AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no Tratamento
da Estomatite Protética**

André Machado de Senna

**Tese apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira**

**São Paulo
2012**

Dedico este trabalho à

Mary, grande amor de minha vida.

*Mary, esta tese não teria sido realizada se eu não
tivesse você incondicionalmente ao meu lado, dando
amor, força, carinho, cuidando de tudo e ainda de
nossa Mariah!*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, por me receber como aluno e possibilitar a realização desta tese.

À Secretaria Estadual de Ciência e Tecnologia do Estado do Tocantins (SECT) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro por meio do Edital SECT n. 02/2009 - Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS 2008/2009).

Ao Conselho Estadual de Ciência e Tecnologia do Tocantins, pela bolsa concedida por meio do Programa de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu.

À Fundação de Medicina Tropical do Tocantins, instituição na qual foram realizadas as análises laboratoriais deste trabalho.

Ao Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos, ITPAC, de Araguaína – TO, que sediou a parte clínica do projeto.

Ao Laboratório de Materiais de Referências do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, pelo fornecimento dos microrganismos testados neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Alguns colaboraram no início. Alguns colaboraram no durante. Alguns colaboraram no final. Alguns colaboraram o tempo todo e outros durante só um tempo... Fato é que não se faz uma caminhada tão longa isoladamente.

Por onde passei encontrei pessoas dispostas a ajudar. Recebi ajuda das mais diversas formas. Com trabalho árduo ao lado, com boas ideias, com raciocínios que não me haviam surgido. Ajudas profissionais ou mesmo o simples fato de estar ao lado. Alguns por pequenos momentos e outros, incrivelmente, o tempo todo, sempre ali, ao lado. Obrigado a todos, todos vocês!

À minha esposa Mary Lúcia Gomes Silveira de Senna. Mais uma vez estamos juntos vencendo etapas, agora em companhia da Mariah. Obrigado por percorrer este caminho, permanecendo incondicionalmente ao meu lado, me dando força, carinho e amor. Obrigado por simplesmente ser a Mary!

À minha mãe, Maria da Penha Machado de Senna. Eu não teria chegado até aqui sem os ensinamentos e valores que a senhora e o meu pai, Bernardino Turíbio de Senna, nos ensinaram. Assim, acho que esta é uma conquista nossa e a senhora pode se considerar um pouquinho doutora também!

Aos meus irmãos, Roque, Lígia, Sueli, Robinson, Carlão, Miguel (aonde quer que você esteja) e Rosa. Também, João Milton, Meire, Henrique e todos os sobrinhos. Nossa família é a base de todas as nossas conquistas, obrigado a todos vocês!

À minha orientadora, Martha Marques Ferreira Vieira, que mais uma vez confiou em mim e me acolheu, orientando este trabalho com serenidade e competência durante todo o período da realização do doutorado. Professora, nunca esquecerei a oportunidade a mim concedida!

Ao Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin, que sempre conseguiu enxergar mais adiante e teve participação decisiva para que este doutorado acontecesse.

Ao meu amigo, Fernando Moreira, companheiro de todas as horas e sempre disposto a nos ajudar e nos orientar pelos caminhos do ensino no IPEN.

Aos meus amigos Lúcia, Guilherme e Henrique, pela sempre calorosa acolhida.

À minha irmã Rosa, também professora do grupo de biofotônica: o que seria de mim e desta tese sem as suas aulas de microbiologia e controle de qualidade?

À Dayany, técnica do laboratório de Micologia e Biofotônica da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins, que sempre se dispôs a ajudar e muito colaborou nesta pesquisa.

Ao professor Joênes Mucci Peluzio, pela colaboração na realização da análise estatística.

À professora Angélica Pereira Rocha Ogata, que se juntou ao grupo um pouco mais tarde, mas que atuou firmemente na triagem e atendimento aos pacientes.

À professora Patrícia Arantes, obrigado pela força durante toda a realização do doutorado.

Aos professores colegas de disciplinas na Faculdade de Odontologia do ITPAC: Luzia, Izaura, Fabíola, Marcelo e Leandro. Obrigado pelo companheirismo durante a jornada.

Aos professores das disciplinas de Semiologia do ITPAC, Anelise Ribeiro Peixoto Alencar e José Ferreira de Menezes Filho, obrigado pela colaboração na triagem dos pacientes.

Aos professores da disciplina de Prótese Total do ITPAC, Carlos, Roberto e Lisliane. Obrigado pela força no acesso aos pacientes.

Ao meu amigo Paulo Márcio de Mendonça Pinheiro, companheiro mesmo na adversidade: amigo é coisa para se guardar debaixo de sete chaves.

Aos meus mestres nesta etapa: Afonso Rodrigues de Aquino, Alberto Saburo Todo, Ana Helena de Almeida Bressiani, Aparecido Osdimir Bertolin, Eliana Cristina da Silva Rigo, Heitor Franco de Andrade Júnior, José Carlos Bressiani, Luís Antônio Albiac Terremoto, Marcelo Yoshimoto, Marcia Martins Marques, Maria Aparecida Faustino Pires, Martha Marques Ferreira Vieira, Martha Simões Ribeiro, Nanci do Nascimento e Rodolfo Politano. Obrigado por compartilhar o conhecimento e contribuir enormemente para minha formação. Apreendi muito nas aulas, porém muito mais na convivência com vocês.

Ao professor Anderson Zanardi de Freitas, pela ajuda na realização da OCT.

Aos estagiários de iniciação científica do grupo de Biofotônica da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins, Fabiana, Raquel, Claudiene, Flavielly, Lucas, Allyni, Karina, Kháryta, Patrícia, Tarcísio, Arsení e Allana. A caminhada foi longa e árdua, mas vejo um futuro brilhante para vocês.

Aos colegas da FMT, Fernanda, Andréa, Ruth, Rebeca, Poliana e Fábio, que nos socorriam quando faltavam mãos para tocar todos os pilotos e os exaustivos experimentos laboratoriais.

Ao Renato, à Ilka, à professora Martha Ribeiro e aos demais colegas de seu grupo, que sempre me ajudaram durante as passagens pelo CLA.

