 14 dias mostrou que a rugosidade com a adição de nistatina, miconazol e cetoconazol foi reduzida para o Trusoft e não apresentou alteração para o Softone. Foi concluído que, no período final de avaliação, a adição de nistatina, miconazol e cetoconazol em ambos os reembasadores e de clorexidina no Trusoft não resultou em efeitos adversos à rugosidade superficial.

O objetivo do estudo de Neppelenbroek et al. (2012b) foi avaliar o efeito o efeito da incorporação de MCIs de agentes antimicrobianos para o biofilme de *C. albicans* (SC 5314) na resistência à tração e alongamento de um condicionador de tecido (Softone). Amostras em forma de halteres (n= 7) com área de secção transversal central (6 x 3 x 33 mm) foram confeccionadas para os grupos testados. Estes consistiram de corpos de prova de Trusoft sem (controle) ou com a incorporação das MCIs de três fármacos: nistatina= 0,032g/mL; diacetato de clorexidina= 0,064g/mL; cetoconazol= 0,128g/mL. Após a plastificação, as amostras foram imersas em água destilada a 37°C por 24 h, 7 e 14 dias e, então, testadas em tensão em máquina universal de ensaios (EMIC_DL-500_MF) a 40 mm/min para a determinação da resistência à tração e porcentagem de alongamento. Para todos os grupos, a resistência à tração do Softone após 14 dias foi significativamente maior que em 24 h. Independentemente da adição de fármaco, os corpos de prova após

14 dias demonstraram significativamente maiores porcentagens de alongamento que em 24 h e 7 dias de imersão em água. Os grupos modificados por clorexidina e nistatina apresentaram maiores porcentagens de alongamento, seguidos respectivamente pelo grupo modificado pelo cetoconazol e o controle. Foi concluído que em relação ao controle, a adição de todos os fármacos em suas MCIs não promoveu efeitos deletérios na resistência à tração do material resiliente ao longo do período de avaliação. Dentre as condições avaliadas, a incorporação de clorexidina e nistatina no Softone resultou em maiores porcentagens de alongamento.

O objetivo do trabalho de Bueno et al. (2013) foi avaliar a ação antimicrobiana e determinar a mínima concentração inibitória (MCI) de cinco fármacos utilizados no tratamento de estomatite protética, incorporados a reembasadores resilientes temporários. Um biofilme de *C. albicans* (SC 5314) foi formado sobre corpos de prova circulares (10 x 1 mm) dos materiais (Trusoft e Softone) modificados (experimentais) ou não (controle) pelos fármacos (nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e diacetato de clorexidina). Diferentes concentrações foram testadas para cada condição (n= 6) e a viabilidade celular determinada espectrofotometricamente pelo ensaio de redução de sais de tetrazólio- XTT, nos períodos de 24 h, 48 h, 7 e 14 dias. Foram definidas como MCIs as concentrações que inibiram 90% ou mais do crescimento fúngico. A confirmação da susceptibilidade fúngica às MCIs foi realizada pela análise em microscópio confocal de varredura a laser. As MCIs dos fármacos incorporados aos materiais resilientes foram: 0,032, 0,256, 0,128, 0,256 e 0,064 g/mL para nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e clorexidina, respectivamente. As imagens microscópicas das MCIs de nistatina, clorexidina e cetoconazol não evidenciaram células fúngicas viáveis. Os antimicrobianos incorporados aos materiais resilientes inibiram o crescimento fúngico em até 14 dias, e as menores MCIs foram obtidas com nistatina e clorexidina.

2.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS PARA BASE DE PRÓTESES

Nagem-Filho, Chiodi-Netto e Araujo (1973), avaliaram in vivo, por meio da implantação de amostras no tecido subcutâneo de ratos, a biocompatibilidade de uma resina acrílica termopolimerizável submetida a duas diferentes técnicas de polimento (convencional e químico). Amostras da resina acrílica (n= 42) em forma de cilindro (3 x 10 mm) foram divididas em dois grupos de acordo com o polimento, sendo o convencional realizado com pedra pomes e óxido de zinco e o químico com a imersão por 1 min em monômero em ebulição seguida por 5 min de jato de ar quente e 5 min de jato de ar frio. Após o polimento, os corpos de prova foram imersos em água destilada por 24 h e, em seguida, esterilizados. Para cada condição experimental, foram utilizados pelo menos dois ratos adultos, machos, pesando entre 200 e 300 g. Em cada animal, foram introduzidos três cilindros de resina acrílica por intermédio de um trocarte no tecido subcutâneo, sendo dois na região dorsal (pélvica e escapular) e um na região ventral. Os animais foram eutanasiados após 2, 16 ou 32 dias após a implantação das amostras. Por meio de uma incisão, os cilindros e a área circunjacente foram excisados para a obtenção dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina e subsequente análise histopatológica do tecido conjuntivo. Com base nos parâmetros das reações tissulares, os autores sugeriram que apesar do polimento químico gerar maior inflamação inicial em relação ao polimento convencional em virtude da alta quantidade de monômero residual, houve uma remissão desse efeito ao final dos 32 dias. Neste período, foi observada a formação de uma cápsula fibrosa ao redor dos cilindros implantados, o que levou aos autores concluírem que a resina acrílica termopolimerizável foi bem tolerada pelo tecido conjuntivo dos ratos independentemente do método de polimento testado.

Com o objetivo de avaliar as diferentes respostas teciduais de resinas acrílicas para base de prótese, Kallus (1984) implantou amostras desses materiais no tecido subcutâneo de porquinhos-da-índia. As três resinas acrílicas selecionadas, sendo duas autopolimerizáveis (Palacast e Quick 20) e uma termopolimerizável (SR 3/60), foram testadas no interior de tubos de polietileno (2 x 10 mm) com as extremidades abertas. Após a implantação das amostras, animais sensibilizados

com adjuvante completo de Freund (n= 27) foram divididos em três grupos distintos de acordo com o período experimental: 14 dias (n= 7), 30 dias (n= 7) e 90 dias (n= 6). Os 7 animais restantes não foram sensibilizados e receberam o implante subcutâneo das amostras pelo período de 30 dias, servindo como controle daqueles sensibilizados. No tecido subcutâneo de cada animal, foram implantados por uma única incisão três tubos contendo as diferentes resinas acrílicas testadas. Após a eutanásia, os tubos com o tecido circundante foram removidos para a realização das subsequentes etapas para obtenção das lâminas histológicas. As análises microscópicas compararam as secções finais dos tubos preenchidos com resina acrílica e as áreas de contato com os próprios tubos, utilizadas como controle. Nos períodos iniciais (14 e 30 dias), os autores observaram uma reação tecidual agressiva semelhante para os diferentes materiais testados, o que foi atribuído à maior concentração inicial de monômero residual. Como essa concentração diminuiu com o tempo, a reação tecidual foi também se apresentou menos acentuada ao final de 90 dias. A resina acrílica termopolimerizável foi considerada a mais biocompatível pelos autores por não resultarem em efeitos inflamatórios moderados ou severos nos tecidos subcutâneos dos animais após 12 semanas.

O estudo de Passeri e Carvalho (1985) teve por objetivo avaliar histologicamente a biocompatibilidade de três condicionadores de tecido (F.I.T.T., Lynal e Visco-gel) e de um material de moldagem à base de óxido de zinco e eugenol (Pasta Lysanda) em feridas intra-orais e cavidades cirúrgicas ósseas desenvolvidas em ratos. Foram criadas feridas no palato de 60 animais, na região próxima aos molares esquerdos, com dimensões aproximadas de 1 x 5 mm. Nessa área, foram introduzidos tubos de polietileno com 3 mm de diâmetro internamente e 1,5 mm de altura, os quais foram preenchidos com um dos materiais avaliados previamente à eutanásia dos animais (n= 3) em um dos quatro períodos experimentais: 2, 5, 10 e 15 dias. Em outros 60 animais, uma incisão de 10 mm foi realizada perpendicularmente à borda inferior da mandíbula, em direção ao ramo, expondo tecido ósseo. Nessa região, foram introduzidos os tubos de polietileno preenchidos com os materiais testados, que foram mantidos até a eutanásia dos animais (n= 3) em um dos seguintes períodos de avaliação: 4, 8, 16 e 30 dias. Para ambos os grupos de ratos, em cada período experimental, foram testados em três animais apenas os tubos de polietilenos (controle). Após remoção das maxilas e mandíbulas dos animais, as peças obtidas foram submetidas ao processamento

histológico, sendo coradas com hematoxilina e eosina. Em todos os grupos, após os quatro períodos experimentais, as bordas das feridas apresentaram processo necrótico e reabsorção óssea. Entretanto, esse processo ocorreu de uma maneira intensa para a pasta zincoenólica, que foi considerada como um material citotóxico. Todos os condicionadores teciduais foram isolados dos tecidos dos animais por uma cápsula fibrosa, o que é uma reação natural de corpo estranho. A espessura da cápsula e a população celular estão relacionadas ao grau de irritação dos materiais implantados, de forma que uma cápsula fina e livre de células inflamatórias é sugestiva de um material biocompatível. Com base nesses parâmetros, os autores sugeriram que os melhores resultados foram obtidos com os materiais Lynal e Visco-gel.

Okita e Hensten-Pettersen (1991) avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de quatro condicionadores de tecido (Coe Comfort, GC Soft-Liner, Kerr FITT e Visco-gel). Os efeitos citotóxicos dos materiais foram avaliados em células de fibroblastos de ratos (L929) por meio da técnica de difusão em ágar. Os corpos de prova (12 x 2 mm) dos condicionadores de tecido foram testados imediatamente após a confecção e após a incubação dos mesmos por 1 h, 24 h, 8 e 15 dias em meio mínimo essencial (Eagle) suplementado com soro fetal bovino ou antibióticos. Os testes foram realizados de acordo com as normas ISO (Technical Report 7405 – 1984), que de forma geral classificam como citotóxicos aqueles materiais que ocasionam lise celular. No período imediato e após 1 e 24 h de incubação, todos os materiais testados foram classificados como citotóxicos. Já nos períodos de 8 e 15 dias, o condicionadores teciduais Coe Comfort e Kerr FITT demonstraram maiores reações citotóxicas quando comparados aos materiais GC Soft-liner e Visco-gel. Os autores sugeriram que apesar dos condicionadores teciduais testados possuírem composição a base de metacrilato, a adição de outros componentes como etanol e plastificantes em diferentes formas e concentrações podem resultar no aumento da citotoxicidade dos mesmos. Embora os efeitos citotóxicos observados não tenham sido reduzidos ao final de 15 dias de avaliação, não excederam ao limiar recomendado para aplicação clínica.

Em 2001, Huang, Tai e Chang determinaram a citotoxicidade *in vitro* de três diferentes extratos de resina para base de prótese e compararam o efeito citotóxico desses materiais sobre células epiteliais orais humanas e fibroblastos humanos primários derivados da mucosa bucal. Foram confeccionados corpos de

prova em forma de discos em triplicatas para cada tipo de resina acrílica (2 x 7 x 35 mm), sendo uma autopolimerizável (Rebase), uma termopolimerizável (Lucitone 199) e uma fotopolimerizável (Triad). Os corpos de prova de cada material foram eluídos com meio de cultura por 1, 3 e 5 dias. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo teste colorimétrico do MTT (Mossmann's cytotoxicity test), desenvolvido para monitorar, por meio de espectrofotometria, a sobrevivência e proliferação in vitro de células de mamíferos. Os eluídos das três resinas acrílicas testadas foram considerados citotóxicos às duas linhagens celulares avaliadas. O contato com a resina fotopolimerizável nos períodos experimentais mais extensos resultou em efeitos citotóxicos mais evidentes nas células epiteliais orais humanas. De uma forma geral, para ambas as linhagens de células, os maiores valores de citotoxicidade foram obtidos com os extratos da resina autopolimerizável, seguida pelas resinas termo e fotopolimerizável, respectivamente. Os resultados demonstraram os efeitos citotóxicos observados foram dependentes do tipo de resina acrílica para base de prótese e da linhagem celular avaliada.

Lefebvre et al. (2001) desenvolveram um estudo para avaliar se a adição de um aditivo contendo triclosan (Microban) a um reembasador resiliente para base de prótese causaria efeito inibitório no crescimento de *C. albicans* e afetaria a citotoxicidade in vitro desse material. Para a confecção dos corpos de prova circulares (5 x 1 mm), obtidos a partir de matrizes de poliéster, uma parte de Microban foi adicionada em oitenta partes do PermaSoft de forma asséptica. Após a polimerização, três camadas do selante do material foram aplicadas nos corpos de prova, os quais, em seguida, foram mantidos em saliva artificial estéril durante 5 dias devido à presença componentes (ftalatos) que poderiam interferir na ação do Microban. Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas linhagens de células de fibroblastos de ratos, sendo a atividade da desidrogenase succínica (SDH), que reflete função mitocondrial e produção de energia celular, avaliada por meio do ensaio colorimétrico MTT. A avaliação do crescimento fúngico na superfície e região interna dos corpos de prova do material reembasador experimental, associado ao Microban (n= 6) ou controle, sem Microban (n= 6), foi realizada por meio da quantificação celular de *C. albicans* a partir do método da diluição seriada em meio Sabouraud. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à citotoxicidade e inibição do crescimento fúngico superficial entre os corpos de prova do reembasador sem ou com Microban. Não foram detectadas colônias viáveis de *C.*

albicans na região interna do material, independentemente da adição de Microban. Os autores sugeriram que resultados diferentes poderiam ter sido obtidos em relação à citotoxicidade com a utilização de outros métodos, inclusive *in vivo*. A inibição fúngica semelhante para os grupos com e sem Microban foi atribuída aos autores à baixa solubilidade do triclosan e ao fato desse aditivo estar em contato com as amostras por apenas 24 h, embora esse seja o tempo recomendado pelo fabricante. A inexistência de colônias viáveis internamente nos corpos de prova foi relacionada à superfície lisa que se formou pela utilização das matrizes de poliéster e da aplicação de selante, dificultando a penetração dos micro-organismos. Os autores ressaltaram que isso não é verificado para um reembasador resiliente após alguns dias em meio bucal haja vista que o mesmo se torna endurecido e áspero.

Em 2006, Campanha et al. avaliaram a citotoxicidade de reembasadores autopolimerizáveis rígidos para base de próteses após diferentes tratamentos de polimerização complementar (micro-ondas e banho em água). Corpos de prova (n= 9) circulares (10 x 1 mm) foram obtidos para os seis materiais selecionados: Kooliner, Duraliner II, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard, New Truliner e Light Liner. Para avaliação dos efeitos dos tratamentos, os corpos de prova foram subdivididos em: G1- sem tratamento complementar, G2- polimerização complementar em micro-ondas e G3- tratamento pós-polimerização em banho em água à 55°C por 10 min. Após os tratamentos, os corpos de prova foram imersos em cuba ultrasônica por 20 min em água destilada e, depois de secos, mantidos por mais 20 min sob luz ultravioleta para eventual descontaminação microbiana. Para avaliação da citotoxicidade foram realizadas as análises *in vitro* do MTT e da incorporação de ³H-timidina radioativa em fibroblastos de ratos (L929). Os resultados encontrados na análise de ³H-timidina divergiram das expectativas dos autores, pois a biocompatibilidade reembasadores rígidos testados, exceto pelo Ufi Gel, foi afetada negativamente pelos tratamentos de polimerização complementar. Já a análise do MTT demonstrou não haver correlação significativa entre a citotoxicidade desses materiais e os tratamentos complementares avaliados.

Ozdemir, Ylmaz e Ylmaz (2009) avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de cinco reembasadores resilientes, dois à base de resina acrílica (Coe-Soft e Visco-gel) e três à base de silicone (Ufi Gel P, Softliner e Molloplast-B). Para cada material, 16 corpos de prova circulares (10 x 1,5 mm) foram obtidos e mantidos em meio mínimo essencial (Eagle) a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5% e ar a 95%. Os corpos

de prova foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n= 4), de acordo com o tempo de incubação (24, 48, 72 e 96 h). Após cada período de incubação, as células de fibroblastos de ratos (L929) eram expostas aos extratos dos materiais testados, sendo a citotoxicidade avaliada pelo método do MTT. Os resultados demonstraram que o Coe-Soft foi citotóxico em todos os períodos de incubação. Apesar do Softliner não apresentar citotoxicidade em 24, 48 e 72 h, demonstrou ser citotóxicos após 96 h de incubação. Os materiais Visco-gel, Ufi Gel P, e Molloplast-B mostraram maiores níveis de viabilidade celular em todos os períodos de incubação. Apesar das limitações do estudo, os autores sugeriram que o teste MTT foi eficaz para essa avaliação da citotoxicidade dos reembasadores resilientes in vitro, mas que é necessário ter cautela para extrapolar os resultados, pois em situações clínicas os efeitos celulares não são tão agressivos como in vitro.

Chaves et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade dos monômeros isobutil metacrilato (IBMA) e 1,6-hexanediol dimetacrilato (1,6 HDMA), do plastificante dibutil-n-ftalato (DBNP) e dos ácidos metacrilato (MA) e benzóico (BA) em concentrações máximas liberadas por resinas acrílicas para reembasamento imediato. Os efeitos citotóxicos foram avaliados pelos métodos do MTT e da incorporação de ³H-timidina radioativa após as células terem sido expostas aos componentes testados nas diferentes concentrações por 24 h. As concentrações de cada substância avaliada foram classificadas de acordo com a viabilidade celular, em relação ao grupo controle: acima de 75% - não citotóxica; entre 25 e 50%, - discretamente citotóxica; abaixo de 25% - intensamente citotóxica. Segundo os autores, apesar do método colorimétrico do MTT não utilizar radioisótopos, apresentar menores variações e ser vastamente empregado para avaliar a citotoxicidade de polímeros odontológicos, foi menos preciso que o método da timidina para quantificar a viabilidade celular uma vez que a atividade mitocondrial (MTT) nas células L929 foi menos afetada pelas substâncias do que a síntese de DNA (timidina). Os autores sugeriram cautela ao extrapolar os resultados obtidos diretamente para aplicabilidade clínica, pois os efeitos de testes in vitro, diretamente realizados em células, são mais acentuados do em condições bucais in vivo. Entretanto, os dados obtidos in vitro podem orientar os profissionais na escolha de um reembasador para base de prótese com componentes e subprodutos menos citotóxicos aos pacientes.