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA

ANDRÉ MACHADO DE SENNA

RESUMO

A estomatite protética (EP), também designada de candidíase atrófica crônica, é a infecção fúngica bucal mais comum em indivíduos portadores de prótese total. Possui etiologia multifatorial, no entanto a presença de *Candida* spp. no biofilme da prótese é tida como o fator mais importante para o estabelecimento da EP. Este trabalho teve como objetivo avaliar o tratamento da EP por meio do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT), mediada pelo azul de metileno. Foram realizados estudos pré-clínicos e clínicos. Protótipos simuladores de prótese total foram confeccionados com polímero de metilmetacrilato, para servir de base para o crescimento do biofilme das seguintes espécies do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Como fotossensibilizador foi utilizada a solução de azul de metileno em uma concentração de 450µg/mL. Os protótipos com os biofilmes foram irradiados com um laser de comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW, por um tempo de 80 segundos. Para o estudo clínico, os indivíduos foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo recebeu tratamento convencional, à base do antifúngico Miconazol. O segundo grupo recebeu como tratamento a PDT. Os resultados pré-clínicos mostraram que todas as espécies do gênero *Candida* foram susceptíveis à PDT, ocorrendo uma redução de colônias que variou de 2,48 a 3,93 log₁₀. Os resultados clínicos foram avaliados tanto quanto à redução de colônias de *Candida* spp. na mucosa e na prótese, como quanto à melhora do aspecto clínico da mucosa afetada. Tanto a terapia convencional quanto a PDT foram eficientes em tratar a EP. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos instituídos para nenhum dos fatores avaliados. Assim, concluiu-se que a PDT é efetiva no tratamento da estomatite protética.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica; Estomatite Protética, *Candida*, Candidíase Atrófica Crônica, Laser, Prótese Total.

PHOTODYMANIC ANTIMICROBIAL THERAPY IN THE TREATMENT OF DENTURE STOMATITIS

ANDRÉ MACHADO DE SENNA

ABSTRACT

Denture stomatitis (DS), also called chronic atrophic candidiasis, is the most common oral fungal infection in denture wearers. It has a multifactorial etiology, but the presence of *Candida* spp. biofilm on the denture is considered the most important factor for the establishment of the DS. This study aimed to evaluate the treatment of DS through the use of photodynamic antimicrobial therapy (PAT), mediated by methylene blue. For this purpose, preclinical studies and clinical trials were performed. Simulators prototypes dentures were made of methyl methacrylate polymer to serve as a basis for biofilm growth of the following species of *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*. Methylene blue solution at a concentration of 450µg/mL was used as a photosensitizer. The prototypes and biofilms were irradiated with a laser of wavelength of 660 nm, potency of 100 mW, for 80 seconds. For the clinical study, subjects were divided into two groups. The first group received conventional treatment based on the use of antifungal Miconazole. The second group received the treatment by PAT. The preclinical results showed that all species of the genus *Candida* were susceptible to PAT, with a reduction in colonies that ranged from 2.48 to 3.93 log₁₀. Clinical outcomes were evaluated for the reduction of colonies of *Candida* spp. located in the mucosa and in the prosthesis and relative to the improvement of the clinical aspect of the affected mucosa. Both the conventional therapy and PAT were effective in treating DS. There was no significant statistical difference between PAT and conventional treatment for any of the factors evaluated. Thus, it was concluded that PAT is effective in the treatment of denture stomatitis.

Keywords: Photodynamic Therapy, Denture Stomatitis, *Candida*, Chronic Atrophic Candidiasis, Laser, Complete Denture.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 A Estomatite Protética	18
3.2 O Biofilme e o envolvimento de <i>Candida</i> spp.	19
3.3 O tratamento convencional e as terapias já propostas	20
3.4 A Terapia Fotodinâmica e o azul de metileno	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Ensaios pré-clínicos	25
4.1.1 As espécies e linhagens de <i>Candida</i> spp. utilizadas	25
4.1.2 A confecção dos protótipos	26
4.1.3 A formação do biofilme	27
4.1.4 A realização da PDT nos protótipos	27
4.2 Ensaios clínicos	29
4.2.1 Considerações Éticas	29
4.2.2 Seleção de Indivíduos	30
4.2.3 Procedimentos iniciais	30
4.2.4 A PDT e a terapia convencional	32
4.2.5 Laser utilizado	34
4.2.6 Documentação fotográfica	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Ensaios pré-clínicos	35
5.1.1 Formação do biofilme	35
5.1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana nos biofilmes	37
5.2 Ensaios clínicos	45
5.2.1 Descrição da amostra	45
5.2.2 Classificação de Newton	49

5.2.3 Ocorrência de <i>Candida</i> spp.....	51
5.2.4 Diagnóstico clínico de EP e ausência de <i>Candida</i> spp.	55
5.2.5 Avaliação Clínica da terapia convencional e da PDT	58
5.2.5.1 Avaliação clínica da terapia convencional.....	58
5.2.5.2 Avaliação clínica da PDT	60
5.2.6 Avaliações microbiológicas relativas aos ensaios clínicos	64
5.2.6.1 Avaliação microbiológica da terapia convencional na mucosa.....	64
5.2.6.2 Avaliação microbiológica da PDT na mucosa	66
5.2.6.3 Avaliação microbiológica da terapia convencional na prótese	68
5.2.6.4 Avaliação microbiológica da PDT na prótese.....	70
5.2.7 A permanência da hiperplasia papilar	73
5.2.8 A falta de resposta clínica	75
5.2.9 A questão do tingimento das próteses pelo Azul de Metileno	78
5.2.10 Comparação entre a terapia convencional e a PDT.....	80
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS	85
ANEXO 1	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: *Acquired Immune Deficiency Syndrom* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

ATCC: *American Type Culture Collection*

C. albicans: *Candida albicans*

C. dubliniensis: *Candida dubliniensis*

C. glabrata: *Candida glabrata*

C. guilliermondii: *Candida guilliermondii*

C. krusei: *Candida krusei*

C. parapsilosis: *Candida parapsilosis*

C. tropicalis: *Candida tropicalis*

CONSORT: *Consolidated Standards of Reporting Trials*

EP: Estomatite Protética

FIG.: Figura

GaAIs: Arseneto de Gálio e Alumínio

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

ITPAC: Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos

J/cm²: Joules por centímetro quadrado

L: Litro

L-A-: Grupo não irradiado e não exposto ao fotossensibilizador

L-A+: Grupo não irradiado, mas exposto ao fotossensibilizador

L+A-: Grupo irradiado, mas não exposto ao fotossensibilizador

L+A+: Grupo irradiado e exposto ao fotossensibilizador

LED: *Light emitting diode* (diodo emissor de luz)

mM: Milimolar

mm: Milímetro

mW: MiliWatt

n: Amostra

nm: Nanometro

OCT: *Optical Coherence Tomography* (Tomografia por Coerência Óptica)