O estudo de Tay et al. (2012) foi desenvolvido para avaliar o efeito da armazenagem em água e tratamento térmico na citotoxicidade de materiais reembasadores resilientes. Doze corpos de prova circulares (10 x 1 mm) de cada material, sendo quatro reembasadores resilientes (Dentusoft, Dentuflex, Trusoft e Ufi-Gel-P) e uma resina termopolimerizável para base de prótese (Lucitone 550), foram divididos em quatro grupos: GN (sem tratamento ou armazenamento em água), G24 (armazenamento em água destilada 37°C por 24 h), G48 (armazenamento em água destilada 37°C por 48 h) e G HW (armazenamento em água destilada a 55°C por 10 min). Para a análise de citotoxicidade in vitro, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de rato (L929) propagada em meio mínimo essencial (Eagle). A cultura foi mantida a 37°C em uma atmosfera de CO² a 5% e ar a 95%, sendo incubada por 24 h para lixiviação das substâncias tóxicas para o meio. A citotoxicidade foi analisada pelo método da incorporação de ³H-timidina radioativa que quantifica a viabilidade celular (síntese de DNA). Os resultados demonstraram, em todas as condições experimentais, efeito não citotóxico para o Ufi-Gel P, ligeiramente citotóxico para o Trusoft e moderadamente tóxico para o Dentuflex. O material Dentusoft apresentou efeito variando entre ligeiramente citotóxico e não citotóxico. A resina termopolimerizável Lucitone 550 demonstrou efeito não citotóxico quando armazenada em água por 48 h, mas em 24 h foi considerada ligeiramente citotóxica, apresentando cerca de 50% da viabilidade das células. Os autores sugeriram que o tratamento térmico e armazenamento em água não influenciaram a citotoxicidade dos reembasadores resilientes testados.

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS COM UTILIZAÇÃO DE DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS EM RATOS

Em 1978, Olsen e Bondevik desenvolveram um modelo experimental para avaliar a possibilidade de indução de estomatite protética em ratos por meio de placas acrílicas maxilares inoculadas com *C. albicans* e retidas ao palato por bandas ortodônticas ao redor dos incisivos. Os 38 ratos machos, albinos, Wistar foram divididos em duas séries de experimentos com um período de observação de 14 dias. Cada série foi constituída de quatro grupos de estudo, sendo um controle e três experimentais. Os animais foram alojados em gaiolas separadas de acordo com os grupos e receberam alimentação pastosa constituída de pellets de ração solubilizados em água. A *C. albicans* utilizada foi obtida da superfície interna da prótese total superior de um paciente portador de estomatite protética. No grupo inoculação, a superfície do palato dos ratos foi inoculada com *C. albicans* com o auxílio de uma espátula de metal. No grupo placa + inoculação, a superfície interna das placas acrílicas foi inoculada ao passo que no grupo placa, os dispositivos acrílicos foram testados sem a inoculação fúngica. O grupo controle constituiu de animais não submetidos aos tratamentos testados (placa e/ou inoculação). Os dispositivos acrílicos com extensão até a superfície distal do último molar foram confeccionados a partir de maxilas fixadas em formaldeído de ratos compatíveis aos do experimento. As placas acrílicas foram retidas por uma alça metálica ao redor dos incisivos centrais, semelhante a uma banda ortodôntica soldada. Para evitar o deslocamento das placas no sentido cérvico-incisal, foram realizados entalhes bilaterais nas superfícies externas dos incisivos superiores dos animais. Todos os dispositivos acrílicos foram removidos após uma semana para a realização dos esfregaços e fotografias intra-bucais. Os esfregaços foram coletados da mucosa palatina na série I e da superfície interna das placas acrílicas na série II. Antes do reposicionamento das placas, as mucosas palatinas dos animais foram fotografadas e avaliadas clinicamente. As placas acrílicas reposicionadas foram mantidas em posição até completar o período de observação de 14 dias. Após esse período, as cabeças dos ratos foram fixadas e desmineralizadas. As mucosas palatinas foram divididas na linha média e excisadas em duas partes para a obtenção das amostras histológicas e inclusão em parafina. Dos blocos foram obtidos cortes histológicos

longitudinais ou transversais de 5 µm, sendo processadas 30 seções de cada amostra. Antes do experimento, 30 dos 38 ratos testados possuíam cultura positiva para *C. albicans*, não tendo sido identificada nenhuma outra espécie fúngica. Nos esfregaços iniciais foi observada a presença de blastóporos e não houve evidências de hifas. Após os períodos de 7 e 14 dias evidenciou-se de maneira mais pronunciada a transformação de blastóporos em hifas no grupo placa + inoculação, embora não tenha sido observada invasão epitelial. Antes do experimento, as mucosas palatinas dos ratos apresentavam-se com aspectos saudáveis, mas após uma semana foi observada uma inflamação simples generalizada para a maioria dos animais dos grupos experimentais, sendo mais acentuada e persistente no grupo placa + inoculação. Não foram verificados sinais clínicos de candidose pseudomembranosa. Quanto à análise histopatológica, foram observadas maiores alterações para o grupo placa + inoculação, tais como paraqueratose, hiperplasia epitelial e atrofia, infiltração de leucócitos subepitelial e formação de abscessos. Houve perda de peso inicial nos animais que utilizaram as placas acrílicas. Os autores concluíram que o modelo experimental em ratos Wistar testado no estudo pode ser utilizado no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à estomatite protética.

Shakir, Martin e Smith (1981) reproduziram a metodologia experimental de indução de estomatite protética em ratos desenvolvida anteriormente (OLSEN; BONDEVIK, 1978), porém estendendo o período de avaliação para seis semanas, ao invés de duas. Os autores também objetivaram avaliar se a remoção das placas acrílicas da cavidade bucal dos ratos resultaria em resolução da candidose na mucosa palatina. Para os dois experimentos realizados, foram utilizados um total de 77 setenta e sete ratos Wistar, machos, albinos, pesando aproximadamente 350 g. No experimento 1, 53 animais foram subdivididos em quatro grupos. No grupo 1 (n= 25), as placas de resina acrílica autopolimerizável obtidas a partir de um modelo mestre proveniente da moldagem de um rato foram cimentadas nos incisivos superiores dos animais com resina acrílica autopolimerizável. Nesses dentes, foram realizados entalhes nas superfícies disto-palatinas para melhorar a retenção das placas. Previamente a cimentação dos dispositivos, foi realizada a inoculação de *C. albicans* na mucosa palatina e superfície interna das placas acrílicas. Os animais foram eutanasiados após 1 (n= 5), 2 (n= 5), 4 (n= 5) e 6 semanas (n= 10) decorrentes da inoculação. No grupo 2 (n= 12), foram instaladas placas acrílicas

palatinas, porém sem inoculação fúngica, sendo três animais eutanasiados em cada um dos períodos de avaliação utilizados para o grupo 1. No grupo 3 (n= 8), foi realizado apenas o procedimento de inoculação e o grupo 4 (n= 8), considerado como controle, não foi submetido a nenhum tratamento. Para esses dois grupos (3 e 4), a eutanásia de dois animais foi realizada em cada um dos períodos de avaliação. No experimento 2 (n= 24), os animais foram divididos em dois grupos distintos (n= 12), ambos com utilização das placas de resina acrílica conforme descrito no experimento 1. Em um desses grupos foi realizada a inoculação da superfície interna das placas com a suspensão de *C. albicans*. Após 4 semanas, todas as placas foram removidas e 9 animais (5 inoculados e 4 não-inoculados) foram eutanasiados. Outros 11 animais foram eutanasiados após 2 semanas adicionais de avaliação. Após a eutanásia de todos os grupos, foi realizada a decapitação dos animais, sendo as maxilas fixadas. A mucosa palatina foi então cuidadosamente removida do osso subjacente a partir da superfície dos incisivos regressando à junção entre palato mole e duro, que foi dividida em várias seções, processadas histologicamente e coradas com hematoxilina e eosina. Após 1 semana, foi observada a presença de eritema na região intermolares da mucosa palatina nos grupos com placa acrílica e inoculação. Histologicamente, observou-se para esses grupos difusa infiltração intra-epitelial de células inflamatórias agudas, principalmente leucócitos polimorfonucleares. Na superfície epitelial foi observada em algumas áreas a colonização por leveduras de blastóporos e nestas situações, o tecido conjuntivo subjacente foi suavemente infiltrado por células inflamatórias crônicas. Nas semanas subsequentes ocorreu a proliferação do processo inflamatório crônico no tecido conjuntivo, penetração mais evidentes de hifas no epitélio e formação de microabscessos intercalados às invasões por hifas. No experimento 2, assim como no experimento 1, após 4 semanas foram observadas notáveis alterações histológicas nos animais que foram inoculados e utilizaram placas de resina acrílica. Após 2 semanas da remoção dessas placas, o epitélio da mucosa palatina dos ratos não demonstrava mais sinais de alterações inflamatórias, não podendo ser distinguido dos animais pertencentes aos grupos controle, o que evidenciou a remissão da candidose palatina. Nenhum dos ratos apresentou *Candida* na mucosa palatina no início do experimento. Não foi possível isolar leveduras de *Candida* dos ratos usuários de placa acrílica, mas não inoculados. No experimento 2, um rato não apresentou alterações histológicas de candidose em 4

semanas após a inoculação e não foi possível isolar leveduras de *C. albicans* a partir do esfregaço da mucosa palatina deste animal. Duas semanas após a remoção das placas, foi ainda possível isolar *C. albicans* do restante do grupo inoculado. Os autores concluíram que as alterações histopatológicas observadas foram dependentes da utilização das placas acrílicas e que a remoção das mesmas resultou na remissão dos sinais clínicos da candidose palatina.

Lamb e Martin (1983) incorporaram acetato de clorexidina em resina acrílica autopolimerizável (Simplex) para avaliar a capacidade de liberação do fármaco no tratamento da candidose bucal induzida em ratos. A clorexidina foi incorporada ao material nas concentrações de 2,5, 5, 7,5 e 10%. Placas de resina acrílica com ou sem fármaco foram confeccionadas com 1 mm de espessura de onde foram retirados discos de 40 mm de diâmetro, dois para cada concentração do fármaco e dois para controle (sem clorexidina). Os discos foram imersos em 20 mL de água e incubados a 37°C. Após 3 dias, os discos foram retirados da água, secos com papel e transferidos para um recipiente com água, onde permaneceram por 4 dias. Posteriormente, os períodos de imersão foram aumentados para 7 dias, até que um período de imersão total de 21 dias tivesse decorrido. Após cada período de imersão, a água residual foi testada para a atividade antifúngica, colocando-se uma alíquota em meio YNB inoculado com *C. albicans* a uma concentração de 10^6 células/mL. As placas com os meios de cultura foram incubadas por 72 h a 30°C e os halos de inibição foram medidos em locais aleatórios para se conseguir uma média do diâmetro inibitório. A mínima concentração que apresentou atividade antifúngica (7,5% de clorexidina) foi a selecionada para os testes in vivo. Para tais testes, foram realizados experimentos com o fármaco como tratamento e profilaxia para candidose bucal. No experimento para testar o efeito preventivo, foram instaladas placas de acrílico no palato de dez ratos, sendo cinco modificadas com acetato de clorexidina e cinco controles. Todos os ratos foram então inoculados oralmente com *C. albicans*. Quatro semanas depois, os animais foram sacrificados e após a fixação e processamento, o epitélio palatino da região intermolares de cada rato foi corado e examinado quanto à infecção. No experimento para testar o efeito terapêutico, foram instaladas placas acrílicas inoculadas com *C. albicans* em dez ratos. Depois de quatro semanas, quando a candidose no palato foi estabelecida, cinco dos animais tiveram suas placas substituídas por outras contendo clorexidina. Após quatro semanas, os animais foram sacrificados e seus epitélios palatinos da

região intermolares foram examinados para a evidência histológica de candidose. Os esfregaços foram inoculados em ágar Sabouraud e examinados para evidenciar o crescimento de fungos após incubação a 37°C por 48 h. Os resultados mostraram ser efetiva a incorporação de acetato de clorexidina no material acrílico como tratamento e prevenção de candidose no palato, uma vez que uma taxa desse fármaco foi encontrada fora das placas em concentrações fungicidas por até três semanas. No entanto, o autor alerta sobre a necessidade de estudos complementares avaliando a influência da incorporação de fármacos sobre as propriedades dos materiais.

Martin (1989) realizou uma investigação para avaliar a eficácia *in vivo* do fluconazol e cetoconazol sistêmico no tratamento de candidose palatina induzida em ratos. Para isso foram selecionados de forma aleatória, 224 ratos, machos, albinos, Wistar, pesando em média 275 g, divididos em 16 grupos de 14 animais. Oito grupos de animais foram utilizados para avaliar se os 14 dias de tratamento com os azólicos seriam eficazes para resolver a candidose oral e os outros 8 para determinar se ocorreria reincidência após 2 semanas da suspensão da terapia com os azólicos. Para induzir a candidose bucal, as mucosas palatinas dos animais foram inoculadas com *C. albicans* e recobertas com dispositivos acrílicos por 14 dias. Então, os ratos foram tratados com diferentes doses de fluconazol e cetoconazol ministrados com sonda gástrica durante 14 dias, sendo os animais eutanasiados após esse período. A espessura do epitélio palatino, o número de células fúngicas e as características histopatológicas dos tecidos foram avaliados para a comparação da efetividade do tratamento com os dois antifúngicos. Uma dose diária de fluconazol de 0,75 mg Kg⁻¹ por 14 dias foi requerida para a remissão da candidose palatina e prevenção de sua recorrência enquanto para a obtenção do mesmo efeito com o cetoconazol foi necessária uma dose de 7,0 mg Kg⁻¹. Os autores concluíram que o fluconazol parece ser efetivo em doses muito inferiores em relação ao cetoconazol no tratamento de candidose palatina em ratos.

A pesquisa de Jennings e MacDonald (1990) teve como objetivos desenvolver individualmente dispositivos intra-orais acrílicos para ratos e avaliar a viabilidade de estudos quantitativos para análise do palato dos animais após a utilização dos aparatos. Nove ratos Wistar, adultos e machos, foram divididos em dois grupos, sendo um controle com três animais sem dispositivos e um experimental, com seis animais utilizando os dispositivos intra-orais. Esses aparatos

acrílicos foram confeccionados para cada animal, a partir das moldagens individuais com material de consistência regular à base de polissulfeto. Os moldes individuais foram vazados para a obtenção dos modelos sobre os quais foram confeccionados os dispositivos de resina acrílica termopolimerizável, que foram incluídos com uma banda de aço inoxidável na área correspondente aos incisivos superiores. A eutanásia dos animais foi realizada após 28 dias para ambos os grupos. Então, as cabeças foram seccionadas para fixação em formalina tamponada por 24 h e posterior desmineralização das amostras histológicas obtidas. Dessas amostras foram produzidos três blocos para cada animal, originando cortes de 5 µm, que foram corados com hematoxilina-eosina. Devido à variação nas estruturas anatômicas das rugosidades palatinas em um mesmo animal, foi ampliado o número amostral inicial, permitindo assim uma avaliação mais objetiva. Dessa maneira, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para cinco animais adicionais. Entretanto, o corte histológico foi modificado nas amostras desses ratos, sendo os palatos divididos ântero-posteriormente na linha média. Na metade direita, foram produzidos quatro blocos cortados obliquamente a partir dos dentes molares na linha das rugosidades. A metade esquerda desses palatos foi seccionada no sentido ântero-posterior entre os dentes e a linha média. Esses cortes oblíquos dos palatos permitiram a amostragem exata para histologia quantitativa. Três campos microscópicos do epitélio que recobre os vasos sanguíneos palatinos foram mensurados por planimetria computadorizada como descrito anteriormente (AL-DAMOUK; MACDONALD, 1987), sendo possível determinar os valores de espessura da queratina e espessura total do epitélio. De maneira complementar, nas secções longitudinais, foi possível fazer avaliações semelhantes do epitélio em áreas de rugosidades e cols, de forma separada. Os autores sugeriram que os dispositivos intra-orais testados podem ser satisfatoriamente utilizados em ratos para investigar os efeitos da inoculação de *C. albicans*. Apesar do acúmulo de detritos observado entre a mucosa palatina dos animais e a região de contato com resina acrílica, os autores concluíram que metodologia histológica descrita parece ser consistente para permitir avaliação quantitativa dos efeitos do uso de dispositivos intra-orais em ratos.

Em 1992, Jennings e MacDonald, propuseram alterações no modelo experimental em ratos previamente proposto (OLSEN; BONDEVIK, 1978; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981), por meio da modificação da técnica de confecção dos

dispositivos intra-orais preconizados para indução de *C. albicans* e aperfeiçoamento das amostras teciduais histológicas. Trinta e sete ratos Wistar, adultos e machos, foram divididos em três grupos, sendo um controle (n= 7) e dois experimentais (n= 23). Os animais foram moldados individualmente e sob os modelos de gessos foram confeccionados os dispositivos intra-orais de resina acrílica, seguindo a metodologia previamente publicada pelos próprios autores (JENNINGS; MACDONALD, 1990). No primeiro grupo experimental (n= 10) foram produzidos dispositivos contornando a área dos molares (mucossuportados) e, no segundo grupo experimental (n= 13), os dispositivos recobriram os molares até a superfície vestibular (dentossuportados). A superfície interna dos dispositivos acrílicos da metade dos animais dos dois grupos experimentais foi inoculada com suspensão de *C. albicans*. Em seguida, os dispositivos intra-orais foram instalados na cavidade bucal dos ratos, sendo retidos nos incisivos centrais por meio de bandas cimentadas com resina acrílica autopolimerizável. Após 28 dias todos os animais foram eutanasiados e, seguindo o mesmo protocolo do estudo anterior, os palatos desmineralizados foram seccionados na linha média. A metade direita foi cortada em quatro blocos, segundo o eixo das rugosidades, designados como blocos oblíquos. As metades esquerdas dos palatos foram cortadas no sentido ântero-posterior de forma a produzir um único bloco entre os dentes e a linha média. Foram obtidas lâminas histológicas com cortes de 5 µm e, adicionalmente naqueles animais que receberam inoculação fúngica, as seções foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). Os autores observaram menor acúmulo de detritos nos animais com os dispositivos recobrindo os molares (dentossuportados). A análise dos cortes corados com PAS revelou fungos em apenas três casos, um envolvendo a área de rugosidades e dois envolvendo a região gengival dos molares. Esses cortes apresentaram similaridade em relação à presença de hifas fúngicas, hiperplasia epitelial e formação de microabscesso. A análise quantitativa confrontou os dados dos animais inoculados com *C. albicans* com os obtidos com animais não inoculados. Não houve diferença entre os grupos com diferentes tipos de dispositivos intra-orais (dento e mucossuportados). Os cortes oblíquos demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na espessura média da camada de queratina entre os grupos experimentais e o controle, porém as camadas celulares se demonstraram mais espessas nos grupos experimentais. Da mesma forma, a espessura epitelial total foi maior para os grupos experimentais, não havendo diferenças entre eles.

Quanto à morfologia epitelial, foi observado aumento do comprimento da membrana basal para os dispositivos mucossuportados. Os cortes ântero-posteriores demonstraram redução na espessura da camada de queratina nas áreas de cols para o grupo dos dispositivos dentossuportados e maior espessura do compartimento celular em ambos os grupos experimentais. A comparação entre o grupo dos dispositivos mucossuportados e o grupo controle revelou variação considerável da espessura do compartimento celular. Não foram observadas diferenças significantes na morfologia epitelial para os grupos de estudo avaliados. Os cortes ântero-posteriores também demonstraram nas áreas das rugosidades menor espessura de queratina para os animais pertencentes aos grupos experimentais, maior espessura celular para os ratos com dispositivos dentossuportados e menor espessura epitelial total para os animais com dispositivos mucossuportados, não tendo sido observadas diferenças na morfologia epitelial entre os grupos de estudo. Os autores sugeriram que o modelo de dispositivo intra-oral dentossuportado testado no estudo seria o mais adequado para a reprodução da metodologia em ratos e, que apesar da individualização na confecção desses aparatos, a inoculação fúngica por sua vez não foi reproduzível.

Mori et al. (1997) elaboraram um modelo experimental em ratos para avaliar os possíveis efeitos e alterações histopatológicas que a pressão exercida pela base acrílicas das próteses removíveis podem causar na mucosa palatina de suporte. Foram utilizados 161 ratos, machos, Wistar, com aproximadamente 15 semanas, divididos em três grupos experimentais ($n= 42$) e um grupo controle ($n= 35$). Na região molar do palato duro de todos os ratos dos três grupos experimentais, as próteses removíveis testadas foram posicionados de forma a exercer uma pressão constante de 1,5, 3,4 ou 4,9 KPa. No grupo controle, os animais não utilizaram as próteses removíveis experimentais. Essas foram constituídas de resina acrílica termopolimerizável e no seu interior foi inserida uma estrutura metálica para fixação bilateral nos molares superiores dos ratos. Essa base foi construída de modo a ter liberdade no movimento perpendicular ao plano de oclusão sem contatar com a estrutura metálica, sendo a fixação do aparato realizada com resina acrílica autopolimerizável. A pressão contínua foi mensurada imediatamente após a inserção da base da prótese removível, 3 dias após a inserção e cada semana após da inserção (1, 2, 4, 8, 12 e 20 semanas). Depois de configurar o equipamento de medição de pressão na boca do rato, o fio ortodôntico foi removido para permitir o

movimento vertical livre da base da prótese removível. Após os períodos de observação, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados e, excisada a região do palato, as peças foram processadas histologicamente e incluídas em parafina, sendo seccionadas no sentido vestibulo-lingual através da primeira região de molar para a obtenção dos cortes histológicos de 4 μm . Não foram observadas alterações significativas na análise histopatológica do grupo controle. Em todos os períodos dos grupos experimentais não foram observadas evidências de processo inflamatório. No grupo experimental com pressão de 1,5 KPa não foi verificada a presença de reabsorção óssea, mesmo em diferentes tempos de avaliação. Já nos outros grupos experimentais, foi observada a presença de osteoclastos e lacunas de Howship após alguns dias. Entretanto, no decorrer das semanas surgiram osteoblastos e mesmo sob pressão contínua das próteses, as imagens obtidas equipararam-se às do controle. Pelos resultados histopatológicos obtidos, os autores sugeriram a possibilidade de existir um limiar para a reabsorção óssea induzida por pressão contínua.

Barclay et al. (1997) investigou in vivo os efeitos de materiais reembasadores para base de prótese sobre a mucosa bucal de um modelo de rato. Trinta ratos Wistar machos e adultos foram divididos em três grupos: controle (sem reembasador), reembasados rígido (Kooliner) e reembasador resiliente (Coe-soft). A partir das moldagens mestres, foram obtidos os modelos utilizados para o encerramento dos dispositivos intra-orais com cobertura total do palato e recobrimento dos molares. A acrilização dos aparatos foi realizada com resina acrílica termopolimerizável para base de prótese (Trevalon), sendo utilizada uma alça de fio em aço inoxidável como sistema de retenção nos incisivos superiores. Os dispositivos foram submetidos ou não ao reembasamento com os materiais e, então, retidos aos incisivos pelas alças e cimentados aos molares com resina acrílica autopolimerizável (Palapress). Durante o período experimental de 14 dias, os animais receberam ração pastosa e água *ad libitum*. Os ratos foram eutanasiados por asfixia com CO_2 e deslocamento cervical. As cabeças foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% durante um período mínimo de três dias para a remoção da maxila. As peças histológicas fixadas passaram por processo de desmineralização e foram incluídas em blocos de parafina para os corte histológicos submetidos à coloração com hematoxilina e eosina. Para análise quantitativa, comparações de vários parâmetros de medidas epiteliais foram realizadas por

planimetria computadorizada como descrito por Al-Damouk e Macdonald (1987). A amostragem final do experimento constituiu de 10 animais do grupo controle, 9 do grupo do reembasador macio e 8 do grupo do reembasador rígido. A análise quantitativa demonstrou mínimas diferenças de medições entre os três grupos de estudo. Foi observado que ambos os reembasadores testados causaram aumento na espessura de queratina, o que não foi verificado no epitélio. Houve aumento no comprimento da membrana basal no grupo de reembasador rígido em comparação ao grupo de reembasador macio. De acordo com os autores, embora tenha sido observada diferença significativa entre os grupos, houve muita sobreposição de valores, sugerindo pouca relevância em termos práticos. Os reembasadores autopolimerizáveis são amplamente utilizados para promover estabilidade das próteses removíveis e conforto ao paciente e, apesar dos fabricantes alegarem ausência de efeitos histopatológicos desses materiais sobre a mucosa oral e dos resultados desse estudo não poderem ser extrapolados para humanos, os autores sugeriram a necessidade de mais pesquisas in vivo sobre o assunto.

A investigação de Lee et al. (2011) foi realizada com o objetivo de desenvolver um sistema de prótese removível intra-oral de baixo custo para roedores visando a utilização em pesquisas relacionadas a saúde bucal, incluindo a indução de candidose bucal. Os dispositivos intra-orais foram modificados para ser facilmente reproduzíveis, permanecer em posição tempo suficiente para formação de biofilme fúngico e, ao mesmo tempo, não interferir com as atividades diárias dos animais (ingestão de água e alimentação). Para o desenvolvimento da metodologia foram utilizados ratos, machos, Wistar, pesando aproximadamente de 400 a 600 g. Inicialmente, a cavidade bucal dos ratos foi moldada diretamente com um material de consistência leve acoplado a dispensador automático, obtendo-se assim o modelo de gesso no qual foi confeccionado o dispositivo de resina acrílica autopolimerizável. Esse aparato acrílico foi dividido em dois segmentos, sendo um fixo e outro removível. O segmento fixo, ancorado ao palato posterior dos animais por fios ortodônticos retidos aos molares recobertos com resina acrílica autopolimerizável, possuía dois magnetos para manter o dispositivo elevado. O segmento removível, correspondente à região anterior, possuía uma tira de aço inoxidável para retenção aos magnetos acoplados ao segmento fixo posterior. O peso corporal dos animais manteve-se estável ou aumentou no período de 4 semanas. Os dispositivos intra-orais permaneceram adequadamente em posição por

mais de 8 semanas. Os segmentos posteriores que se soltaram ao longo do experimento foram retidos novamente com resina acrílica. Os autores descreveram duas limitações em relação aos dispositivos intra-orais testados: a corrosão das superfícies metálicas, que foi reduzida com produtos anticorrosivos e a limitada área de estudo criada devido à pequena região de contato do segmento móvel com a mucosa oral uma vez que uma grande parte do palato é requerida para a fixação do segmento posterior. De acordo com o comportamento dos dispositivos intra-orais testados, os autores sugeriram que esses aparatos poderiam ser utilizados em estudos in vivo em roedores, incluindo testes de biomateriais, formação de biofilme e desenvolvimento e tratamento de patologias associadas a presença de próteses, como a estomatite protética.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo in vivo teve como proposta viabilizar a utilização de um dispositivo acrílico intra-oral para ratos que:

- se mantivesse em contato com o palato por até 14 dias possibilitando uma análise histopatológica descritiva padronizada;

- fosse passível de reembasamento por material resiliente temporário para base de prótese modificado ou não por agentes antimicrobianos para o tratamento de estomatite protética.

A histological section of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular structures and tissue morphology. The tissue is characterized by a mix of pink (eosinophilic) and purple (basophilic) areas, indicating different cellular components and structures. The section appears to be a cross-section of a tissue sample, possibly from a gland or organ, showing ducts, acini, and other cellular features.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

4.1.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Nesse experimento foi utilizado um total de 115 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com idade média de 60 a 90 dias, pesando entre 250 e 300 g (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; PASSERI; DE CARVALHO, 1985), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia do Campus de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP). Esses animais foram mantidos em gaiolas apropriadas em ambiente com ciclo de 12 h de luz por dia e temperatura entre 22 e 24°C. Água potável estava disponível *ad libitum* aos ratos durante todo o período experimental (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; JENNINGS; MACDONALD, 1992; LAMB; MARTIN, 1983; OLSEN; BONDEVIK, 1978). O projeto de pesquisa foi iniciado apenas mediante à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da FOB/USP (CEEPA – Proc. N° 0 26/2011) (Anexo A e B).

4.1.2 MODIFICAÇÕES NA DIETA ALIMENTAR

Com o objetivo de minimizar o acúmulo de detritos alimentares no ambiente bucal devido à contínua utilização dos dispositivos acrílicos intra-orais, os animais não foram alimentados com ração sólida como é preconizado habitualmente.

Como tentativa inicial, foi suplementado aos animais uma dieta líquida (n= 22). Essa dieta foi selecionada com auxílio de um nutricionista, sendo balanceada de acordo com a equivalência nutricional da ração Presence para ratos e camundongos (Socil Evalis Nutrição Animal Indústria e Comércio Ltda, Descalvado, SP, Brazil). Dessa forma, foram selecionados os seguintes produtos para mistura e diluição em

150 mL de água: um suplemento alimentício à base de proteína (Bio Protein Isofort - Whey Protein Isolate – Vitafor, Vida Forte Nutrientes Comércio e Indústria de Alimentos Ltda, Sorocaba, SP, Brazil), um composto de carboidrato (Carboch, Prodiet Nutrição Clínica, Curitiba, PR, Brazil) e um lipídio (Óleo de canola Liza, Cargill Agrícola S/A, Barreiras, BA, Brazil). A quantidade diária e proporção foram realizadas seguindo como parâmetro a alimentação convencional de um rato em fase adulta, ou seja, aproximadamente 22 gramas de pellets de ração por dia. Essa dieta era diariamente preparada e disposta nas gaiolas em bebedouros apropriados, sendo trocada diariamente. A alimentação líquida foi testada nos animais do estudo piloto (n=12) bem como nos ratos (n= 10) do início da fase experimental propriamente dita.

Após os experimentos com alimentação líquida, foi testada em 10 animais usuários de dispositivos intra-orais a ração sólida adotada rotineiramente no Biotério da FOB/USP (Presence para ratos e camundongos), mas processada sob as formas experimentais de pasta e pó. Metade dos ratos (n=5) foi submetida a uma dieta pastosa, em acordo com o protocolo alimentar utilizado previamente em estudos que testaram dispositivos intra-orais em ratos (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; OLSEN; BONDEVIK, 1978). Para isso, o pó da ração era manualmente peneirado e armazenado em um recipiente plástico hermeticamente fechado. Diariamente esse pó era misturado com água, obtendo-se uma mistura homogênea com consistência pastosa. A quantidade da mistura para cada animal foi baseada no consumo diário de ração na fase adulta (22 g). A outra metade dos ratos (n=5) foi alimentada com a ração processada na forma de pó (22 g/dia). As duas formas de ração eram oferecidas aos ratos dentro das gaiolas em um recipiente cerâmico, sendo substituída diariamente. Ambas as formas experimentais da ração foram iniciadas para os ratos três dias antes da instalação dos dispositivos intra-orais para possibilitar a adequação dos animais à nova alimentação. Os dez animais foram monitorados diariamente em relação ao comportamento e alterações de peso. Todos os animais posteriormente testados na fase experimental deste estudo foram alimentados com dieta pastosa.

4.1.3 MODIFICAÇÕES NAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

O alojamento dos animais no estudo piloto (n= 12) foi realizado conforme preconiza o Biotério da FOB/USP, ou seja, acomodação de até cinco ratos adultos por gaiola plástica (modelo Growing, Tries Aditivos Plásticos Ltda., São Paulo, SP, Brazil) contendo comedouro alto com arruela de passagem para o bico do bebedouro e uma divisória entre o bebedouro e ração (Tries Aditivos Plásticos Ltda.). Além disso, em dias alternados e de forma padronizada, essas gaiolas eram limpas e a maravalha de pinus do fundo das mesmas era substituída.

Para os animais da fase experimental propriamente dita, ao fundo de cada gaiola foi acrescentada uma camada de maravalha de pinus totalmente recoberta por uma folha de papel craft, sendo sobre essa base colocado um piso aramado de aço inoxidável com 30 mm de elevação (Tries Aditivos Plásticos Ltda.). Diariamente, a maravalha e o papel craft eram substituídos, as grades higienizadas e as gaiolas limpas.

4.2 ADEQUAÇÃO DOS DISPOSITIVOS ACRÍLICOS INTRA-ORAIS

4.2.1 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS

Para a realização dos procedimentos intra-bucais, os ratos eram submetidos à anestesia geral com aplicação intramuscular de cloridrato de ketamina (0,4 mL/kg) (Dopalen® Sespo Indústria e Comércio - Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil) associado a cloridrato de xilazina (0,02 mL/kg) (Anasedan® Sespo Indústria e Comércio - Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil), relaxante muscular e sedativo de uso animal, respectivamente. Para a realização dos experimentos, os ratos anestesiados eram colocados em uma maca estabilizadora acrílica, sendo a cavidade bucal mantida aberta por meio de alças presas aos incisivos superiores e inferiores (MIMA et al., 2010) (Figura 1A).

4.2.2 OBTENÇÃO DE MODELOS PRELIMINARES

A primeira etapa para a elaboração de um dispositivo acrílico intra-oral foi a obtenção de um modelo preliminar em gesso a partir da moldagem da maxila de um crânio seco de um rato de 60 dias (Figura 1B). Para executar essa moldagem foi utilizado silicone de condensação de consistência densa para uso laboratorial (Zetalabor, Zermack SpA, Badia Polesine, RO, Italy) (Figura 1C e 1D). Os moldes preliminares de silicone (Figura 1E). obtidos foram vazados com gesso especial tipo IV (Dentsply Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

No estudo piloto, os dispositivos intra-orais de resina acrílica dos grupos submetidos aos procedimentos de reembasamento foram confeccionados a partir de modelos preliminares, obtidos como previamente descritos. Apesar de reduzir o tempo experimental pela eliminação da confecção de moldeira individual e da obtenção da moldagem de trabalho, os dispositivos intra-orais obtidos dos modelos preliminares não possuíam adaptação adequada ao palato dos animais durante os períodos de avaliação propostos neste estudo. Por isso, foi adotado como procedimento padrão a moldagem de trabalho individual para todos os animais usuários de dispositivos acrílicos intra-orais.

FIGURA 1: A- Maca estabilizadora desenvolvida para manipulação dos animais sob anestesia durante os procedimentos experimentais; B- Crânio seco de um rato de 60 dias; C e D- Moldagem preliminar da maxila com silicone laboratorial; E- Molde preliminar de silicone.

4.2.3 MOLDAGEM INDIVIDUAL

Sobre os modelos preliminares foram confeccionadas as moldeiras individuais de resina acrílica autopolimerizável transparente (VIPI Flash, VIPI Ltda., São Paulo, SP, Brazil). A partir de cada moldeira individual (Figura 2A), foram realizadas as moldagens das maxilas dos ratos (Figura 2B), utilizando-se poliéster (Impregum, 3M do Brasil, Campinas, SP, Brazil). Os moldes individuais (Figura 2C) devidamente identificados foram vazados com gesso especial tipo IV para a obtenção dos modelos de trabalho. Obtidas as moldagens individuais, os ratos foram removidos da maca estabilizadora para recuperação da anestesia.

FIGURA 2: A- Moldeira individual; B- Moldagem individual das maxilas dos ratos com moldeira de resina acrílica autopolimerizável e poliéter; C- Molde de trabalho em poliéter.

4.2.4 ENCERAMENTO E ACRILIZAÇÃO

No início da fase experimental propriamente dita foram testados dois sistemas para retenção dos dispositivos acrílicos no palato dos animais, sendo um cimentado ($n = 5$) e outro retido por amarilhos ($n=5$). O dispositivo intra-oral cimentado possuía recobrimento da região palatina para retenção por fios nos incisivos e cobertura aliviada dos molares para cimentação nesta área com resina acrílica autopolimerizável no momento de instalação (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; LAMB; MARTIN, 1983; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981). O dispositivo intra-oral retido por amarilho possuía recobrimento do palato e retenção por meio de amarilhos com fios ortodônticos na região interproximal de incisivos e molares. Todos os animais posteriormente testados na fase experimental deste estudo tiveram seus dispositivos itra-orais retidos por amarilhos (TOBOUTI, 2011).

Para a obtenção de dispositivos acrílicos padronizados, foi realizado sobre os modelos de trabalho (Figura 3A) o enceramento individual da região palatina com cera 7 (Lysanda Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brazil) (Figura 3B). Na região anterior do enceramento de cada dispositivo, foram inseridos quatro fios ortodônticos de 0,2 mm (Dental Morelli Ltda., Sorocaba, SP, Brazil) com aproximadamente 2 cm de comprimento cada (Figura 3C). O enceramento foi realizado com espessura uniforme de 3 mm, conferida em toda sua extensão por

meio de uma sonda periodontal milimetrada (S.S. White Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Essa espessura é considerada adequada para bases acrílicas de próteses removíveis, sendo previamente utilizada em estudos de suas propriedades físicas e mecânicas (PERO et al., 2011; SÉO et al., 2006).