p: Probabilidade

pH: Potencial hidrogeniônico

PT: Prótese total removível

S. mutans: *Streptococcus mutans*

sp.: Espécie

spp.: Espécies

TAB.: Tabela

TO: Tocantins

UFC: Unidade formadora de colônia

YEPD: *Yeast Extract-Peptone-Dextrose*

°C: Grau Celsius

µg: Micrograma

1- INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP), também denominada de Candidíase Atrófica Crônica, é a infecção fúngica bucal mais comum em indivíduos portadores de prótese total (Lund *et al.*, 2010; Neville *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 1998). Sua prevalência pode variar de 17% a 77,5% entre os usuários de próteses totais, dependendo da população estudada (Gendreau e Loewy, 2011). Localiza-se sob a base da prótese total, mais frequentemente no rebordo superior e é caracterizada por um eritema difuso, ora homogêneo, ora representado por pontos ou áreas focais avermelhados, além de apresentar variadas alterações na textura e superfície da mucosa palatina (Batista *et al.*, 1999).

Apesar da aparência clínica, a EP na maior parte das vezes é assintomática e os indivíduos portadores não sabem de sua existência. Quando há sintomatologia, as manifestações mais comuns são a sensação de queimadura ou desconforto e o relato de gosto ruim na boca (Ramage *et al.*, 2005). Mesmo assintomática, a EP deve ser tratada, pois pode servir de reservatório para outras infecções mais extensas (Salerno *et al.*, 2011).

A etiologia da estomatite protética é multifatorial e diversos fatores estão relacionados à sua ocorrência: a adaptação deficiente da prótese, fato que gera instabilidade e trauma no rebordo subjacente; o uso contínuo, a não remoção para dormir e a higiene inadequada da mesma, atitudes que favorecem a diminuição do fluxo salivar e do pH da saliva; o tempo de uso (idade) da prótese, pois com o passar do tempo a prótese perde suas condições ideais, tanto do material de base, quanto da oclusão e adaptação (Gendreau e Loewy, 2011; Emami *et al.*, 2008; Figueiral *et al.*, 2007).

Mesmo com vários fatores predisponentes, a presença de *Candida* spp. no biofilme da prótese é tida como o fator mais importante para o estabelecimento da estomatite protética. Apesar disto, a simples substituição da

prótese antiga contaminada por nova prótese em boas condições não cura a EP (Kulak *et al.*, 1994).

Candida albicans é a espécie mais comum de fungos do gênero *Candida* e é responsável pela maioria das infecções de candidíase bucal, sobretudo em usuários de prótese total. Além da *C. albicans*, outras espécies como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* são reconhecidas como patógenos capazes de competirem com a microbiota bucal e se tomarem patogênicas (Zomorodian *et al.*, 2011; Marcos-Arias *et al.*, 2009).

O tratamento padrão para a estomatite protética envolve o uso de formulações antifúngicas sistêmicas ou tópicas para a eliminação de *Candida* spp., o uso de agentes antimicrobianos, a cuidadosa higienização das próteses para controle do biofilme e a remoção das mesmas para dormir (Salerno *et al.*, 2011). Muitos agentes antifúngicos estão disponíveis para a terapia, como os derivados poliênicos e os derivados azólicos, porém, devido à sua característica local, o tratamento pode ser feito com o antifúngico Miconazol, que, por possuir apresentação em gel oral com adesivo, permite um maior tempo de permanência na boca (Boraks, 2001).

Há que se ressaltar que a estomatite protética não é de fácil tratamento e com frequência apresenta recidivas (Gendreau e Loewy, 2011); além disso, a crescente resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica. Existem poucas formulações novas de uso tópico, desenvolvidas especificamente para uso bucal. O desenvolvimento de tais formulações para esse sítio apresenta desafios adicionais: o requisito de não ser dissolvido facilmente pela saliva; a necessidade de ser palatável e ainda não alterar o paladar; a capacidade de resistir à remoção pela ação mecânica da língua e a qualidade de não produzir sensações desagradáveis, como o ardor. Novas formulações dos fármacos disponíveis ainda são necessárias para o tratamento das doenças bucais, assim como a pesquisa de novos sistemas de tratamento, principalmente para uso tópico (Sankar *et al.*, 2011).

Outro item a ser observado é que um dos aspectos postulados como causador da recidiva é a contaminação da superfície e das porosidades do material de base da prótese (Glass *et al.*, 2004). Colônias de *Candida* spp.

crecem nos interstícios microscópicos da base de material acrílico das próteses (Cawson *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2010).

Tal crescimento ocorre em forma de biofilme, o qual, para sua formação, passa por quatro etapas: adesão inicial ao substrato, colonização, acumulação e, no clímax do desenvolvimento, o biofilme maduro (Ramage *et al.*, 2005). As irregularidades da superfície da prótese favorecem a adesão inicial (Silva *et al.*, 2010). Por outro lado, a capacidade de um microrganismo se organizar em biofilmes torna-o muito mais resistente às terapias antifúngicas e às defesas do hospedeiro (Seneviratne *et al.*, 2008; Ramage *et al.*, 2004).

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica que se mostra efetiva, *in vitro* e *in vivo* contra bactérias e fungos, incluindo cepas resistentes aos fármacos (Dovigo *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2010; Gonzales e Maisch, 2011), sem causar danos aos tecidos sadios (Martins *et al.*, 2011). Esta terapia usa fotossensibilizadores, exógenos ou endógenos, e a morte microbiana ocorre quando o fotossensibilizador absorve a energia da fonte luminosa. Isso o leva a produzir substâncias altamente reativas, que, por sua vez, causam danos ao microrganismo. Não há relatos sobre o desenvolvimento de resistência à PDT antimicrobiana; estudo recente demonstrou que bactérias remanescentes de sucessivas sessões de PDT não desenvolveram resistência à terapia (Tavares *et al.*, 2010).

O Azul de Metileno é uma substância conhecida há muito tempo pela sua baixa toxicidade, com grande utilização e aceitação na área médica e odontológica. Pelo seu potencial fotoativo ele é um corante ideal para destruição de fungos (Teichert *et al.*, 2002). Ele é considerado uma boa opção de fotossensibilizador para terapia fotodinâmica contra fungos, com baixa toxicidade e ausência de efeitos colaterais. Sua absorção ocorre entre 500 e 700 nm, com pico em aproximadamente 660 nm (Tardivo *et al.* 2005). A fotoativação do azul de metileno com radiação laser em 685 nm apresentou efeito fungicida sobre diversas espécies do gênero *Candida*, comuns na cavidade bucal (Souza *et al.* 2006).

Embora a literatura evidencie que a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno é efetiva contra *Candida* spp., todos os relatos experimentais foram conduzidos *in vitro* ou em modelos animais. Até o presente momento não

há relato sobre experimentos clínicos com PDT para tratamento da estomatite protética.

Frente ao exposto, é de peculiar interesse o estudo da terapia fotodinâmica antimicrobiana para o tratamento da estomatite protética e avaliação de um protocolo adequado, pois a PDT é potencialmente uma terapia efetiva de tratamento, de forma localizada, sem efeitos sistêmicos e com possibilidade de ação mesmo em linhagens de microrganismos com resistência aos antifúngicos.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar o tratamento da estomatite protética realizado por meio do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada pelo azul de metileno.

2.2 - Objetivos específicos:

Para atingir o objetivo geral acima descrito, o trabalho desenvolvido teve os seguintes objetivos específicos:

Desenvolver uma metodologia para o crescimento de biofilme e teste de terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) em protótipos simuladores de próteses totais.

Avaliar *in vitro* a efetividade antifúngica da PDT em protótipos de metil metacrilato previamente contaminados com linhagens conhecidas do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*).

Avaliar a efetividade da terapia convencional no tratamento de indivíduos com diagnóstico de estomatite protética.

Avaliar a efetividade da PDT no tratamento de indivíduos com diagnóstico de estomatite protética.

Comparar a efetividade da PDT com a efetividade da terapia convencional para tratamento da estomatite protética.

3- REFERENCIAL TEÓRICO

A estomatite protética possui caráter multifatorial; portanto, diversos fatores devem ser considerados para a sua compreensão e para o entendimento de seu tratamento por meio da PDT. Na abordagem teórica deste capítulo, é feita uma divisão em quatro tópicos, descritos a seguir.

3.1 – A Estomatite Protética

Próteses removíveis totais ou parciais superiores recobrem total ou parcialmente a área da mucosa correspondente ao palato duro e dificultam o contato da mucosa com a saliva, a qual contém os principais componentes de defesa antimicrobiana da boca. Tal fato, que também pode ser ocasionado pelo uso de aparelhos ortodônticos removíveis (Webb *et al.*, 1998), facilita a ocorrência da candidíase atrófica crônica (estomatite protética). Diferentemente das demais candidíases, a estomatite protética não mostra a formação de placas e em suas biópsias raramente são encontradas hifas de *Candida* spp. penetrando ativamente na camada ceratinizada do epitélio palatino. Porém, a proliferação de *C. albicans* está associada ao processo inflamatório (Neville *et al.*, 2004; Cawson *et al.*, 1997).

A estomatite protética geralmente é classificada de acordo com a aparência clínica da mucosa inflamada. A classificação mais utilizada é aquela proposta por Newton (1962), a qual compreende três tipos clínicos:

- Hiperêmica puntiforme - (tipo I): Caracteriza-se pela presença de áreas puntiformes de inflamação, dispersas pela mucosa normal e limitadas aos ductos das glândulas salivares palatinas menores.
- Hiperêmica difusa - (tipo II): A inflamação é generalizada, a mucosa apresenta-se lisa e atrófica, abrangendo toda a região recoberta pela prótese.
- Hiperêmica granular - (tipo III): É caracterizada por uma mucosa hiperêmica, com aparência nodular, a qual pode estar presente em toda a região recoberta

pela prótese, porém, mais comumente restrita à região central do palato, sendo, particularmente, encontrada em áreas sob câmaras de sucção nas próteses totais.

Entre os principais fatores etiológicos associados à EP, estão a infecção por *Candida* spp., a higienização deficiente da prótese e o seu uso contínuo e consequente não remoção para dormir (Gendreau e Loewy, 2011). Além destes, outros fatores também têm sido relacionados à EP, como o tabagismo (Barbeau *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2010), a baixa qualidade do material de base da dentadura, a presença de trauma oclusal (Emami *et al.*, 2008), a idade da prótese (Figueiral *et al.*, 2007) e a ocorrência de imunossupressão (Golecka *et al.*, 2006). Apesar de todos estes fatores, a infecção por *Candida* spp. permanece como o principal fator etiológico (Barbeau *et al.*, 200; Gendreau e Lowey, 2011).

3.2- O biofilme e o envolvimento de *Candida* spp.

A maior parte dos microrganismos que colonizam e infectam a boca não se encontram de forma isolada. Em geral, exibem-se organizados em comunidades de múltiplas espécies, envolvidas por material exopolimérico e aderidos a superfícies bióticas ou abióticas. Assim, originam o biofilme, um ecossistema estruturado, altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada (Costerton *et al.*, 1995; Seneviratne *et al.*, 2008).

Candida spp. são fungos leveduriformes, vários deles pertencentes à microbiota do organismo humano. Habitam mucosas da orofaringe e do trato gastrintestinal, podendo causar infecções, normalmente endógenas. (Fitzpatrick, 1997). *Candida albicans* é espécie de levedura mais frequentemente isolada na cavidade bucal, mas outras espécies têm sido isoladas e relacionadas à estomatite protética (Ramage *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de um biofilme apresenta diversos estágios, envolvendo fatores físicos, biológicos e ambientais para o seu estabelecimento. Inicialmente é necessário que ocorra a adesão dos microrganismos a uma superfície adequada. Após a adesão, os microrganismos passam por fase de

colonização e proliferação, até atingir um estágio maduro e passar pela fase de dispersão (Jenkinson e Lappin-Scott, 2001).

Por suas características irregulares e hidrofílicas, o material usado para confecção das próteses favorece a etapa inicial de adesão do microrganismo. Ramage *et al.* (2004) avaliaram o biofilme presente em próteses totais de indivíduos com EP. Para tanto, submeteram fragmentos destas próteses a exame de microscopia eletrônica de varredura. Com tal metodologia, encontraram uma intrincada rede de hifas e leveduras profundamente embutidas nas imperfeições, fendas e irregularidades da superfície dos fragmentos. Palekar e Srivastava (2011), relataram ter encontrado *C. albicans* infiltrada em resina acrílica até uma profundidade de 3 milímetros.