FIGURA 3: A- Modelo de trabalho; B- Enceramento da porção palatina do dispositivo intra-oral; C- Fios ortodônticos posicionados na região anterior do enceramento.

Os modelos de trabalho com os enceramentos dos dispositivos intra-orais foram incluídos convencionalmente com gesso tipo III (Herodent, Vigodent S.A. Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) em mufla n.6 (OGP Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brazil) (Figura 4A). Para proteção dos fios ortodônticos na região anterior e dos modelos de gesso, uma muralha com silicone de condensação de consistência densa para uso laboratorial (Figura 4B) foi construída ao redor de cada enceramento. Após a eliminação da cera e limpeza dos modelos incluídos (Figura 4C), foi realizado o isolamento do gesso para inserção da resina acrílica termopolimerizável para base de prótese (Lucitone 550, Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil) (Figura 4D). A resina foi proporcionada (2,1 g/mL) e manipulada segundo as instruções do fabricante para, então, ser inserida na fase plástica na região palatina dos modelos de trabalho. Em seguida, foi realizada a prensagem da resina acrílica nas muflas a 1,25 t (Prensa Hidráulica Gold Line Essence Dental VH, Araraquara, SP, Brazil). Após 30 min sob prensagem,

procedeu-se a polimerização da resina termopolimerizável em banho-maria (Banho Maria SL 155/22, Solab Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, SP, Brazil) de acordo com o ciclo curto recomendado pelo fabricante (90 min a 73°C e 30 min a 100°C) (PAVARINA et al., 2005).

FIGURA 4: A- Inclusão do modelo de trabalho com o enceramento em mufla; B- Muralha de silicone para proteção dos fios e modelo; C- Contra-mufla com a reprodução em gesso do enceramento; D- Inserção da resina acrílica termopolimerizável sobre a região palatina do modelo.

Após a acrilização (Figura 5A), os excessos de resina acrílica dos dispositivos intra-orais foram cuidadosamente removidos com uma broca de tungstênio cilíndrica do tipo minicut (Dhpro, Rhadartrade, Paranguá, PR, Brazil) acoplada à peça de mão (Kavo do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Joinville, SC, Brazil). A superfície externa desses dispositivos foi submetida ao polimento com disco de feltro contendo pasta polidora (Universal Polishing Paste for Resins and Metals, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) acoplado em peça de mão (Figura 5B). E após o polimento, próximo à região interproximal dos molares superiores de cada lado dos dispositivos (direito e esquerdo), foi realizado um orifício (Figura 5C) com uma broca carbide esférica n. 2 (Beavers Dental, Morrisburg, ON, Canada) acoplada à peça de mão. Para auxiliar na fixação dos dispositivos intra-orais nesta região, em cada orifício foi passado um fio ortodôntico de 0,2 mm com

aproximadamente 6 cm. Em seguida, os dispositivos acrílicos (Figura 5D) foram lavados com escova dental de cerdas macias (Colgate, Colgate-Palmolive Ind. e Com. Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brazil) e sabão de coco a fim de se promover limpeza e desinfecção da superfície acrílica, simulando condições clínicas (BARNABÉ et al., 2004).

FIGURA 5: Sequência dos dispositivos acrílicos intra-orais após polimerização: A- Com excessos imediatamente a polimerização; B- Após procedimento de acabamento e polimento; C- Com orifícios para retenção dos amarrilhos metálicos na região interproximal dos molares; D- Dispositivo acrílico finalizado.

Antes de serem instalados nos ratos, todos os dispositivos acrílicos intra-orais foram mantidos em água destilada à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 50 ± 2 h, de acordo com as especificações da International Organization for Standardization (ISO 1567, 1998) para resinas acrílicas para base de prótese. Esse procedimento é recomendado para redução da quantidade de monômero residual bem como para simular condições clínicas (MORI et al., 1997).

4.3 INSTALAÇÃO DOS DISPOSITIVOS ACRÍLICOS INTRA-ORAIS

4.3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS E MATERIAIS

Dentre os objetivos propostos neste estudo, o dispositivo intra-oral deveria possibilitar o reembasamento da região palatina dos ratos com material resiliente temporário, incorporado ou não com agentes antimicrobianos.

Para executar o reembasamento dos dispositivos intra-orais, foi selecionado um reembasador resiliente temporário para base de próteses removíveis, Trusoft™ (Lote: 1007-333; Bosworth Company, Skokie, IL, USA). Segundo o fabricante, o pó desse material consiste de um pré-polímero de polietil metacrilato e o líquido apresenta plastificante com grupamento éster e etil álcool em sua composição. Para a incorporação no reembasador, foram selecionados três fármacos recomendados para o tratamento da estomatite protética, sendo dois antifúngicos, a nistatina (Farmácia Specifica Ltda, Bauru, SP, Brazil) e o cetoconazol (Farmácia Specifica Ltda, Bauru, SP, Brazil) e um antimicrobiano, o diacetato de clorexidina a 98% (Acros Organics, New Jersey, NJ, USA – CAS 206986-79-0). Os medicamentos foram utilizados na forma de pó, como fármaco puro, com o objetivo de facilitar a incorporação ao pó do material (ALCÂNTARA et al., 2012; URBAN et al., 2006; URBAN et al., 2009).

Para executar o reembasamento dos dispositivos intra-orais, foi selecionado um reembasador resiliente temporário para base de próteses removíveis, Trusoft™ (Lote: 1007-333; Bosworth Company, Skokie, IL, USA). Segundo o fabricante, o pó desse material consiste de um pré-polímero de polietil metacrilato e o líquido apresenta plastificante com grupamento éster e etil álcool em sua composição. Para a incorporação no reembasador, foram selecionados três fármacos recomendados para o tratamento da estomatite protética, sendo dois antifúngicos, a nistatina (Farmácia Specifica Ltda, Bauru, SP, Brazil) e o cetoconazol (Farmácia Specifica Ltda, Bauru, SP, Brazil) e um antimicrobiano, o diacetato de clorexidina a 98% (Acros Organics, New Jersey, NJ, USA – CAS 206986-79-0). Os medicamentos foram utilizados na forma de pó, como fármaco puro, com o objetivo de facilitar a incorporação ao pó do material (ALCÂNTARA et al., 2012; URBAN et al., 2006; URBAN et al., 2009).

Para testar aplicabilidade do reembasamento dos dispositivos elaborados e conduzir um estudo preliminar, os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos de estudo, os quais foram divididos em doze subgrupos (MIMA et al., 2010), de acordo com o período de avaliação (7 e 14 dias). Os grupos de estudo foram designados da seguinte forma:

- **Controle Negativo (CN):** ratos sem dispositivo intra-oral;
- **Controle Geral (CG):** ratos com dispositivo intra-oral de resina acrílica sem reembasador;
- **Controle Positivo (CP):** ratos com dispositivo intra-oral de resina acrílica reembasada com Trusoft não modificado pela adição de fármaco;
- **Diacetato de Clorexidina (CLO):** ratos com dispositivo intra-oral de resina acrílica reembasada com Trusoft contendo 0,064 g/mL de diacetato de clorexidina.
- **Cetoconazol (CET):** ratos com dispositivo intra-oral de resina acrílica reembasada com Trusoft contendo 0,128 g/mL de cetoconazol;
- **Nistatina (NIS):** ratos com dispositivo intra-oral de resina acrílica reembasada com Trusoft contendo 0,032 g/mL de nistatina.

4.3.2 INSTALAÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS

Os dispositivos intra-oriais dos ratos pertencentes ao grupo CG foram instalados nos animais após a armazenagem em água. Já no grupo CP e nos grupos experimentais CLO, CET e NIS, os dispositivos foram, após o período de imersão em água, reembasados com o material modificado ou não pela adição de fármacos em suas MCIs antes de serem instalados nos ratos. As MCIs adotadas para os fármacos testados foram: 0,032 g/mL para a nistatina, 0,064 g/mL para o diacetato de clorexidina e 0,128 g/mL para o cetoconazol (BUENO et al., 2013). Para o reembasamento, foi realizado na superfície interna dos dispositivos acrílicos um degaste uniforme de 1 mm com objetivo de criar espaço para o material reembasador (NOVAIS et al., 2009; SEO et al., 2006). Esse alívio foi obtido a partir de três sulcos longitudinais confeccionados na região interna das placas com uma broca carbide n.702 (Beavers Dental, Morrisburg, ON, Canada). Esses sulcos funcionaram como referência para o desgaste padronizado do acrílico com o auxílio de uma broca de tungstênio cilíndrica do tipo mini cut.

FIGURA 6: A; B; C- Sulcos transversais na região interna dos dispositivos acrílicos intra-orais; D- Sulcos transversais realizados orientando o desgaste dos dispositivos acrílicos para o reembasamento.

Para o reembasamento no grupo CG, o Trusoft foi proporcionado (1 g/1 mL) e manipulado de acordo com as recomendações do fabricante. Para os grupos experimentais (CLO, CET e NIS), o fármaco em pó na MCI determinada foi dosado e misturado ao pó do material reembasador (FIGURAS 7A a 7C). Em seguida, o líquido foi adicionado à mistura de pós (FIGURA 7D) (BUENO et al., 2013). O material manipulado (FIGURA 7E) foi acrescentado na região palatina desgastada dos dispositivos intra-orais de cada rato. Então, os dispositivos foram levados em posição na cavidade bucal dos animais, sendo mantidos sob pressão até a plastificação do material (5 - 6 min) (FIGURA 7F). Em seguida, foram retirados cuidadosamente para remoção dos excessos do reembasador com uma tesoura clínica reta n. 2 estéril (S.S. White Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) (FIGURA 7G e 7H). Após a remoção dos excessos (FIGURA 7I), foi realizada a fixação dos dispositivos na cavidade bucais dos ratos.

FIGURA 7: A- Pó do Trusoft™ proporcionado; B- Adição do fármaco ao pó do reembasador resiliente; C- Incorporação do fármaco ao pó do material; D- Inserção do líquido do Trusoft™ à mistura; E- Manipulação do material reembasador resiliente incorporado com fármaco; F- Dispositivos acrílicos mantidos em posição aguardando a plastificação do material; G- Dispositivo intra-oral reembasado; H- Remoção dos excessos do material reembasador; I- Aspecto final do dispositivo acrílico intra-oral após reembasamento.

Para a fixação dos dispositivos intra-orais, foi realizada uma amarilha na região posterior da cavidade bucal dos animais a partir dos fios ortodônticos passando pelos orifícios. Para isso, os fios foram presos na região interproximal do segundo e terceiro molares superiores dos animais, em ambos os lados (direito e esquerdo) (FIGURA 8A). Para a amarilha na região anterior, foram utilizados os quatro fios acrilizados junto ao dispositivo. Dois desses fios foram passados na região interproximal dos incisivos superiores e os outros dois direcionados às regiões distais de cada incisivo (FIGURA 8B) para, então, serem todos amarrados e devidamente cortados na região vestibular dos dentes (FIGURA 8C). Para aumentar

ainda mais a retenção dos dispositivos intra-orais, foram confeccionados entalhes na região distal dos incisivos com uma broca diamantada (3216, KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda, Barueri, SP, Brazil) (OLSEN; BONDEVIK, 1978; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981; 1986) sob alta rotação. As pontas cortantes dos fios ortodônticos foram protegidas com resina composta fotopolimerizável (Filtek Z100, 3M do Brasil, Campinas, SP, Brazil) (FIGURA 8D), evitando ulcerações na mucosa dos animais e ao mesmo tempo colaborando com a retenção do aparato acrílico.

FIGURA 8: A- Fios ortodônticos na região interproximal de segundo e terceiro molar; B- Fios ortodônticos na região anterior e posterior com o dispositivo acrílico em posição; C- Dispositivo acrílico intra-oral retidos por amarrilhos; D- Proteção dos amarrilhos com resina composta.

Para a recuperação da anestesia, os ratos foram removidos da maca estabilizadora, tendo suas unhas aparadas neste momento. Em cada grupo de estudo os animais permaneceram com o dispositivo intra-oral em posição na cavidade bucal por 7 dias ou 14 dias.

4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS HISTOLÓGICAS

Após o término dos períodos experimentais (7 e 14 dias), a eutanásia dos animais foi realizada por meio de asfixia com CO₂ (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997). Para os animais do estudo piloto (n=12) e da maior parte da fase experimental propriamente dita (n= 83), a obtenção das amostras histológicas foi realizada a partir da remoção da mucosa do palato (tecido mole) com o auxílio de um bisturi com lâmina nº15C (Solidor, Lamedid Comercial e Serviços Ltda., Barueri, SP, Brazil) (FIGURA 9A e 9B) e descolador de Molt nº 2-4 (Golgran Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brazil) (FIGURA 9C).

FIGURA 9: A- Incisão perpendicular a lateral da mucosa palatina; B- Incisão perpendicular contornando a área dos molares; C- Obtenção da amostra histológica de tecido mole após descolamento.

Na fase final do experimento (n= 20), a obtenção das amostras histológicas abrangeram todo o palato dos animais, incluindo tecidos mole (mucosa de revestimento) e duro (dentes, tecido ósseo de suporte e estruturas adjacentes). Para a obtenção dessa amostra, foi realizada a decapitação dos animais com auxílio de lâmina de bisturi nº 10 (Solidor, Lamedid Comercial e Serviços Ltda., Barueri, SP, Brazil) e tesoura cirúrgica de 15 cm (Golgran Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brazil) seguido pelo divulsionamento dos tecidos circunjacentes ao palato com tesoura de ponta romba (Golgran Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brazil).

Para possibilitar o processamento histológico, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% durante uma semana. O formol tamponado foi obtido pela diluição de 100 mL de formaldeído a 37-39% em 900 mL de solução tampão

preparada para pH 7 com 5 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 6,5 g de fosfato de sódio dibásico anidro $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ diluído em água destilada (SILVEIRA, 2012).

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS HISTOLÓGICAS

4.5.1 TECIDO MOLE

Para os cortes macroscópicos das amostras de tecido mole (apenas mucosa palatina) previamente fixadas, o primeiro passo foi descartar a região anterior do palato (rugosidades). Na porção remanescente de cada amostra, realizou-se um corte longitudinal na linha média, dividindo-a em duas partes, direita e esquerda. Então, as amostras foram submetidas à desidratação em álcool etílico (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brazil), diafanização em xilol (Synth) e inclusão em Histosec (parafina + resina sintética) (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Germany). Em seguida, com o auxílio de um micrótomo (modelo RM2045, Leica Microsystems, HE, Germany), foram obtidos cortes semi-seriados de 0,005 mm (5 μm) de cada amostra com intervalo de aproximadamente 1 mm entre eles. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), segundo a técnica preconizada e registrada nos protocolos do Departamento de Histologia da FOB/USP.

4.5.2 TECIDOS MOLE E DURO

As amostras histológicas de tecidos mole (mucosa de revestimento) e duro (dentes, tecido ósseo de suporte e estruturas adjacentes) foram mantidas em solução de EDTA (4,13% de Tritriplex III -Merck KGaA, Darmstadt, HE, Germany- e 0,44% de hidróxido de sódio, à temperatura de 2 a 8°C) até se apresentarem totalmente desmineralizadas, o que correspondeu a um período médio de quarenta dias.

Após desmineralização, foram realizados os cortes macroscópicos das amostras (FIGURA 10A). A partir da secção transversal do palato duro, delimitou-se a região de interesse da amostra, abrangendo da mesial dos primeiros molares até a

distal dos terceiros molares (FIGURA 10B), com descarte das demais estruturas da maxila. Então, essas peças foram submetidas aos mesmos procedimentos de processamento histológico descritos no item 4.5.1.

FIGURA 10: A- Amostra histológica da maxila de um rato com tecido mole e duro após o processo de desmineralização, linhas tracejadas ilustrando corte transversal da amostra histológica; B- Delimitação da região de interesse (mesial do primeiro molar até a distal do terceiro molar). Imagens capturadas com Microscópio digital portátil Dino-Lite (modelo AM413TL, Compex Tecnologia Ltda, São Paulo, SP, Brazil) e programa Dino Capture 2.0 (Compex Tecnologia Ltda).

As amostras incluídas em blocos foram levadas ao micrótomo para a realização dos cortes semi-seriados de 0,005 mm (5 μ m), com intervalo de aproximadamente 100 μ m entre eles, de forma a abranger toda extensão intermolares. De acordo com a ordem dos cortes, o primeiro foi correspondente à região mesial do primeiro molar e o último à região distal do terceiro molar. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), segundo a técnica preconizada e registrada nos protocolos do Departamento de Histologia da FOB/USP.

Após a coloração, os cortes histológicos de todas as amostras foram visualizados ao microscópio óptico Axioscop (n. série – 233675; Carl Zeiss Surgical GMBH, Oberkochen, BW, Germany) com lentes objetivas de 10x e de imersão de 40x.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DE INTERESSE PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA

As amostras obtidas apenas de tecido mole não foram consideradas adequadas para a análise histopatológica como será justificado posteriormente. Assim, para determinar a área de interesse para análise histopatológica descritiva, utilizou-se a amostra com tecidos mole e duro de um animal do grupo CN pertencente ao período de avaliação de 7 dias. Nessa amostra, foram realizados 50 cortes semi-seriados com 200 µm de intervalo entre eles. Com o auxílio do programa AxioVision Rel. 4.8.2 (Carl Zeiss Surgical GMBH, Oberkochen, BW, Germany), imagens digitais foram obtidas de cada corte com uma câmera fotográfica AxioCam HRc (Carl Zeiss Surgical GMBH) acoplada a um microscópio óptico Axioscop (Carl Zeiss Surgical GMBH), utilizando-se lentes objetivas de 4 e 10x e de imersão de 40x. As imagens digitalizadas em diferentes aumentos possibilitaram, por comparação visual dos campos histológicos, delimitar a região de primeiros molares, de um feixe neurovascular a outro, como a área ideal para análise descritiva do presente estudo. As fotomicrografias para a análise histopatológica foram obtidas a partir da área de interesse selecionada, sendo destinada apenas aos animais das amostras com tecidos mole e duro (n=20).