Apesar de *C. albicans* ser a espécie relacionada à EP de maior prevalência, outras espécies do mesmo gênero também são relatadas, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. pulcherrima*, *C. sake* e *C. pseudotropicalis* (Zomorodian *et al.*, 2011; Dagistan *et al.*, 2011; Marcos - Arias *et al.*, 2009; Gasparoto *et al.*, 2009; Figueiral *et al.*, 2007).

3.3- O tratamento convencional e as terapias já propostas

Devido à sua etiologia multifatorial, o tratamento padrão para a EP envolve procedimentos diversos, que incluem o uso de um agente antifúngico local ou sistêmico, a cuidadosa e diária higienização da prótese e a sua remoção por pelo menos 8 horas por dia, ou para dormir (Salerno *et al.*, 2011). Apesar de este ser o tratamento padrão, diversos tipos de tratamento ou de higienização da prótese têm sido propostos para controle da EP.

O uso do Fluconazol no tratamento da EP foi avaliado por Budtz Jorgensen *et al.* (1988). Para isso, 38 indivíduos foram divididos em dois grupos. Dezenove indivíduos receberam tratamento sistêmico à base de fluconazol e outros 19 indivíduos receberam tratamento placebo. O tratamento sistêmico foi capaz de reduzir a contagem fúngica e melhorar a inflamação da mucosa palatina, ao contrário do placebo. No entanto, os autores consideraram que, para obter a cura e a estabilidade de resultados em longo prazo, a meticulosa

higienização da prótese e da mucosa deve ser realizada durante o tratamento e também após o mesmo.

Konsberg *et al.* (1994) propuseram e testaram o uso de um verniz à base de Miconazol para aplicação na prótese e eliminação de *Candida* spp. Dezoito indivíduos tiveram a prótese tratada com o verniz e outros dezoito tiveram a prótese tratada com placebo. Quatorze dias após a aplicação do verniz, encontraram uma redução do número de colônias de *Candida* spp. nas culturas advindas do palato e da prótese. Concluíram que a metodologia proposta poderia ser vantajosa em relação ao uso da terapia convencional.

Kulak *et al.* (1994) avaliaram três tipos de tratamento para EP. Três grupos de 15 indivíduos foram formados. O primeiro grupo recebeu tratamento à base de Fluconazol em comprimidos. O segundo grupo recebeu a mesma medicação e foi orientado a higienizar a prótese duas vezes ao dia com uma solução antimicrobiana à base de Clorexidina. O terceiro grupo teve como tratamento somente a confecção de novas e bem delineadas próteses. A associação de Fluconazol e Clorexidina foi mais eficiente em tratar a EP do que o uso isolado do Fluconazol. A simples substituição da prótese não foi eficiente para tratar a EP e não reduziu a contagem de leveduras.

Barnabé *et al.* (2004) testaram o uso do sabão de coco para lavar as próteses, associado ou não à imersão diária das próteses em solução de hipoclorito de sódio a 0,05%, com a finalidade de desinfecção das mesmas e controle da EP. Indivíduos sadios e portadores de EP participaram do estudo e a terapia foi avaliada de acordo com a melhora do aspecto clínico da mucosa e a redução da contagem de *C. albicans* e *Streptococcus mutans* nas próteses. As duas técnicas promoveram melhora no aspecto clínico da mucosa, porém, o uso do sabão de coco para higienização das próteses associado à imersão em solução de hipoclorito de sódio reduziu com maior eficiência a contagem microbiana.

Koray *et al.* (2005) testaram o uso do Fluconazol em cápsulas, da hexetidine em colutório, ou de ambos associados para o tratamento da EP. Três grupos com, respectivamente 21, 18 e 22 indivíduos foram formados. Além da medicação, os indivíduos receberam orientação e recomendação de cuidadosa higienização das próteses durante o tratamento. A contagem de *C. albicans* na

saliva, na prótese e na mucosa inflamada foi realizada antes e depois do tratamento. Todos os três tipos de tratamento tiveram resultado similar na diminuição da contagem de *C. albicans*.

Amanlou *et al.* (2006) avaliaram o uso de do Miconazol e de um gel à base de uma planta medicinal nativa do Irã, denominada *Zataria multiflora*, para o tratamento da EP. Foram organizados dois grupos, um para cada tipo de tratamento, com 12 indivíduos em cada grupo. Foram avaliados o grau de eritema no palato e a quantidade de colônias de leveduras oriundas da prótese. Tanto o gel à base de Miconazol quanto o gel à base de *Z. multiflora* reduziram o grau de eritema do palato e a contagem de colônias oriundas da prótese, mas o antifúngico convencional reduziu mais a contagem de leveduras recuperadas da prótese.

Pinto *et al.* (2008) propuseram o uso do vinagre como agente para controle de *Candida* spp. em usuários de prótese total. Para tanto, 55 indivíduos usuários de prótese total superior foram instruídos a remover a prótese durante a noite por um período de pelo menos 8 horas, a escovar a dentadura três vezes ao dia por pelo menos 1 minuto e, também, a deixar a prótese imersa durante a noite em uma solução de vinagre a 10%. Estes procedimentos foram executados por 45 dias. Antes deste período e também depois, amostras de saliva foram coletadas e a presença de *Candida* spp. avaliada. Analisando os resultados, concluíram que a imersão da prótese durante a noite em uma solução de vinagre a 10% diminuiu a presença de *Candida* spp. na saliva dos indivíduos, bem como diminuiu a ocorrência de EP na população estudada.

Li *et al.* (2010) avaliaram a efetividade de um produto comercial (Polident[®]) para higienização de próteses. Para tanto, cresceram biofilmes de *C. albicans*, *S. mutans* e também um biofilme misto das duas espécies usando como substrato materiais de uso cotidiano na odontologia (acrílico de próteses totais, porcelana, hidroxiapatita e poliestireno). Com a metodologia utilizada conseguiram reduzir a contagem de colônias no tratamento de biofilmes em acrílico em aproximadamente 3 a 4 ordens de grandeza e sugeriram que o produto pode ser um bom auxiliar no tratamento da EP.

Uludamar *et al.* (2011) testaram três formas para tratamento da EP. Três grupos foram formados. O primeiro recebeu como tratamento o uso de um

condicionador de tecidos comercial, denominado Visco-gel, para reembasamento da prótese. O segundo grupo recebeu o tratamento que consistia em usar um enxaguatório bucal denominado Dioxident, cujo princípio ativo é o dióxido de cloro, durante 1 minuto, duas vezes por dia. A prótese deveria passar a noite imersa neste produto. O terceiro grupo recebeu tratamento similar ao do segundo grupo, porém o enxaguatório bucal tinha como princípio ativo o gluconato de clorexidina a 0,2%. Os resultados foram avaliados clinicamente e também por meio de contagem de colônias de *C. albicans*. O reembasamento da prótese (grupo 1) não promoveu redução de *C. albicans*, mas diminuiu o grau de inflamação do palato. Os outros dois produtos foram efetivos, de forma estatisticamente significativa, em reduzir a contagem de *C. albicans* e em melhorar o grau de inflamação do palato.