4.7 OBTENÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

Com auxílio do programa DP Manager version 3.1.1.208 (Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, USA) as imagens obtidas dos cortes histológicos correspondentes à área de interesse das amostras foram capturadas por uma câmera Olympus DP71 (Olympus Corporation of the Americas) acoplada a um microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation of the Americas) com objetiva de 2x. Para a obtenção de detalhes microscópicos das características da camada córnea, do epitélio, do conjuntivo e do tecido ósseo dos grupos testados neste estudo, imagens digitais foram obtidas com o auxílio do programa AxioVision por uma câmera AxioCam HRc acoplada a um microscópio óptico Axioskop com lentes objetivas de 4x e de imersão 40x.

4.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA

Como descrito previamente, neste estudo objetivou-se padronizar a obtenção e inclusão das amostras, a área de interesse de análise e os cortes histológicos para que fosse possível a descrição histopatológica das fotomicrografias. Na análise histopatológica descritiva, foram caracterizados aspectos relacionados à possível influência dos dispositivos intra-orais nas diferentes condições testadas (reembasamento e modificação por fármacos) sobre os tecidos bucais dos animais, tais como espessura da camada córnea (ortoqueratina), variações no epitélio (contorno das cristas epiteliais, quantidade de projeções epiteliais e espessura), variações no conjuntivo (achatamento do compartimento, presença ou ausência de infiltrado inflamatório) e características do tecido ósseo (espessura da tábua óssea e presença ou ausência de processo de reabsorção).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIZAÇÃO DO USO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS EM RATOS

5.1.1 ADEQUAÇÃO DA DIETA ALIMENTAR E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Durante a execução do estudo piloto, todos os animais com dispositivos intra-oriais se adaptaram satisfatoriamente à dieta líquida por até 14 dias. Neste período, os dispositivos intra-oriais permaneceram em posição, mantendo o devido contato com a mucosa palatina dos ratos. Assim, a fase experimental da pesquisa propriamente dita foi iniciada com essa dieta para 10 animais com dispositivos intra-oriais instalados. Entretanto, diferentemente do observado com o estudo piloto, os 10 animais testados apresentaram grande perda de peso, escurecimento dos pelos e prostração. Após 7 dias de experimentação, houve perda de 6 ratos por aparente desnutrição. Apesar disso, todos os dispositivos intra-oriais estiveram em posição até o final do experimento ou morte do animal.

Em relação às formas experimentais da ração sólida, foi constatado que todos os animais alimentados pela dieta em pó ($n=5$) apresentaram redução de peso, ocorrendo perda de um rato após 4 dias de experimento. Os cinco ratos submetidos à dieta pastosa aceitaram melhor essa forma experimental de ração, não apresentando redução de peso em até 14 dias. Além disso, o acúmulo de detritos nos dispositivos intra-oriais foi maior com a ração em pó em relação à pastosa. A partir dessas constatações, os demais animais testados neste estudo foram alimentados de forma padronizada com dieta pastosa. Mesmo apresentando a maior aceitação pelos animais entre as dietas testadas neste estudo, a ração pastosa, em períodos de avaliação superiores a 7 dias, resultou na perda de 7 animais por desnutrição, sendo que a maioria não ganhou peso ao longo do tempos experimentais.

Em função da instalação dos dispositivos intra-oriais, fizeram-se necessárias algumas alterações nos protocolos do Biotério da FOB/USP para as condições de alojamento dos animais. Foi observado que ao manter os animais como preconizado em gaiolas com o piso recoberto apenas por maravalha, havia grande acúmulo de detritos e umidade. A colocação de pisos aramados de aço

inoxidável sobre a base de maravalha recoberta com papel craft no fundo das gaiolas possibilitou melhores condições higiênicas ao ambiente, o que foi favorecido também pela limpeza diária das gaiolas e dos pisos bem como pela substituição do papel craft. Como esses pisos aramados elevam o nível do fundo da gaiola, o espaço para o alojamento animais fica reduzido. Por isso, foi estipulado neste estudo um número máximo de três ratos por gaiola ao invés de cinco como é preconizado pelo Biotério. A manutenção da limpeza dos alojamentos foi ainda melhorada pelo fato das unhas dos animais serem cortadas logo após a instalação dos dispositivos intra-orais, uma vez que este procedimento evitou que os mesmos se ferissem na tentativa de remover os aparatos da cavidade oral.

5.1.2 ADEQUAÇÃO DOS DISPOSITIVOS ACRÍLICOS INTRA-ORAIS

Durante a eutanásia, foi observado nos animais do estudo piloto ($n=12$) e nos primeiros 10 da fase experimental que os dispositivos acrílicos intra-orais confeccionados a partir de um mesmo modelo preliminar, estavam se distanciando da mucosa palatina dos ratos, havendo perda do dispositivo em um deles. Frente a esses resultados, optou-se pela moldagem individual da maxila dos animais subsequentes para a confecção dos dispositivos acrílicos intra-orais, o que assegurou melhor adaptação dos mesmos ao longo do experimento.

Quando cimentados aos molares, os dispositivos intra-orais se soltaram de todos os animais testados ($n=5$) após 4 dias da instalação. Na fase inicial da metodologia, os dispositivos acrílicos retidos por amarrilhos de fios ortodônticos permaneceram adequadamente em posição na cavidade bucal de todos os ratos ($n=5$), razão pela qual preconizou-se essa forma de retenção para os demais animais do experimento. Entretanto, foi observado que esses dispositivos foram adequados para permanecerem em posição durante 7 dias haja vista que quase 30% deles se soltaram da cavidade bucal dos animais em períodos próximos aos 14 dias. Como forma auxiliar de retenção por amarrilhos, foi adotada a confecção de um entalhe na distal dos incisivos superiores para evitar o deslocamento vertical dos fios ortodônticos presos a esses dentes.

O procedimento de reembasamento dos dispositivos acrílicos intra-orais preconizado neste estudo foi considerado satisfatório haja vista que não houve descolamento ou degradação comprometedora do material resiliente em nenhum

dispositivo dos grupos CP, CLO, CET e NIS mesmo nos animais dos períodos de 14 dias.

5.2 AMOSTRAGEM FINAL DE ANIMAIS

Do total de 115 animais utilizados nesta pesquisa, 12 foram referentes ao estudo piloto e 103 à fase experimental propriamente dita.

Dos ratos pertencentes ao estudo piloto, seis foram avaliados no período de 7 dias e seis no período de 14 dias, sendo um animal para cada grupo de estudo (CN, CP, CG, CLO, CET e NIS). Todos os animais do estudo piloto foram alimentados com dieta líquida e sobreviveram até o final do período de avaliação sem que houvesse perda dos dispositivos intra-orais ou sinais de desnutrição.

Os dados dos animais (n=103) pertencentes à fase experimental propriamente dita estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Animais da fase experimental por grupo de estudo nos períodos de 7 e 14 dias.

Grupos	Períodos		Exclusão		Amostragem final
	7 d	14 d	NS	PD	
CN	5	7	-	-	12
CP	8	10	3	2	13
CG	6	19	1	10	14
CLO	6	6	-	1	11
CET	6	13	5	1	13
NIS	9	8	1	6	10
TOTAL	40	63	10*	20	73

PD= Perda do Dispositivo intra-oral; NS= Não Sobreviventes; CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo; CG= Controle Geral; CLO= Clorexidina; CET= Cetoconazol; NIS= Nistatina.

Pela Tabela 1, é possível observar que dos 103 animais iniciais da fase experimental, apenas 73 foram considerados na amostragem final. Vinte ratos (72,6%) foram excluídos por perda dos dispositivos intra-orais. Dos 10 ratos não sobreviventes excluídos, 7 foram por desnutrição (9,5%) e 3 durante a anestesia (4,1%). A perda dos dispositivos intra-orais ou morte por desnutrição dos animais excluídos ocorreu sempre em períodos superiores a 7 dias de experimento. (média de 10 dias).

5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS HISTOLÓGICAS

Na presente pesquisa, foi inicialmente proposta a obtenção das amostras histológicas apenas de tecido mole (mucosa palatina), o que foi realizado para os animais do estudo piloto (n=12) e da maior parte da fase experimental propriamente dita (n= 83). Entretanto, os cortes histológicos de tecido mole foram obtidos somente para 72 ratos, sendo 12 do estudo piloto e 60 da fase experimental. Dos 23 animais experimentais excluídos das amostras de tecido mole, 16 foram devido à perda do dispositivo intra-oral e 9 por morte, sendo 6 por desnutrição e 3 decorrentes dos procedimentos de anestesia.

A análise dos cortes histológicos apenas de tecido mole em microscópio óptico binocular revelou a impossibilidade da sua utilização para a obtenção de resultados padronizados e subsequente análise histopatológica. As discrepâncias mostraram-se evidentes mesmo entre animais pertencentes ao mesmo grupo de estudo e sob o mesmo período de avaliação. Como o tecido ósseo de suporte da mucosa palatina, as estruturas adjacentes e os dentes molares dos animais não foram incluídos juntamente com o tecido mole nos blocos de parafina dessas amostras, não foi possível identificar de forma padronizada a região de interesse a ser avaliada. Em cortes com o mesmo intervalo de distância (μm), foi observada grande discrepância entre as estruturas de epitélio e conjuntivo, o que inviabilizou a análise histopatológica descritiva inicialmente proposta neste estudo para as amostras obtidas apenas da mucosa palatina dos animais. Como a padronização dos cortes histológicos é fundamental para permitir a análise histopatológica quantitativa na futura avaliação in vivo da biocompatibilidade dos materiais resilientes modificados com os tecidos bucais dos animais, as amostras obtidas de tecido mole neste estudo foram desconsideradas.

A análise dos cortes histológicos das amostras com tecidos mole e duro possibilitaram a determinação da região de interesse para análise histopatológica descritiva, devido à padronização na inclusão das peças e à uniformidade entre os cortes histológicos. Por isso, neste estudo foram utilizados na análise histopatológica descritiva apenas os cortes histológicos provenientes das amostras de tecidos mole e duro. Foram avaliados os cortes histológicos de apenas 12 dos 20 animais inicialmente destinados a esse tipo de amostra uma vez que 7 foram excluídos por

perda dos dispositivos intra-orais antes do período experimental (7 ou 14 dias) e 1 por eutanásia precoce devido à perda de peso alarmante.

Com a adequação metodológica proposta na presente pesquisa para viabilidade do uso dos dispositivos intra-orais em ratos, foi possível se obter uma amostra histológica com tecidos mole e duro de cada grupo de estudo (CN, CP, CG, CLO, CET e NIS) em cada período de avaliação (7 e 14 dias). Assim, a análise histopatológica descritiva referente a essas 12 amostras foram obtidas de animais testados, ao longo dos períodos experimentais, sob todas as condições definidas neste estudo preliminar: dieta pastosa, alojamento em gaiolas com piso aramado, moldagem individual, dispositivos intra-orais retidos por amarelinhos, cortes histológicos de tecidos mole e duro, área de interesse de análise definida e descrição histopatológica padronizada.

5.4 REGIÃO DE INTERESSE PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA

A eutanásia dos animais usuários de dispositivos intra-orais indicaram que o corte macroscópico deveria abranger a região intermolares (de mesial dos primeiros molares até a distal de terceiros molares) uma vez que nesta área foi observado íntimo contato da mucosa palatina com o material da base acrílica e pouco acúmulo de detritos alimentares. Além disso, a presença dos molares de ambos os lados facilitou de forma padronizada a localização de determinado corte histológico. Os cortes histológicos do rato do grupo CN no período de 7 dias evidenciaram, mesmo no intervalo de 200 µm entre eles, uma grande variabilidade em relação à espessura e contorno das cristas epiteliais, à presença, tamanho e quantidade de projeções epiteliais e à morfologia da estrutura palatina óssea (Figura 11).

FIGURA 11- Fotomicrografias de 10 cortes transversais semi-seriados com 200 μ m de intervalo entre eles obtidos da região intermolares (M) do grupo CN no período de 7 dias. Nota-se a variabilidade quanto à espessura (seta azul) e contorno das cristas epiteliais (seta preta), à presença, tamanho e a quantidade das projeções epiteliais (seta verde) e à morfologia da estrutura palatina óssea (P) (seta cinza). HE.

Ao avaliar os detalhes em maior aumento dos cortes histológicos dos animais que utilizaram os dispositivos intra-orais durante o experimento, observou-se alterações patológicas entre os segundos e terceiros molares. Isso porque os fios ortodônticos passados nesta região interproximal para retenção com amarrilhos induziram um defeito ósseo. Por isso, definiu-se que os cortes histológicos avaliados se restringiriam apenas de mesial a distal dos primeiros molares. Ainda com intuito de delimitar de forma padronizada a região de interesse para análise (RI), foi preconizado que os feixes neurovasculares seriam os pontos limítrofes (extensão).

As Figuras 12 e 14 (A, B, C) e 13 e 15 (A, B, C, D) indicam as RIs utilizadas para a análise histopatológica descritiva das 12 amostras de tecidos mole e duro, definidas, portanto, como as áreas correspondentes aos primeiros molares, de um feixe neurovascular de um lado ao outro.

Os cortes histológicos dos animais pertencentes aos grupos controles (CN, CG e CP) no período de 7 dias estão apresentados na Figura 12 (A', B', C'). Não foi possível observar alterações histopatológicas na camada córnea, no epitélio, na lâmina própria e no tecido ósseo dos animais que utilizaram o dispositivo intra-oral sem (grupo CG) ou com o reembasamento com o material não modificado (grupo CP) durante 7 dias, em relação ao animal que não utilizou o dispositivo intra-oral (grupo CN).

A Figura 13 (B', C', D') mostra os cortes histológicos dos animais dos grupos experimentais (CLO, CET e NIS) que utilizaram durante 7 dias dispositivos intra-orais acrílicos reembasados com o material resiliente modificado com as MCIs dos fármacos testados. Similarmente ao observado com os grupos CP e CG, não foi possível notar alterações histopatológicas na camada córnea, no epitélio, na lâmina própria e no tecido ósseo dos animais dos grupos experimentais em relação ao animal que não utilizou dispositivo intra-oral (grupo CN) após 7 dias de avaliação.

FIGURA 12- Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos controles no período de 7 dias: A, B e C evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em A', B' e C'. A camada córnea (Oq), o epitélio (Ep), a lâmina própria (LP) e o tecido ósseo (TO) dos grupos CG (B') e CG (C') não revelaram alterações histopatológicas em comparação ao grupo CN (A'). HE

FIGURA 13- Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos experimentais no período de 7 dias: B, C e D evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em B', C' e D'. A camada córnea (Oq), o epitélio (Ep), a lâmina própria (LP) e o tecido ósseo (TO) dos grupos CLO (B'), CET (C') e NIS (D') não revelaram alterações histopatológicas em comparação ao grupo CN (A'). HE

Os cortes histológicos dos animais pertencentes aos grupos controles (CN, CG e CP) e experimentais (CLO, CET e NIS) no período de 14 dias estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 14 (A', B', C') e 15 (B', C', D'). Em relação ao animal que não utilizou o dispositivo intra-oral (grupo CN), não foi possível observar alterações histopatológicas na camada córnea, no epitélio, na lâmina própria e no tecido ósseo dos animais que utilizaram dispositivos intra-orais reembasados com o material resiliente não modificado (grupo CP) ou contendo os fármacos testados (CLO, CET e NIS) durante 14 dias. Já os cortes histológicos de 14 dias do animal usuário do dispositivo intra-oral sem reembasamento (grupo CG) demonstrou, em relação àqueles do grupo CN, alterações no contorno ósseo palatino, com a presença de um processo de reabsorção óssea mais intensa (Figuras 14B e B').

FIGURA 14– Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos controles no período de 14 dias: A, B e C evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em A', B' e C'. A camada córnea (Oq), o epitélio (Ep), a lâmina própria (LP) e o tecido ósseo (TO) do grupo CP (C') não revelaram alterações histopatológicas em comparação ao grupo CN (A'). No grupo CG (B, B'), as setas vermelhas indicam intensa reabsorção do tecido ósseo palatino. HE

FIGURA 15– Fotomicrografias dos cortes transversais do palato (P) dos grupos experimentais no período de 14 dias: B, C e D evidenciam a região de interesse selecionada para análise (RI) na área entre os primeiros molares (M1) e a área retangular selecionada para maior aumento em B', C' e D'. Nota-se a lâmina própria (LP) com densas fibras colágenas dispostas paralelamente a superfície epitelial e ausência de alterações na camada córnea (Oq), no epitélio (Ep) e no tecido ósseo (TO) dos grupos CLO (B'), CET (C') e NIS (D') em comparação ao grupo CN (A'). HE

5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA

5.5.1 DESCRIÇÃO DA MUCOSA PALATINA

Aos 7 dias de avaliação, a região correspondente ao epitélio não demonstrou alterações histológicas para todos os grupos de estudo em relação ao grupo CN. A espessura da camada córnea, estratificação das camadas do epitélio e disposição das fibras colágenas, dos vasos e das células da lâmina própria dos grupos de estudo apresentaram similares ao observado para o grupo CN (Figura 16).

A análise do epitélio dos grupos de estudo CG, CP, CLO, CET e NIS (Figura 17, de B a F, respectivamente) após 14 dias sugere que o contato dos dispositivos intra-orais com a mucosa palatina dos ratos em um período maior levou ao aumento da espessura de ortoqueratina da camada córnea e à compressão das células epiteliais e do tecido conjuntivo da lâmina própria em relação ao grupo CN (Figura 17A).

FIGURA 16- Fotomicrografias da região do epitélio no período de 7 dias. Nota-se a ausência de alterações histológicas na espessura da camada córnea (Oq), no epitélio e na lâmina própria (LP) de todos os grupos de estudo (B a F) em relação ao grupo CN. HE

FIGURA 17- Fotomicrografias da região do epitélio no período de 14 dias. Nota-se maior espessura da camada córnea (Oq), alterações no contorno das cristas epiteliais (seta preta) e compressão (círculo) das células epiteliais (Ep) e do conjuntivo da lâmina própria (LP) de todos os grupos de estudo (B a F) em relação ao grupo CN (A). HE

5.5.2 DESCRIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO ADJACENTE A MUCOSA PALATINA

No período de 7 dias, a análise em detalhes da superfície óssea palatina adjacente ao epitélio para os grupos de estudo CP, CLO, CET e NIS (Figura 18, de C a F, respectivamente) não evidenciou alterações no contorno ósseo em relação ao grupo CN (Figura 18A). Apenas no grupo CG foi possível observar alterações indicativas do processo de reabsorção óssea decorrente da atividade osteoclástica (Figura 18B). Já o tecido conjuntivo adjacente não exibiu alterações histológicas, apresentando-se ricamente celularizado e vascularizado para todos os grupos de estudo (Figura 18, de B a F) quando comparados ao grupo CN (Figura 18A).

No período de 14 dias, não foram observadas alterações na superfície óssea palatina do grupo CP (Figura 19C) em relação ao grupo CN (Figura 19A). Em comparação ao período de 7 dias (Figura 18), a análise do contorno do tecido ósseo dos grupos CG, CLO, CET e NIS (Figura 19B, D, E e F, respectivamente) em 14 dias de avaliação revelou maiores alterações do contorno da superfície palatina que no grupo CN (Figura 19A) devido a reabsorção óssea por osteoclastos, sendo mais extensa para o grupo CG (Figura 19B). Similarmente ao observado em 7 dias (Figura 18), o tecido conjuntivo não exibiu alterações histológicas significativas em todos os grupos de estudo no período de 14 dias de avaliação (Figura 19).

FIGURA 18- Fotomicrografias da superfície óssea palatina adjacente ao epitélio no período de 7 dias. Nota-se alterações (seta azul) de contorno no tecido ósseo (TO) do grupo CG (B) e normalidade do tecido conjuntivo (TC) adjacente em todos os grupos de estudo (C-F) em relação ao grupo CN (A). HE

FIGURA 19- Fotomicrografias da superfície óssea palatina adjacente ao epitélio no período de 14 dias. Nota-se alterações de contorno (seta azul) no tecido ósseo (TO) dos grupos CG (B), CLO (D), CET (E) e NIS (F) e normalidade do tecido conjuntivo (TC) adjacente em todos os grupos de estudo em relação ao grupo CN (A). HE

Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo preliminar objetivou viabilizar a adequação de um dispositivo acrílico intra-oral para ratos, que se mantivesse em contato com o palato dos animais por até 14 dias possibilitando posterior avaliação histopatológica padronizada e que fosse passível de reembasamento por material resiliente temporário para base de prótese modificado ou não por fármacos. O objetivo final dessa adequação foi estabelecer uma metodologia reproduzível que permitisse a realização de estudos in vivo sobre a biocompatibilidade de materiais resilientes temporários modificados pela adição de antifúngicos/antimicrobianos para o tratamento de estomatite protética.

A estomatite protética é considerada a forma de candidose bucal mais frequentemente encontrada nos usuários de próteses totais. Apesar de apresentar etiologia multifatorial, essa patologia é primariamente associada à infecção pelas espécies de *Candida*, sendo a *C. albicans* a mais prevalente, identificada em 50 a 93% dos casos (BAENA-MONROY et al., 2005; COELHO; SOUSA; DARÉ, 2004; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; MIMA et al., 2012; PIRES et al., 2002; SANITÁ et al., 2011).

As próteses removíveis parciais e totais funcionam como agentes catalisadores na iniciação da estomatite protética, pois podem bloquear o fluxo de anticorpos da saliva e a ação mecânica de limpeza da língua, desenvolvendo um ambiente aeróbico e acidulado propício para a proliferação microbiana e a formação de biofilmes (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1974; MAHONEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998). As células de *Candida* spp. apresentam capacidade de adesão não apenas às células epiteliais da mucosa bucal, mas também à resina acrílica da base das próteses, colonizando-a em profundidade (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; DAVENPORT, 1970; PEREIRA-CENCI et al., 2008). Dessa forma, mesmo sem outros fatores predisponentes, a superfície tecidual das próteses, sobretudo as totais superiores, favorece o desenvolvimento da estomatite protética (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1974; MIMA et al., 2012). Consequentemente, o tratamento dessa patologia deve ser direcionado à inibição dos micro-organismos colonizadores dessas superfícies (DAVENPORT, 1970; NEPPELENBROEK et al., 2008; OLSEN, 1975).

Os antifúngicos convencionais tópicos e sistêmicos para o tratamento da estomatite protética não atingem uma concentração suficiente para inibir eficientemente o biofilme nas superfícies teciduais das próteses, o que frequentemente leva a ocorrência de reinfecção em até duas semanas após a suspensão dessas terapias (BANTING; HILL, 2001; NEPPELENBROEK et al., 2008; RITCHIE et al., 1969; SANITÁ et al., 2011). A remoção do contato do biofilme das bases acrílicas com os tecidos de suporte das próteses por reembasamento, sem associação a outro método, tem sido relatada como eficaz para romper o ciclo de reinfecção por *Candida* e reduzir o trauma causado por essa superfície contaminada, auxiliando o tratamento da estomatite protética (HOLMBERG, 1980; MARÍN ZULUAGA; GOMEZ VELANDIA; RUEDA CLAUJO, 2011; MEDEIROS; PACHECO, 2000). Quando realizado com materiais resilientes, o reembasamento ainda favorece a recuperação dos tecidos injuriados e promove conforto ao paciente (BROWN, 1988; FARRELL, 1975). Por outro lado, os reembasadores resilientes, sobretudo os temporários, são facilmente degradáveis, o que favorece a recolonização microbiana das superfícies internas das próteses (MÄKILÄ; HOPSHAVU, 1977).

A incorporação de agentes antimicrobianos em materiais resilientes temporários tem sido sugerida para aumentar a longevidade clínica dos mesmos e reduzir o acúmulo de biofilme (ADDY, 1981; DOUGLAS; WALKER, 1973; NIKAWA et al., 1997; SCHNEID, 1992; THOMAS; NUTT, 1978). Essa associação tem sido considerada como uma alternativa viável para o tratamento da estomatite protética (CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986; MATSUURA et al., 1997; SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994) por ser instituída em um período médio correspondente à terapia convencional com antifúngico tópico e apresentar a vantagem de ação simultânea sobre os tecidos paraprotéticos injuriados e a infecção fúngica (CARTER; KERR; SHEPHERD, 1986). Entretanto, previamente à indicação do reembasamento das bases acrílicas das próteses removíveis com materiais resilientes modificados por fármacos como alternativa terapêutica para estomatite protética, é necessário conhecer a biocompatibilidade desse protocolo com os tecidos bucais.

A literatura pertinente mostra muitos estudos in vitro sobre a citotoxicidade de materiais reembasadores resilientes para base de prótese (KANIE et al., 2009; LEFEBVRE et al., 2001; OKITA; HENSTEN-PETTERSEN, 1991;

OZDEMIR; YILMAZ; YILMAZ, 2009; PARK et al., 2004; TAY et al., 2012). Essa constante preocupação justifica-se pelo fato dos reembasadores resilientes, principalmente os à base de resina acrílica, liberarem substâncias solúveis no meio bucal (CRAIG; GODWIN, 2002), tais como subprodutos e plastificantes (CHAVES et al., 2010; LEFEBVRE; KNOERNSCHILD; SCHUSTER, 1994; LEWIS; CHESTNER, 1981). Essas substâncias são consideradas como potencialmente tóxicas aos tecidos bucais (OZDEMIR; YILMAZ; YILMAZ, 2009), podendo clinicamente ocasionar injúrias como reações alérgicas, sinais e sintomas de inflamação, erosões mucosas e sensação de ardência (TAY et al., 2012). Foi sugerido que apesar de apresentarem composição à base de metacrilato, os condicionadores teciduais possuem in vitro maior citotoxicidade que as resinas autopolimerizáveis para base de prótese devido à adição de componentes como plastificantes e etanol (OKITA; HENSTEN-PETTERSEN, 1991). Os estudos de citotoxicidade in vitro utilizando fibroblastos de camundongos (KANIE et al., 2009; LEFEBVRE et al., 2001; OKITA; HENSTEN-PETTERSEN, 1991; OZDEMIR; YILMAZ; YILMAZ, 2009; PARK et al., 2004; TAY et al., 2012) e células orais humanas (HUANG et al., 2001) previamente aos ensaios clínicos são fundamentais para avaliar os materiais resilientes para base de prótese devido aos menores custos e à simplicidade e facilidade de reprodução (HUANG et al., 2001). Entretanto, esses estudos laboratoriais não são capazes de reproduzir condições in vivo, pois os tecidos bucais apresentam características específicas como a presença de mucina e ceratina, o que os tornam muito mais resistentes à ação de substâncias tóxicas em relação às células utilizadas in vitro (CHAVES et al., 2010; GEURTSSEN, 2000).

Pouco é conhecido sobre a biocompatibilidade in vivo dos reembasadores para base de prótese nos tecidos bucais mesmo quando não modificados com fármacos. O único estudo prévio in vivo (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997) disponível na literatura sobre esse assunto mostrou que os reembasadores testados em dispositivos intra-orais instalados no palato de ratos causaram aumento da espessura da camada queratinizada do epitélio, o que levou os autores a sugerirem mais pesquisas para investigar melhor esses efeitos. Além disso, não se tem conhecimento da biocompatibilidade dos materiais reembasadores resilientes modificados com fármacos para estomatite protética sobre os tecidos bucais. Entretanto, para viabilizar a realização dessa análise in vivo, tornou-se necessário

realizar um estudo preliminar para estabelecer um modelo animal experimental padronizado, que fosse prático e facilmente reproduzível.

Para a realização do presente estudo preliminar, foi selecionado como animal experimental o rato Wistar, que apresenta manejo relativamente simples e é facilmente anestesiável, além de ter sido elegido na investigação prévia semelhante (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997) e em outras pesquisas que utilizaram dispositivos intra-orais similares (JENNINGS; MACDONALD, 1992; OLSEN; BONDEVIK, 1978; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981; 1986). Além disso, o modelo animal deste estudo utilizou apenas ratos do sexo masculino para que não houvesse influência do ciclo hormonal (BORIN et al., 2006).

Estudos prévios foram conduzidos com o intuito de desenvolver e testar dispositivos acrílicos intra-orais adaptáveis à mucosa palatina de ratos com diferentes finalidades como indução e tratamento candidose bucal (JENNINGS; MACDONALD, 1992; MARTIN, 1989; OLSEN; BONDEVIK, 1978; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981; 1986) e investigação dos possíveis efeitos da pressão exercida pela base acrílica das próteses removíveis nos tecidos subjacentes (MORI et al., 1997; TSURUOKA et al., 2008). De uma forma geral, tais estudos obtiveram resultados positivos quanto à funcionalidade dos dispositivos acrílicos intra-orais. Apesar disso, modificações constantemente são propostas para utilização desses dispositivos em ratos, mesmo em estudos recentes, visando atender os objetivos propostos (LEE et al., 2011; (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; JOHNSON et al., 2012). Ao analisar os estudos que utilizaram dispositivos intra-orais em ratos, nota-se muitas diferenças nas metodologias empregadas, incluindo variáveis em relação às condições experimentais a que os mesmos são submetidos enquanto usuários desses aparatos (dieta e alojamento), à confecção e retenção dos dispositivos nos animais, à obtenção das amostras histológicas, à seleção da área histológica de interesse e aos critérios utilizados na análise histopatológica. Considerando esses aspectos, neste estudo foram realizadas as adequações necessárias para o estabelecimento de um modelo animal para a viabilização de dispositivos intra-orais passíveis de reembasamento por material resiliente modificado por agentes antimicrobianos e que, ao mesmo tempo, permanecessem na cavidade bucal dos ratos pelo período convencional de tratamento da estomatite protética (14 dias).

Em relação à alimentação dos animais, inicialmente foi experimentada a dieta líquida. Esta, apesar de propiciar menor acúmulo de detritos bem como a

manutenção dos dispositivos intra-orais em posição na cavidade bucal de todos os animais testados, causou perda de peso, escurecimento dos pelos e prostração dos mesmos, resultando na morte de muitos por desnutrição após 7 dias de avaliação. Isso provavelmente ocorreu porque os animais, previamente ao início dos experimentos deste estudo, foram alimentados com ração em pellets como é preconizado no Biotério da FOB/USP, até que atingissem a fase adulta, ou seja, durante 60 dias. É possível sugerir que nesse período, os ratos se adaptaram com a ração convencional, a qual embora apresente composição nutricional semelhante à dieta líquida utilizada na presente pesquisa, possui consistência, aroma e sabor diferentes. Esses fatores podem ter levado à rejeição à alimentação líquida e consequente desnutrição dos ratos. A dieta pastosa, apesar de promover maior acúmulo de detritos nos dispositivos intra-orais em relação à líquida, apresentou a vantagem de ser mais aceita pelos animais deste estudo, possivelmente por corresponder à própria ração utilizada previamente para a alimentação dos mesmos, mas processada na forma de pó misturado à água. A dieta em pó foi testada para um pequeno número de animais por solicitação dos técnicos do Biotério da FOB/USP para que a ração fosse oferecida na forma como comercialmente disponível, ou seja, sem mistura à água, evitando-se assim sua fermentação. Entretanto, a rejeição à dieta em pó foi maior em relação à dieta pastosa, resultando em perda de peso nos animais testados e na morte de um deles, além de maior acúmulo de detritos nos dispositivos intra-orais. Embora a dieta pastosa tenha sido a mais aceita entre os animais desta pesquisa, quando foi instituída em períodos superiores a 7 dias, resultou na perda de alguns animais por desnutrição, sendo que a maioria não ganhou peso ao longo do tempo. A menor aceitação pelos ratos por dietas não convencionais pode ser associada ao fato desses animais serem roedores e, portanto, mais seletivos aos alimentos sólidos. Ainda, a ração em forma de pellets apresenta menor segregação dos ingredientes e, consequentemente, menor quantidade de partículas de pó, o que facilita sua ingestão, tornando-a mais palatável (BEHNKE, 1996). Entretanto, como a presente metodologia envolveu a utilização de dispositivos intra-orais em ratos, a ração sólida não poderia ser adotada. Assim, neste estudo foi preconizada a dieta pastosa (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; OLSEN; BONDEVIK, 1978), visto que essa modificação propiciou melhores condições de sobrevivência para os ratos e ao mesmo tempo menor acúmulo de detritos entre os dispositivos intra-orais e a

mucosa palatina dos animais, ocasionando assim menor possibilidade de alterações descamativas na camada córnea (JENNINGS; MACDONALD, 1992).

Para propiciar melhores condições de alojamento foram determinadas modificações nas normas do Biotério da FOB/USP. No estudo piloto, os animais foram alojados da maneira convencional, ou seja, cinco ratos por gaiola com fundo recoberto por maravalha de pinus. Entretanto, ao longo do experimento, foi constatado que os fundos das gaiolas ficavam muito úmidos e sujos, o que levou à necessidade de colocação de papéis craft por cima da maravalha. Com o início da metodologia propriamente dita, foram adquiridos pisos aramados em aço inoxidável para a colocação no fundo das gaiolas, que segundo o próprio fabricante é indicado para animais em dietas controladas, auxiliando na prevenção do contato com a maravalha úmida. Com a utilização desses pisos sobre a camada de maravalha recoberta por papel craft, foi possível evitar o acúmulo de detritos, a coprofagia e a ingestão de maravalha devido à utilização dos dispositivos acrílicos intra-orais. Como diariamente a maravalha e o papel craft eram substituídos, as grades higienizadas e as gaiolas limpas, um ambiente de alojamento mais higiênico e confortável para os animais pôde ser criado, adotando-se esse protocolo para a metodologia do presente estudo. O corte da unha dos animais após a instalação dos dispositivos também foi preconizado por evitar ferimentos decorrentes da tentativa de remoção dos mesmos de posição. É importante ressaltar que na rotina do Biotério os próprios técnicos são responsáveis por oferecer a dieta aos animais e limpar as gaiolas em dias alternados. Entretanto, nesta pesquisa, como a forma da ração oferecida aos animais foi modificada, tornou-se responsabilidade do pesquisador realizar essas tarefas diariamente, fator esse não incluído no cronograma inicial. Além disso, a utilização do piso aramado reduziu o espaço para o alojamento dos animais permitindo no máximo três por gaiola, o que acarretou no maior número de gaiolas destinadas aos cuidados diários pelo pesquisador.

Algumas modificações nos dispositivos acrílicos intra-orais também foram necessárias para a presente pesquisa. No estudo piloto e no início da fase experimental propriamente dita, com o intuito de facilitar o processo de sua obtenção, os dispositivos intra-orais de resina acrílica foram confeccionados de forma padronizada para todos os animais, ou seja, a partir de um modelo preliminar como é descrito na metodologia de investigações prévias (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981). Essa facilidade

técnica foi proposta, pois o intuito principal era o reembasamento dos dispositivos intra-orais com o material resiliente temporário, o qual ficaria em íntimo contato com a mucosa palatina dos animais por ser plastificado diretamente na cavidade bucal dos mesmos. Assim, inicialmente, a moldagem individual seria realizada apenas no grupo CG, no qual os dispositivos intra-orais seriam utilizados sem reembasamento. Apesar de reduzir o tempo experimental pela eliminação da confecção de moldeira individual e da obtenção da moldagem de trabalho, os dispositivos intra-orais obtidos dos modelos preliminares não se comportaram da mesma maneira para todos os animais. Embora os ratos possuísem idade e peso similares, apresentaram muitas variações morfológicas na mucosa palatina, o que resultou em uma adaptação inadequada dos dispositivos nessa região durante os períodos de avaliação. Por isso, no presente estudo, foi então padronizada a moldagem individual prévia de todos os animais para obtenção dos dispositivos intra-orais reembasados ou não a partir do modelo de trabalho de cada rato (JENNINGS; MACDONALD, 1990; 1992; JOHNSON et al., 2012; LEE et al., 2011).

Considerando ainda as modificações propostas para adequação dos dispositivos intra-orais, foram testadas no início da fase experimental desta pesquisa diferentes sistemas para a retenção desses aparatos ao palato dos animais. A retenção por cimentação nos molares foi avaliada por ter sido utilizada nos estudos relacionados (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; LAMB; MARTIN, 1983; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981). Apesar da facilidade técnica relatada nessas pesquisas, todos os dispositivos intra-orais cimentados se soltaram da cavidade bucal dos animais testados no presente estudo após 4 dias de experimentação. Isso não foi observado para um mesmo número de animais testados simultaneamente utilizando o sistema de retenção por amarilhos adaptado para esta investigação. Nesse sistema, os dispositivos eram retidos por amarilhos com fios ortodônticos tanto nos incisivos quanto nos molares. Na presente pesquisa, apenas amarilhos foram utilizados na região interproximal dos incisivos, diferentemente dos estudos prévios que empregaram bandas soldadas nesta área (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; OLSEN; BONDEVIK, 1978). A maior parte (72,6%) dos dispositivos retidos com amarilhos utilizados neste estudo permaneceram em posição adequada nos ao longo do experimento, sobretudo durante o período de 7 dias. Quando houve perda dos dispositivos, esta foi verificada sempre após esse período, geralmente em torno do 10º dia.