Nenhum dos tratamentos propostos, descritos anteriormente, se situou como terapia de eleição. O tratamento padrão estabelecido ainda passa pelo uso dos antifúngicos convencionais, tópicos ou sistêmicos.

3.4 – A Terapia Fotodinâmica e o azul de metileno

O azul de metileno é um fotosensibilizador pertencente à classe das fenotiazinas que tem desempenhado importante papel na microbiologia, farmacologia e como corante histológico por muitos anos. É considerado uma boa opção de fotossensibilizador para terapia fotodinâmica, tanto de tumores, quanto de infecções por vírus e fungos, com baixa toxicidade e ausência de efeitos colaterais. Sua absorção ocorre entre 500 e 700 nm, com pico em aproximadamente 660 nm. (Tardivo *et al.*, 2005)

Teichert *et al.* (2002) relataram um ensaio no qual usaram a PDT, mediada por azul de metileno para tratar a candidíase bucal em camundongos imunossuprimidos. Uma linhagem de *Candida albicans* resistente aos azóis, fungicidas usuais para o controle desta espécie, foi selecionada para ser usada nos experimentos. Setenta e cinco camundongos imunossuprimidos foram inoculados 3 vezes por semana na cavidade bucal, por 4 semanas, com a linhagem do fungo resistente. Os resultados do estudo indicaram que a PDT

mediada por azul de metileno é uma potencial alternativa às tradicionais terapias com base em formulações antifúngicas para o tratamento da candidíase bucal.

Souza *et al* (2006) avaliaram os efeitos da irradiação com um laser (35 mW de potência, comprimento de onda 685 nm, densidade de energia de 28 J/cm², tempo de irradiação de 300 segundos) associado ao azul de metileno (100 µg/mL), na viabilidade de linhagens de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Nos parâmetros estudados, os autores conseguiram uma redução no número de unidades formadoras de colônia que variou de 82,3 a 91,6% e concluíram que a fotoativação do azul de metileno apresentou efeito fungicida em todas as espécies de *Candida* estudadas.

Suzuki *et al.* (2010) utilizaram discos de silicone elastomérico para servir de substrato para crescimento de biofilme de *C. albicans*. O biofilme formado foi corado por 10 minutos com uma solução de azul de metileno na concentração de 1mM e posteriormente irradiado por 3, 6, 9 e 12 minutos com um equipamento LED de 260 mW de potência e comprimento de onda de 630 nm. Com a metodologia utilizada demonstraram que após 6 minutos de irradiação, mesmo em biofilme, *C. albicans* foi completamente eliminada.

Ribeiro *et al.* (2011) estudaram a PDT, utilizando como fotossensibilizador o Photogem[®], para esterilizar próteses totais de indivíduos com mucosa palatina sadia. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos que receberam a PDT, variando a concentração (50 mg/L ou 100 mg/L) e a apresentação (solução ou gel) do fotossensibilizador. Para avaliar a efetividade das técnicas, foi feita a contagem dos microrganismos, presentes antes e depois da terapia. Todos os quatro grupos estudados obtiveram redução de pelo menos 90% da contagem de microrganismos presentes na prótese.

Pereira *et al.* (2011) avaliaram os efeitos da PDT em biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* cultivados isoladamente ou em conjunto. O biofilme foi crescido em discos de acrílico pré-fabricados e irradiado por 98 segundos com um laser com comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW. O fotossensibilizador utilizado foi o azul de metileno na concentração de 0,1 mg/mL. Todos os microrganismos foram sensíveis à PDT quando crescidos sozinhos ou em associação. *Candida albicans* foi o microrganismo menos sensível.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada abrangeu ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos. A seguir é apresentada uma descrição detalhada dos procedimentos realizados.

4.1- Ensaio pré-clínicos

4.1.1- As espécies e linhagens de *Candida* spp. utilizadas

Sete espécies do gênero *Candida* foram testadas. Os microrganismos foram fornecidos pelo Laboratório de Materiais de Referências do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. As linhagens testadas foram correspondentes às seguintes: *C. albicans*, (*American Type Culture Collection* - ATCC 10231) *C. dubliniensis* (ATCC MYA-646), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. guilliermondii* (ATCC 6260), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. tropicalis* (ATCC 28707).

Candida albicans, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis* foram selecionadas por estarem entre as espécies mais prevalentes nos casos de EP em vários estudos (Figueiral *et al.*, 2007; Dagistan *et al.*, 2008; Coco *et al.*, 2008). A espécie *C. dubliniensis*, foi escolhida pelo fato de ter características fenotípicas muito próximas às de *C. albicans*, poder estar associada à EP, desenvolver resistência ao Fluconazol com mais facilidade que *C. albicans* (Paugam *et al.*, 2007; Marcos-Arias *et al.*, 2009) e pelos relatos de seu envolvimento na EP estarem aumentando (Zomorodian *et al.*, 2011; Meurman *et al.*, 2010; Gasparoto *et al.*, 2009).

4.1.2- A confecção dos protótipos

Para servir de base para o crescimento do biofilme, 40 protótipos hexagonais, com lados medindo 3 mm, altura de 2 mm e massa uniformizada entre 74 e 78 microgramas (FIG. 1) foram confeccionados e processados de acordo com a metodologia proposta por Arita *et al.* (2005). Foi empregado o mesmo material padrão utilizado para a confecção de próteses totais (polímero de metil metacrilato) e sob as mesmas condições de processamento e cura térmica. Depois de prontos, eles foram imersos em água, submetidos a banho em cuba ultrassônica por 60 minutos e em seguida deixados por um dia imersos em água para remoção do monômero residual. Após esta etapa, eles foram secos e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. A condição estéril inicial deste processo foi verificada e confirmada pela inoculação de amostras dos protótipos de polímero de metil metacrilato em placas de Petri, contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas por 24 a 48 horas a uma temperatura de 37°C para confirmar a ausência de crescimento de microrganismos e a condição estéril.