Neste estudo, foram selecionados dois períodos de avaliação para a utilização dos dispositivos intra-orais nos animais previamente a análise histopatológica: 7 e 14 dias. O período inicial (7 dias) foi testado por ser um tempo médio no qual é possível se observar em análises histopatológicas a presença de infiltrado inflamatório (MIMA et al., 2010; OLSEN; BONDEVIK, 1978; TRINDADE et al., 2012). Já o período de avaliação de 14 dias foi selecionado por ser corresponder à vida útil de um reembasador resiliente temporário para prótese (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; MATSUURA et al., 1997; SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994) e ser um tempo médio utilizado para o tratamento convencional para estomatite protética com nistatina tópica (BANTING; HILL, 2001; MARTIN, 1989; MIMA et al., 2012; WEBB et al., 1998). Ambos os períodos também foram selecionados com base em estudos prévios que avaliaram propriedades biológicas, físicas e mecânicas de materiais resilientes temporários modificados com antimicrobianos (ALCANTARA et al., 2012; SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; URBAN et al., 2006; URBAN et al., 2009).

Para o reembasamento dos dispositivos intra-orais foi selecionado um reembasador resiliente temporário à base de resina acrílica (Trusoft), pois esse material, em comparação a um condicionador de tecido (Softone) apresentou melhores propriedades físicas, mecânicas e estruturais, independentemente da incorporação de fármacos (BUENO et al., 2012; BUENO et al., 2013; GALITESI et al., 2012). Já os fármacos utilizados para incorporação no reembasador resiliente foram selecionados com base em estudo prévio (BUENO et al., 2013) realizado para obter concentrações dos medicamentos bem inferiores às comercialmente disponíveis para o tratamento da estomatite protética, que pudessem ser efetivas para a infecção fúngica e ao mesmo tempo não interferissem com as propriedades dos materiais resilientes para base de prótese. Na investigação supracitada, os autores definiram as MCIs para vários agentes antimicrobianos quando incorporados em reembasadores temporários. As MCIs mais favoráveis para inibição do biofilme de *C. albicans*, obtidas com a nistatina, o cetoconazol e o diacetato de clorexidina, apresentaram efeito inócuo às propriedades de dureza Shore A (BUENO et al., 2012), rugosidade superficial (NEPPELENBROEK et al., 2012a), resistência à tração e porcentagem de alongamento (GALITESI et al., 2012; NEPPELENBROEK et al., 2012b) do material Trusoft em até 14 dias de avaliação.

Embora tenha sido realizado um estudo piloto na presente pesquisa, houve muitas complicações durante o experimento propriamente dito. Como descrito nos resultados, foi perdido um número considerável de animais ao longo do estudo, uma vez que dos 103 ratos selecionados para a metodologia propriamente dita, 30 foram excluídos da amostragem final. Alguns animais foram perdidos durante o procedimento de anestesia geral (JENNINGS; MACDONALD, 1992) e outros por desnutrição (OLSEN; BONDEVIK, 1978). Acredita-se que a perda de peso com consequente desnutrição seja decorrente da falta de adaptação dos animais à dieta não convencional, da dificuldade para alimentação com os dispositivos intra-orais em posição e do próprio trauma tecidual ocasionado por esses aparatos (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; OLSEN; BONDEVIK, 1978). Devido à adaptação do sistema de retenção dos dispositivos intra-orais com amarrilhos proposta neste estudo, era esperado que os mesmos se mantivessem em posição na cavidade bucal dos ratos ao longo dos períodos de avaliação. Isso foi verificado para a maioria dos animais, entretanto, como mencionado previamente, a perda dos aparatos foi observada para um número considerável de animais (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997) nos períodos que ultrapassavam 7 dias. Diferentemente do que é proposto por alguns autores (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997), a reinstalação dos dispositivos intra-orais nesta pesquisa não foi adotada, pois não era possível perceber quando o animal havia perdido o aparato, mesmo realizando monitoramento diário. Assim, foram excluídos da amostragem final todos os ratos que perderam os dispositivos intra-orais.

Além dos problemas relacionados diretamente aos animais e dispositivos acrílicos, foram observadas no presente estudo dificuldades na padronização dos métodos utilizados para a análise histopatológica. Os cortes histológicos obtidos de peças apenas de tecido mole (MARTIN, 1989; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981), correspondentes à maior porcentagem das peças histológicas desta pesquisa, não permitiram a localização de áreas histologicamente semelhantes. Foram observadas grandes discrepâncias na espessura e forma das estruturas de interesse (camada córnea, epitélio e lâmina própria) nos cortes de tecido mole dos animais, mesmo quando pertencentes ao mesmo grupo e sob o mesmo tempo de avaliação. Isso pode ser atribuído à ausência do tecido ósseo de suporte da mucosa palatina, das estruturas adjacentes e dos dentes molares dos animais uma vez que apenas o tecido mole foi incluído nos blocos de parafina. Como a padronização dos cortes

histológicos é fundamental para permitir a análise histopatológica quantitativa na futura avaliação *in vivo* da biocompatibilidade dos materiais resilientes modificados com os tecidos bucais dos animais, as amostras obtidas de tecido mole neste estudo foram desconsideradas. Assim, apenas as amostras de tecido mole e duro (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997; JENNINGS; MACDONALD, 1992; OLSEN; BONDEVIK, 1978; TSURUOKA et al., 2008) foram selecionadas neste estudo para a determinação da região histológica de interesse e realização da análise histopatológica descritiva.

Na presente pesquisa, os cortes macroscópicos abrangeram a região intermolares das amostras histológicas de tecido mole e duro (MARTIN, 1989). Após observação das condições experimentadas e análise ao microscópio óptico binocular foi possível restringir ainda mais a área a ser analisada. Dessa forma, foi selecionada a região abrangendo transversalmente os primeiros molares (direito e esquerdo). Essa seleção foi realizada com base em vários aspectos: a área em questão é a que apresentou o maior contato com o dispositivo intra-oral e possuiu o menor acúmulo de detritos, demonstrou histologicamente ser a região com menores variações no epitélio (espessura, contorno e número de camadas), conjuntivo (distante do tecido muscular e adiposo) e tecido ósseo (espessura da tábua óssea) e, ainda, correspondeu à área com ausência de alterações patológicas no epitélio sulcular (interproximal), pois o fio ortodôntico de retenção que causou defeito ósseo foi passado entre os segundos e terceiros molares. Para descrição histopatológica padronizada e possibilidade de reprodução deste estudo preliminar, determinou-se a região de interesse para análise. Assim, foi selecionada a seção que exibisse o epitélio mais fino e mais uniforme recobrendo o feixe neurovascular palatino (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997).

Como o número de amostras histológicas de tecido mole e duro foi restrito, destinado apenas à padronização da obtenção das mesmas, seleção da região de interesse e descrição histopatológica, não foi possível realizar uma análise quantitativa. Assim, apenas a análise qualitativa descritiva foi empregada, o que possibilitou uma mera comparação visual das imagens microscópicas obtidas com os diferentes grupos de estudo. Por essa comparação, é possível sugerir que, no período de 7 dias, o material resiliente temporário modificado ou não pelos fármacos testados não resultou em alterações histopatológicas em nível dos tecidos epitelial e conjuntivo dos animais que utilizaram os dispositivos intra-orais reembasados em

relação àquele que não o utilizou. Esse resultado corrobora com os achados (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997), que embora tenham observado aumento da espessura de queratina, não verificaram alterações nos compartimentos celular e epitelial na mucosa palatina dos animais usuários de dispositivos intra-orais reembasados com material resiliente.

Por outro lado, no período de 7 dias, quando o dispositivo intra-oral foi utilizado sem reembasamento, alterações no contorno ósseo da superfície palatina adjacente ao epitélio foram observadas. Esse processo de reabsorção óssea decorrente da atividade osteoclástica pode ser justificado pela ausência do material reembasador, o que ocasionou provavelmente maior impacto nos tecidos de suporte diretamente em contato com dispositivos intra-orais (FARRELL, 1975; NIKAWA et al., 1994; NIKAWA et al., 1997). Contudo, existem controvérsias em relação a esse efeito sobre o palato de ratos. Nakashima et al. (1994), concluíram que a reabsorção óssea não pode ser observada quando o tecido palatino é recoberto por uma base de acrílica de prótese sem qualquer pressão mecânica. Hara et al. (1996) relataram que a reabsorção óssea é causada pela pressão oclusal exercida através da base da prótese e sugeriram a possibilidade da existência de um limiar para a ocorrência deste tipo de reabsorção. No entanto, não é bem estabelecida a relação entre a reabsorção do tecido ósseo sob efeito de pressão mecânica contínua nas bases de próteses removíveis.

No período de 14 dias testado nesta pesquisa, as alterações histopatológicas observadas nos animais usuários dos dispositivos acrílicos pareceram ser mais acentuadas. Já em nível epitelial foi possível notar modificações histopatológicas em todos os animais com esses aparatos. As cristas epiteliais tiveram seu contorno alterado, mostrando-se encurtadas e deformadas e, ainda, na maioria dos grupos, foi observado aumento da espessura de queratina e compressão das células epiteliais e do conjuntivo da lâmina própria. Esses achados estão em acordo com os resultados de uma pesquisa que utilizou dispositivos intra-orais para testar o efeito da pressão contínua da resina acrílica da base protética sobre os tecidos de suporte do palato de ratos (MORI et al., 1997). Neste estudo, de forma semelhante às alterações do contorno ósseo observadas para o período de 7 dias quando o dispositivo intra-oral foi utilizado sem reeembasamento, a reabsorção óssea decorrente de atividade osteoclástica mostrou-se evidente no período de 14 dias, porém de forma mais intensa e ocorrendo de forma mais generalizada nos

grupos testados, exceto para o grupo com dispositivo reembasado com o material não modificado (CP) e para o grupo sem dispositivo (CN).

Para a avaliação de possíveis efeitos adversos e propriedades inerentes aos quesitos biológicos de novos materiais de uso odontológico sugere-se previamente aos ensaios clínicos em humanos, o delineamento de metodologias experimentais *in vitro* e/ou modelos animais. As adequações metodológicas realizadas nesta pesquisa para viabilizar e padronizar a utilização desses dispositivos intra-orais podem ser consideradas apropriadas para ao desenvolvimento de estudos futuros sobre a avaliação da biocompatibilidade, por meio de análise histopatológica quantitativa, dos materiais resilientes temporários incorporados ou não com fármacos na mucosa palatina de ratos. Os resultados futuramente obtidos irão agregar informações importantes aos já observados em estudos prévios que demonstraram que os antifúngicos cetoconazol e nistatina e o antimicrobiano clorexidina, quando incorporados em baixas concentrações em um reembasador resiliente temporário, foram efetivos em inibir o biofilme de *C. albicans* sem interferir com importantes propriedades físicas e mecânicas do material. Contudo, os resultados obtidos com modelos animais não podem ser considerados suficientes na indicação clínica de um material experimental ou de um tratamento. A avaliação *in vivo* proposta com os dispositivos acrílicos testados neste estudo apresenta limitações, pois importantes fatores como a remoção e higienização dos aparatos e deformação por carga oclusal em condições normais de alimentação não foram avaliados. Assim, são necessários estudos clínicos em humanos para que o protocolo de incorporação de fármacos em materiais resilientes temporários para base de prótese possa ser indicado com tratamento viável e alternativo para a estomatite protética.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nas adequações metodológicas realizadas no presente estudo preliminar e considerando as limitações de um modelo animal, foi possível concluir que:

- os dispositivos acrílicos intra-orais mantiveram-se adaptados satisfatoriamente à mucosa palatina dos ratos ao longo do experimento, sobretudo durante o período inicial de avaliação (7 dias);
 - os dispositivos acrílicos intra-orais foram passíveis de reembasamento diretamente na cavidade bucal dos animais, sendo que o material resiliente temporário testado com ou sem adição dos fármacos, manteve-se preservado, não apresentando sinais aparentes de degradação e deslocamento dos aparatos.
-

Referências

REFERÊNCIAS

- Addy M. In Vitro Studies into the Use of Denture Base and Soft Liner Materials as Carriers for Drugs in the Mouth. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1981 8(2):131-42.
- Addy M, Handley R. The Effects of the Incorporation of Chlorhexidine Acetate on Some Physical Properties of Polymerized and Plasticized Acrylics. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1981 8(2):155-63.
- Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.
- Al-Damouk J, MacDonald D. Oral Epithelial Response to Experimental Folate Deficiency in the Golden Hamster. *Epithelia*. 1987 1(257-66).
- Alcântara CS, de Macedo AF, Gurgel BC, Jorge JH, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel Bond Strength of Resilient Liner Modified by the Addition of Antimicrobial Agents to Denture Base Acrylic Resin. *J Appl Oral Sci*. 2012 Nov-Dec;20(6):607-12.
- Amanlou M, Beitollahi JM, Abdollahzadeh S, Tohidast-Ekrad Z. Miconazole Gel Compared with Zataria Multiflora Boiss. Gel in the Treatment of Denture Stomatitis. *Phytother Res*. 2006 Nov;20(11):966-9.
- Amin WM, Al-Ali MH, Salim NA, Al-Tarawneh SK. A New Form of Intraoral Delivery of Antifungal Drugs for the Treatment of Denture-Induced Oral Candidosis. *Eur J Dent*. 2009 Oct;3(4):257-66.
- Arendorf TM, Walker DM. Denture Stomatitis: A Review. *J Oral Rehabil*. 1987 May;14(3):217-27.
- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. Candida Albicans, Staphylococcus Aureus and Streptococcus Mutans Colonization in Patients Wearing Dental Prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 10 Suppl 1(E27-39).
- Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a Topical Antifungal Regimen for the Treatment of Oral Candidiasis in Older, Chronically Ill, Institutionalized, Adults. *J Can Dent Assoc*. 1995 Mar;61(3):199-200, 3-5.
- Banting DW, Hill SA. Microwave Disinfection of Dentures for the Treatment of Oral Candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001 21(1):4-8.
- Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the Presence of Candida Albicans in Denture-Related Stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51-9.
- Barclay SC, MacDonald DG, Watson IB. The Effect of Chairside Relining Materials on Rat Palatal Mucosa. *J Dent*. 1997 May-Jul;25(3-4):251-5.
- Barnabé W, de Mendonca Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of Sodium Hypochlorite and Coconut Soap Used as Disinfecting Agents in the
-

Reduction of Denture Stomatitis, Streptococcus Mutans and Candida Albicans. J Oral Rehabil. 2004 May;31(5):453-9.

Behnke KC. Feed Manufacturing Technology: Current Issues and Challenges. Animal Feed Science and Technology. 1996 62(1):49-57.

Bergendal T, Isacsson G. Effect of Nystatin in the Treatment of Denture Stomatitis. Scand J Dent Res. 1980 Oct;88(5):446-54.

Blomgren J, Berggren U, Jontell M. Fluconazole Versus Nystatin in the Treatment of Oral Candidosis. Acta Odontologica. 1998 56(4):202-5.

Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JR, Cruz OL. Behavioral and Histologic Experimental Model of Facial Nerve Regeneration in Rats. Braz J Otorhinolaryngol. 2006 Nov-Dec;72(6):775-84.

Braden M. Tissue Conditioners. I. Composition and Structure. J Dent Res. 1970 Jan-Feb;49(1):145-8.

Brown D. Resilient Soft Liners and Tissue Conditioners. Br Dent J. 1988 Jun 11;164(11):357-60.

Budtz-Jørgensen E. The Significance of Candida Albicans in Denture Stomatitis. Scand J Dent Res. 1974 82(2):151-90.

Budtz-Jørgensen E. Etiology, Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis of Oral Yeast Infections. Acta Odontol Scand. 1990 Feb;48(1):61-9.

Budtz-Jørgensen E, Bertram U. Denture Stomatitis. I. The Etiology in Relation to Trauma and Infection. Acta Odontol Scand. 1970 Mar;28(1):71-92.

Budtz-Jørgensen E, Løe H. Chlorhexidine as a Denture Disinfectant in the Treatment of Denture Stomatitis. Scand J Dent Res. 1972 80(6):457-64.

Bueno, MG, Lima, JFM, Sousa, EJB, Soares, S, Urban, VM, Neppelenbroek, KH. Hardness of Temporary Liners Modified by Antimicrobial MICs for *C.albicans*. In: IADR 90th General Session; 2012; Foz do Iguaçu, PR [anais eletrônicos]. Bauru: USP; 2012 [acesso em 2013 jun 28]. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2012rio/webprogram/Paper163099.html>.

Bueno MG, Urban VM, Barbério GS, Silva W, Porto VC, Pinto LR, Neppelenbroek KH. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *C. albicans* biofilm. Oral Dis. In Press 2013.

Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of Hard Chairside Reline Resins: Effect of Microwave Irradiation and Water Bath Postpolymerization Treatments. Int J Prosthodont. 2006 Mar-Apr;19(2):195-201.

Carter GM, Kerr MA, Shepherd MG. The Rational Management of Oral Candidosis Associated with Dentures. N Z Dent J. 1986 Jul;82(369):81-4.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in Vitro. *J Dent Res*. 2001 Mar;80(3):903-8.

Chaves CA, Machado AL, Carlos IZ, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Cytotoxicity of Monomers, Plasticizer and Degradation by-Products Released from Dental Hard Chairside Reline Resins. *Dent Mater*. 2010 Oct;26(10):1017-23.

Choi Y, Lee U, Lee B, Lee M. Pharmacokinetic Interaction between Itraconazole and Metformin in Rats: Competitive Inhibition of Metabolism of Each Drug by Each Other Via Hepatic and Intestinal Cyp3a1/2. *British journal of pharmacology*. 2010 161(4):815-29.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida Albicans* and *Candida Glabrata* Populations Associated with the Pathogenesis of Denture Stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):377-83.

Coelho CM, Sousa YT, Daré AM. Denture-Related Oral Mucosal Lesions in a Brazilian School of Dentistry. *J Oral Rehabil*. 2004 Feb;31(2):135-9.

Craig RG, Godwin WC. Properties of Athletic Mouth Protectors and Materials. *J Oral Rehabil*. 2002 Feb;29(2):146-50.

Davenport J. The Denture Surface. *British dental journal*. 1972 133(3):101.

Davenport JC. The Oral Distribution of *Candida* in Denture Stomatitis. *Br Dent J*. 1970 Aug 18;129(4):151-6.

Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. *Candida*-Associated Denture Stomatitis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001 46(5):443-6.

Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jørgensen E. *Candida*-Associated Denture Stomatitis in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Oct;90(1):81-6.

Douglas WH, Walker DM. Nystatin in Denture Liners--an Alternative Treatment of Denture Stomatitis. *Br Dent J*. 1973 Jul 17;135(2):55-9.

Falah-Tafti A, Jafari AA, Lotfi-Kamran MH, Fallahzadeh H, Hayan RS. A Comparison of the Efficacy of Nystatin and Fluconazole Incorporated into Tissue Conditioner on the in Vitro Attachment and Colonization of *Candida Albicans*. *Dental research journal*. 2010 7(1):18.

Farrell DJ. Tissue Conditioning and Tissue Conditioners. *Dent Clin North Am*. 1975 Apr;19(2):255-68.

Galitesi LL, Lima JFM, Urban VM, Hotta J, Soares, S, Neppelenbroek KH. Resistência à tração de reembasador temporário modificado com antimicrobianos. In: 25º Congresso Odontológico de Bauru; 2012; Bauru, SP [anais eletrônicos]. Bauru: USP; 2012 [acesso em 2013 jun 28]. Disponível em: http://www.cobusp.com.br/arquivos/AnaisEletronicos_25COB.pdf.

- Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of Denture Cleansers on Denture Liners Contaminated with Candida Species. *Clin Oral Investig*. 2009 Jun;13(2):237-42.
- Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2011 Jun;20(4):251-60.
- Geurtsen W. Biocompatibility of Resin-Modified Filling Materials. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000 11(3):333-55.
- Golecka M, Oldakowska-Jedynak U, Mierzwinska-Nastalska E, Adamczyk-Sosinska E. Candida-Associated Denture Stomatitis in Patients after Immunosuppression Therapy. *Transplant Proc*. 2006 Jan-Feb;38(1):155-6.
- Hennessey T. Some Antibacterial Properties of Chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research*. 1973 8(s12):61-7.
- Holmberg K. Oral Mycoses and Antifungal Agents. *Swed Dent J*. 1980 4(1-2):53-61.
- Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic Effects of Denture Base Materials on a Permanent Human Oral Epithelial Cell Line and on Primary Human Oral Fibroblasts in Vitro. *Int J Prosthodont*. 2001 Sep-Oct;14(5):439-43.
- Iacopino AM, Wathen WF. Oral Candidal Infection and Denture Stomatitis: A Comprehensive Review. *J Am Dent Assoc*. 1992 Jan;123(1):46-51.
- Jennings KJ, MacDonald DG. A Quantitative Method for Assessing Changes in Rat Palatal Histology under Denture-Like Appliances. *Arch Oral Biol*. 1990 35(7):557-9.
- Jennings KJ, MacDonald DG. Rat Palatal Histology Related to Denture-Like Appliances. *J Dent*. 1992 Aug;20(4):250-4.
- Johnson CC, Yu A, Lee H, Fidel PL, Jr., Noverr MC. Development of a Contemporary Animal Model of Candida Albicans-Associated Denture Stomatitis Using a Novel Intraoral Denture System. *Infect Immun*. 2012 May;80(5):1736-43.
- Kallus T. Evaluation of the Toxicity of Denture Base Polymers after Subcutaneous Implantation in Guinea Pigs. *J Prosthet Dent*. 1984 Jul;52(1):126-34.
- Kanie T, Tomita K, Tokuda M, Arikawa H, Fujii K, Ban S. Mechanical Properties and Cytotoxicity of Experimental Soft Lining Materials Based on Urethane Acrylate Oligomers. *Dent Mater J*. 2009 Jul;28(4):501-6.
- Kuhn D, George T, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. Antifungal Susceptibility of Candida Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002 46(6):1773-80.
- Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of Three Different Treatment Methods for Generalized Denture Stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994 Sep;72(3):283-8.
-

Lamb DJ, Martin MV. An in Vitro and in Vivo Study of the Effect of Incorporation of Chlorhexidine into Autopolymerizing Acrylic Resin Plates Upon the Growth of *Candida Albicans*. *Biomaterials*. 1983 Jul;4(3):205-9.

Lee H, Yu A, Johnson CC, Lilly EA, Noverr MC, Fidel PL, Jr. Fabrication of a Multi-Applicable Removable Intraoral Denture System for Rodent Research. *J Oral Rehabil*. 2011 Sep;38(9):686-90.

Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of Eluates from Light-Polymerized Denture Base Resins. *J Prosthet Dent*. 1994 Dec;72(6):644-50.

Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The Effect of Ph on the Cytotoxicity of Eluates from Denture Base Resins. *Int J Prosthodont*. 1995 Mar-Apr;8(2):122-8.

Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of Triclosan on the Cytotoxicity and Fungal Growth on a Soft Denture Liner. *J Prosthet Dent*. 2001 Apr;85(4):352-6.

Lewis BB, Chestner SB. Formaldehyde in Dentistry: A Review of Mutagenic and Carcinogenic Potential. *J Am Dent Assoc*. 1981 Sep;103(3):429-34.

Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of Denture-Induced Stomatitis: A Review. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1993 Sep;2(1):17-22.

Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends in microbiology*. 2001 9(1):34-9.

Mahonen K, Virtanen K, Larmas M. The Effect of Prosthesis Disinfection on Salivary Microbial Levels. *J Oral Rehabil*. 1998 Apr;25(4):304-10.

Mäkilä E, Honka O. Clinical Study of a Heat-Cured Silicone Soft Lining Material. *J Oral Rehabil*. 1979 Apr;6(2):199-204.

Mäkilä E, Hopsu-Havu VK. Mycotic Growth and Soft Denture Lining Materials. *Acta Odontol Scand*. 1977 35(4):197-205.

Marín 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.

Martin MV. A Comparison of Fluconazole and Ketoconazole in the Treatment of Rat Palatal Candidosis. *J Med Vet Mycol*. 1989 27(2):63-70.

Mathaba L, Davies G, Warmington J. The Genotypic Relationship of *Candida Albicans* Strains Isolated from the Oral Cavity of Patients with Denture Stomatitis. *Journal of medical microbiology*. 1995 42(5):372-9.

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.

McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype Distribution and Secretory Acid Proteinase Activity of *Candida Albicans* Isolated from the Oral Mucosa of Patients with Denture Stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1999 Jun;14(3):183-9.

Medeiros BSV, Pacheco FA. Relato de um caso clínico de uma lesão por dentadura (Estomatite por prótese) X uso de um antifúngico. *Rev Bras Patol Oral*. 2000; 1(1):1-4.

Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida Albicans* to Photodynamic Therapy in a Murine Model of Oral Candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar;109(3):392-401.

Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy Versus Conventional Antifungal Therapy for the Treatment of Denture Stomatitis: A Randomized Clinical Trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Oct;18(10):E380-8.

Mori S, Sato T, Hara T, Nakashima K, Minagi S. Effect of Continuous Pressure on Histopathological Changes in Denture-Supporting Tissues. *J Oral Rehabil*. 1997 Jan;24(1):37-46.

Nagem-Filho H, Chiodi-Netto J, De Araujo PA. Biocompatibility of Acrylic Resins Implants in Connective Tissue. *Estomatol Cult*. 1973 Jul-Dec;7(2):120-3.

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.

Neppelenbroek, K.H.; Bueno, M. G.; Sousa, E. J. B.; Hotta, J.; Soares, S.; Urban, V. M. Incorporation of fungal MICs on Roughness of Denture Liners. In: IADR 90th General Session, 2012a, Foz do Iguaçu, PR [anais eletrônicos]. Bauru: USP; 2012 [acesso em 2013 jun 28]. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2012rio/webprogram/Paper165889.html>

Neppelenbroek, K. H.; Galitesi, L. L.; Bueno, M. G.; Soares, S.; Freitas, R.; Oliveira, P. C. G.; Urban, V. M. Ultimate Tensile Strength of Temporary Liners after Addition of Antimicrobials. In: Sixth International Association for Dental Research Pan-European Region Meeting (IADR/PER), 2012, Helsinki, HEL [anais eletrônicos]. Bauru: USP; 2012b [acesso em 2013 jun 28]. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/per12/webprogram/Paper167730.html>

Newton AV. Denture sore mouth as possible etiology. *Br Dent J*. 1962 May; (1): 357-60.

Nikawa H, Iwanaga H, Hamada T, Yuhta S. Effects of Denture Cleansers on Direct Soft Denture Lining Materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1994 72(6):657-62.

- Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakanoda S. Antifungal Effect of Zeolite-Incorporated Tissue Conditioner against *Candida Albicans* Growth and/or Acid Production. *J Oral Rehabil*. 1997 May;24(5):350-7.
- Okita N, Hensten-Pettersen A. In Vitro Cytotoxicity of Tissue Conditioners. *J Prosthet Dent*. 1991 Nov;66(5):656-9.
- Olsen I. Denture Stomatitis. Effects of Chlorhexidine and Amphotericin B on the Mycotic Flora. *Acta Odontol Scand*. 1975 33(1):41-6.
- Olsen I, Bondevik O. Experimental *Candida*-Induced Denture Stomatitis in the Wistar Rat. *Scand J Dent Res*. 1978 Sep;86(5):392-8.
- Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In Vitro Evaluation of Cytotoxicity of Soft Lining Materials on L929 Cells by Mtt Assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Jul;90(1):82-6.
- Park SK, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Changes in Properties of Short-Term-Use Soft Liners after Thermocycling. *J Oral Rehabil*. 2004 Jul;31(7):717-24.
- Passeri LA, de Carvalho AC. Biocompatibility of Tissue Conditioners--Histological Study in Rats. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1985 Sep;27(3):167-73.
- Pavan S, dos Santos PH, Filho JN, Spolidorio DM. Colonisation of Soft Lining Materials by Micro-Organisms. *Gerodontology*. 2010 Sep;27(3):211-6.
- 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.
- Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* Species in Denture Wearers with Emphasis on Hiv Infection: A Literature Review. *J Prosthet Dent*. 2005 Mar;93(3):288-93.
- Pfaller MA. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med*. 2012 Jan;125(1 Suppl):S3-13.
- Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture Stomatitis and Salivary *Candida* in Brazilian Edentulous Patients. *J Oral Rehabil*. 2002 Nov;29(11):1115-9.
- Quinn DM. The Effectiveness, in Vitro, of Miconazole and Ketoconazole Combined with Tissue Conditioners in Inhibiting the Growth of *Candida Albicans*. *J Oral Rehabil*. 1985 Mar;12(2):177-82.
- Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture Plaque and Adherence of *Candida Albicans* to Denture-Base Materials in Vivo and in Vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999 10(1):99-116.
- Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. Effect of Antifungal Gels Incorporated into a Tissue Conditioning Material on the Growth of *Candida Albicans*. *Gerodontology*. 2010 27(4):292-6.
-

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.

Ritchie GM, Fletcher AM, Main DM, Prophet AS. The Etiology, Exfoliative Cytology, and Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1969 Aug;22(2):185-200.

Rogers TR. Antifungal Drug Resistance: Does It Matter? *International journal of infectious diseases.* 2002 6(S47-S53).

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-Associated Denture Stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Mar;16(2):e139-43.

Sanità PV, Machado ALc, Pavarina ACu, Massucato E, Colombo AL, Vergani CE. Microwave Denture Disinfection Versus Nystatin in Treating Patients with Well-Controlled Type 2 Diabetes and Denture Stomatitis: A Randomized Clinical Trial. *The International journal of prosthodontics.* 2012 25(3):232.

Sanità PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. Candida Spp. Prevalence in Well Controlled Type 2 Diabetic Patients with Denture Stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Jun;111(6):726-33.

Schneid TR. An in Vitro Analysis of a Sustained Release System for the Treatment of Denture Stomatitis. *Spec Care Dentist.* 1992 Nov-Dec;12(6):245-50.

Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Induced Palatal Candidosis in the Wistar Rat. *Arch Oral Biol.* 1981 26(10):787-93.

Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Effect on Experimental Palatal Candidosis in the Wistar Rat of Removal and Re-Insertion of Acrylic Appliances. *Arch Oral Biol.* 1986 31(9):617-21.

Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the Geriatric Patient. *J Am Geriatr Soc.* 2002 Mar;50(3):535-43.

Silveira, Elcia Maria Varize. Mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamatória frente à implantação de membrana de cortical óssea bovina no tecido subcutâneo de camundongos: caracterização histomorfométrica, imunoenzimática e molecular; Mechanisms involved in immune and inflammatory response to implantation of bovine bone cortical membrane in subcutaneous tissue of mice: characterization histomorphometric, imunoenzymatic and molecular: Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru; 2012.

Singh K, Chand P, Singh BP, Patel CB. Study of the Effect of Surface Treatment on the Long Term Effectiveness of Tissue Conditioner. *J Oral Sci.* 2010 Jun;52(2):261-5.

Soysa NS, Ellepola AN. The Impact of Cigarette/Tobacco Smoking on Oral Candidosis: An Overview. *Oral Dis.* 2005 Sep;11(5):268-73.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Antimicrobials as a Contributory Factor in Oral Candidosis--a Brief Overview. *Oral Dis.* 2008 Mar;14(2):138-43.

Spiechowicz E, Santarpia RP, 3rd, Pollock JJ, Renner RP. In Vitro Study on the Inhibiting Effect of Different Agents on the Growth of *Candida Albicans* on Acrylic Resin Surfaces. *Quintessence Int.* 1990 Jan;21(1):35-40.

Tay LY, Herrera DR, Quishida CC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of Water Storage and Heat Treatment on the Cytotoxicity of Soft Liners. *Gerodontology.* 2012 Jun;29(2):e275-80.

Thomas CJ, Nutt GM. The in Vitro Fungicidal Properties of Visco-Gel, Alone and Combined with Nystatin and Amphotericin B. *J Oral Rehabil.* 1978 Apr;5(2):167-72.

Tobouti PL. Avaliação da expressão gênica da proteína aspartil secretada 2, 5 e 9 (SAP-2, SAP-5 e SAP-9) e sua correlação com a invasão epitelial por *Candida albicans* em modelo experimental de estomatite protéica in vivo; Evaluation of gene expression of secreted aspartyl proteinase-2,-5 and-9 (SAP-2, SAP-5 and SAP-9) and its correlation with epithelial invasion by *Candida albicans* in a in vivo denture stomatitis experimental model: Univeridade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru; 2011.

Tomida M, Nakano K, Sato M, Matsuura S, Kawakami T. Histopathological Examination of Newly-Developed Adhesive Silicone Denture Relining Material. *Eur J Med Res.* 2011 Jul 25;16(7):328-30.

Trindade FZ, Pavarina AC, Ribeiro AP, Bagnato VS, Vergani CE, Costa CA. Toxicity of Photodynamic Therapy with Led Associated to Photogem(R): An in Vivo Study. *Lasers Med Sci.* 2012 Mar;27(2):403-11.

Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a New Assay Technique for Quantification of Antifungal Activity of Nystatin Incorporated in Denture Liners. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 1994 71(5):517-24.

Tsuruoka M, Ishizaki K, Sakurai K, Matsuzaka K, Inoue T. Morphological and Molecular Changes in Denture-Supporting Tissues under Persistent Mechanical Stress in Rats. *J Oral Rehabil.* 2008 Dec;35(12):889-97.

Urban VM, de Souza RF, Arrais CA, Borsato KT, Vaz LG. Effect of the Association of Nystatin with a Tissue Conditioner on Its Ultimate Tensile Strength. *J Prosthodont.* 2006 Sep-Oct;15(5):295-9.

Urban VM, Seo RS, Giannini M, Arrais CA. Superficial Distribution and Identification of Antifungal/Antimicrobial Agents on a Modified Tissue Conditioner by Sem-Eds Microanalysis: A Preliminary Study. *J Prosthodont.* 2009 Oct;18(7):603-10.

Urban VM, Lima TF, Bueno MG, Gianini M, Arioli-Filho JN, Almedia ALPF, Neppelenbroek KH. Effect of the addition of antimicrobial agents on Shore A hardness and roughness of soft relene materials. *Eur J Oral Sci.* 2013. In Press 2013.

Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture Contamination by Yeasts in the Elderly. *Gerodontology.* 2008 Dec;25(4):222-8.

Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-Year Study of Candida-Associated Denture Stomatitis Treatment in Aged Care Subjects. *Gerodontology*. 2005 Sep;22(3):168-76.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-Associated Denture Stomatitis. Aetiology and Management: A Review. Part 1. Factors Influencing Distribution of Candida Species in the Oral Cavity. *Aust Dent J*. 1998 Feb;43(1):45-50.

Weerasuriya N, Snape J. Oesophageal Candidiasis in Elderly Patients: Risk Factors, Prevention and Management. *Drugs Aging*. 2008 25(2):119-30.

Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of Candida Species Colonization and Denture-Related Stomatitis in Complete Denture Wearers. *Med Mycol*. 2011a Feb;49(2):208-11.

Zomorodian K, Rahimi MJ, Pakshir K, Motamedi M, Ghiasi MR, Rezashah H. Determination of Antifungal Susceptibility Patterns among the Clinical Isolates of Candida Species. *J Glob Infect Dis*. 2011b Oct;3(4):357-60.

Anexos

ANEXO A

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 026/2011

Bauru, 13 de setembro de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação in vivo da biocompatibilidade de reembasador resiliente temporário modificado com agentes antimicrobiano e antifúngico na mucosa palatina de ratos**, de autoria de Juliana Hotta, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO “*ad referendum*” desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Karin Hermana Neppelenbroek

Docente do Departamento de Prótese

ANEXO B

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 26/2011

Bauru, 28 de junho de 2013.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para alteração no título da pesquisa "*Avaliação in vivo da biocompatibilidade de reembasador resiliente temporário modificado com agentes antimicrobiano e antifúngico na mucosa palatina de ratos*", para "*Viabilidade do uso de dispositivo acrílico intra-oral reembasado por material resiliente temporário modificado por antimicrobianos: estudo preliminar em ratos*", de autoria de Juliana Hotta, sob sua orientação, informamos a **APROVAÇÃO ad referendum** desta Comissão.

Lembramos que ao término da pesquisa as autoras deverão enviar um relatório final com os resultados obtidos para análise e emissão de parecer, o qual poderá ser utilizado para publicação em revistas científicas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

Profª Drª Karin Hermana Neppelenbroek

Docente do Departamento de Prótese

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>