FIGURA 1: Protótipo utilizado para servir de base para o crescimento do biofilme

4.1.3- A formação do biofilme

Os protótipos esterilizados foram utilizados para a formação do biofilme do microrganismo em questão e para testar a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno. Para tanto, eles foram inseridos em 50 mL de meio líquido *Yeast Extract-Peptone-Dextrose* (YEPD) e contaminados com as linhagens de fungos *Candida* spp. O inóculo foi executado em uma concentração inicial de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, padronizada pela escala de MacFarland. Os protótipos com os microrganismos foram incubados a 37°C por 72 horas em uma incubadora orbital *shaker*, sob aeração, com 90 rotações por minuto. Na metade do tempo (36 horas), o sobrenadante foi removido e substituído por nova quantidade de meio YEPD, para assegurar que tivesse havido pelo menos dois ciclos de crescimento do microrganismo neste ambiente (Glass *et al.*, 2004). Ao final deste processo, em condições assépticas, os protótipos foram separados do meio de cultura. O excesso de meio foi retirado e a seguir os mesmos foram transferidos para placas de Petri estéreis, enquanto aguardavam ser levados para microplacas de 96 poços para irradiação.

Para confirmar o crescimento do biofilme, amostras dos protótipos foram submetidas à microscopia óptica com aumento de 400 vezes e também ao exame de tomografia por coerência óptica – OCT (Suzuki *et al.*, 2010). A OCT foi realizada no laboratório de OCT do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN.

4.1.4- A realização da PDT nos protótipos

Para a realização da PDT (grupo 4, tabela 1), os protótipos submetidos aos procedimentos anteriormente descritos permaneceram durante o tempo de pré-irradiação de 10 minutos nos poços das microplacas. Durante este tempo, eles ficaram imersos em uma solução de azul de metileno (Merck®), na concentração de 450µg/mL (Teichert *et al.*, 2002). Em seguida, foram irradiados com o laser pelo tempo de 80 segundos, com potência de 100 mW, em modo contínuo, de forma pontual, com a abertura da ponteira laser situada 2 mm acima do micropoço. A irradiação ocorreu no escuro e em câmara de fluxo laminar.

O equipamento laser utilizado foi o modelo Photon Lase III (DMC Equipamentos Ltda., São Carlos - SP). Este equipamento possui meio ativo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), comprimento de onda 660 nm e potência de 100 mW. A potência foi aferida antes de cada procedimento experimental.

Para testar se somente a solução de azul de metileno na concentração de 450µg/mL teria efeito similar ao da PDT, foi criado o grupo 2. Neste grupo, os protótipos já inoculados com as linhagens de *Candida* spp. foram mantidos por um período de 10 minutos, equivalente ao da pré-irradiação, nos poços das microplacas. Durante este tempo, eles ficaram imersos na solução de azul de metileno. Em seguida, aguardou-se mais 80 segundos, equivalentes ao tempo de irradiação com o laser. No decorrer deste tempo, eles permaneceram no escuro e em câmara de fluxo laminar.

Para avaliar se a irradiação do laser sem o uso do fotossensibilizador teria ação semelhante à da PDT, foi criado o grupo 3. Neste grupo, os protótipos já inoculados com as linhagens de *Candida* spp. foram mantidos, pelo período de pré-irradiação de 10 minutos, nos poços das microplacas, imersos em solução salina. Em seguida, foram irradiados por um período de 80 segundos, com potência de 100 mW, em modo contínuo, de forma pontual, com a abertura da ponteira laser situada 2 mm acima do micropoço. A irradiação ocorreu no escuro e em câmara de fluxo laminar.

Como controle negativo e objetivando avaliar se os resultados obtidos seriam independentes da irradiação e do uso de fotossensibilizador, foi instituído o grupo 1. Neste grupo, os protótipos inoculados com as linhagens de *Candida* spp. foram mantidos pelo período de pré-irradiação de 10 minutos, nos poços das microplacas, imersos em solução salina. Em seguida, aguardou-se mais 80 segundos, equivalentes ao tempo de irradiação. No decorrer deste tempo, eles permaneceram no escuro e em câmara de fluxo laminar.

A tabela 1 resume as características e os procedimentos aos quais cada grupo foi submetido.

Tabela 1: Denominação, número de amostras, tempo de pré-irradiação, solução utilizada e submissão à irradiação para cada grupo

Grupo	Denominação	n	Tempo de pré-irradiação	Solução	Irradiação
1	L-A-	10	10 minutos	Salina	Não
2	L-A+	10	10 minutos	Azul de Metileno	80 segundos
3	L+A-	10	10 minutos	Salina	80 segundos
4	L+A+	10	10 minutos	Azul de Metileno	Não

n: número de amostras de cada grupo;

L-A-: Grupo controle (não recebeu a irradiação laser nem a solução de azul de metileno);

L-A+: Grupo controle (não recebeu a irradiação laser, mas recebeu a solução de azul de metileno);

L+A-: Grupo controle (recebeu a irradiação laser, mas não a solução de azul de metileno);

L+A+: Grupo teste (recebeu a PDT: irradiação laser e solução de azul de metileno).

Após cada um destes testes, os protótipos foram imersos em 500 microlitros de solução salina, submetidos à agitação mecânica por 60 segundos em um vórtex e, em seguida, foram submetidos à diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-5} vezes a concentração original. Posteriormente, alíquotas de 10 μ L de cada diluição foram semeadas em forma de estria, de acordo com a metodologia de Jett *et al.* (1997) em duplicata, em placas de petri com ágar Sabouraud dextrose. Estas amostras foram incubadas a 37°C por 36 horas, para posterior contagem das unidades formadoras de colônia.

4.2- Ensaios clínicos

Para avaliar os efeitos da PDT e da terapia convencional nos indivíduos com estomatite protética, bem como realizar a comparação entre as duas técnicas, foi delineado um estudo clínico, do tipo experimental, analítico, randomizado e cego, descrito a seguir.

4.2.1- Considerações Éticas

Os indivíduos convidados a participar desta pesquisa foram esclarecidos sobre os possíveis riscos e benefícios dos procedimentos a serem realizados e leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com a resolução 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisas

envolvendo seres humanos (anexo 1). O projeto desta pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins e aprovado sob número 90/2007 (anexo 2).

4.2.2- Seleção de indivíduos

Foram selecionados indivíduos com idade entre 40 e 65 anos, usuários de próteses totais removíveis (PT) superiores, com diagnóstico clínico de estomatite protética, dentre aqueles que buscaram tratamento para substituição de suas PT nas disciplinas de Prótese Total ou de Semiologia da Faculdade de Odontologia do Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos – ITPAC, em Araguaína, TO.

Os critérios de exclusão adotados foram: não detecção de *Candida* spp. na cultura advinda da prótese do indivíduo, relato ou diagnóstico de diabetes, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e neoplasias, ocorrência de gravidez, relato de uso de antimicrobianos nos últimos dois meses, adoecimento durante o tratamento e falta em mais de uma sessão clínica no período da terapia.

4.2.3- Procedimentos iniciais

Na primeira sessão de atendimento clínico, todos os indivíduos envolvidos foram submetidos à anamnese e aos exames clínicos de rotina. Em seguida, tiveram a estomatite protética classificada de acordo com a proposta de Newton (1962), ilustrada nas figuras 1, 2, 3 e 4.

FIGURA 1: Mucosa palatina com aspecto saudável.

FIGURA 2: Mucosa palatina apresentando inflamação em áreas puntiformes dispersas pela mucosa normal, compatível com grau I de Newton.

FIGURA 3: Mucosa palatina apresentando inflamação generalizada na área recoberta pela prótese, compatível com grau II de Newton.

FIGURA 4: Mucosa palatina hiperêmica apresentando aparência nodular, compatível com grau III de Newton.

O diagnóstico laboratorial se deu pela cultura microbiológica de material obtido da mucosa palatina e da prótese do indivíduo, como descrito a seguir.

Para a detecção da presença de *Candida* spp. nas mucosas, foi realizada a coleta de amostras utilizando-se um swab estéril. A amostra foi semeada por espalhamento na superfície do meio CHROMagar Candida® em placas de Petri, que foram incubadas a 37°C por 24 horas. O número de UFC/mL

foi avaliado. Este procedimento foi executado no início e no final do tratamento para todos os indivíduos.

Para a detecção da presença de *Candida* spp. nas próteses, as mesmas foram inseridas com a parte ventral voltada para o fundo de placas de Petri estéreis contendo o meio CHROMagar Candida[®], na temperatura de 55°C. Após a solidificação do meio, a prótese foi removida e a placa de Petri, com a réplica da prótese formada em ágar, foi incubada a 37°C, até o momento contagem do número de colônias formadas e identificação das espécies.

Para a identificação das espécies, os aspectos de coloração, morfologia e textura do cultivo primário no meio CHROMagar Candida[®] foram avaliados. Adicionalmente também se realizou a coloração de Gram. Nas amostras das colônias que cresceram com coloração esverdeada, foi também realizada a prova de crescimento diferencial a 42°C, para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

4.2.4- A PDT e a terapia convencional

Para avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica em reduzir ou eliminar a população de *Candida* spp. na mucosa palatina e nas próteses, bem como comparar a sua efetividade com a efetividade da técnica convencional de tratamento, com base no uso do Miconazol, após os procedimentos da consulta inicial, os indivíduos foram divididos em dois grupos e submetidos aos procedimentos descritos a seguir:

Grupo 1 - Os indivíduos com estomatite protética tiveram a mucosa palatina corada durante dez minutos com a solução de azul de metileno em uma concentração de 450 µg/mL. A seguir, a mucosa foi irradiada com os seguintes parâmetros: comprimento de onda 660nm, potência de 100 mW, modo contínuo, aplicação por varredura, densidade de energia de 28J/cm² e tempo de aplicação variando de acordo com a área da mucosa palatina irradiada. A aplicação foi feita durante quatro semanas, duas vezes por semana, com intervalo entre as sessões de pelo menos 48 horas.

A concentração utilizada do fotossensibilizador foi determinada após análises dos resultados dos estudos com os protótipos e com base nos estudos

pilotos. A concentração escolhida foi a que possibilitou o melhor equilíbrio entre redução microbiana e resposta da mucosa palatina na redução de sinais clínicos.

Em cada uma dessas sessões, simultaneamente à irradiação da mucosa palatina, também as próteses de cada indivíduo foram submetidas à PDT. Inicialmente elas foram lavadas em água purificada (sistema Milli-Q® – Millipore) e escurridas, para, em seguida, terem sua parte ventral corada com o fotossensibilizador por dez minutos. Após este procedimento, as próteses foram irradiadas com os mesmos parâmetros descritos para a mucosa (comprimento de onda 660nm, potência de 100 mW, modo contínuo, aplicação por varredura, densidade de energia de 28J/cm² e tempo de aplicação variando de acordo com a área da prótese).

Grupo 2 – Os indivíduos foram orientados a realizar o tratamento convencional à base do antifúngico Miconazol em gel oral, que consiste na aplicação do medicamento na superfície interna da prótese total limpa e seca e em toda a superfície palatina recoberta pela prótese previamente seca com gaze, três vezes ao dia, por um período de quatro semanas. O antifúngico foi fornecido livremente aos indivíduos.

Quarenta e oito horas após a última sessão de PDT e do encerramento do uso do antifúngico, os indivíduos foram submetidos aos mesmos procedimentos iniciais para detecção de colônias de *Candida* spp. na mucosa e na prótese total (descrito no item 4.2.4).

Objetivando quantificar a resposta clínica da mucosa dos indivíduos frente aos diferentes tratamentos propostos, o grau de eritema foi classificado de acordo com o índice proposto por Budtz-Jorgensen *et al.* (1988), que compreende quatro níveis: 0- sem inflamação, 1- inflamação leve, 2- inflamação moderada e 3- inflamação severa. Esta classificação foi feita antes do início do tratamento e 48 horas após o final do tratamento para os dois grupos.

A avaliação da resposta microbiológica foi feita pelo método proposto por Olsen (1974). As unidades formadoras de colônias recuperadas, tanto da mucosa, quanto da prótese de cada indivíduo, foram contadas e o resultado foi expresso em graus de densidade: grau 0 - ausência de crescimento; grau 1 - crescimento de 1 a 9 UFC; grau 2 - crescimento de 10 a 24 UFC; grau 3 -

crescimento de 25 a 100 UFC; grau 4 - crescimento maior que 100 UFC; grau 5 - crescimento confluyente.

4.2.5- Laser utilizado

Foi utilizado o laser da marca DMC, modelo Photon Lase III, que apresenta as seguintes características: meio ativo Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) e comprimento de onda 660 nm. A potência utilizada foi de 100 mW, previamente aferida antes de cada procedimento experimental.

4.2.6- Documentação fotográfica

As fotografias foram tomadas na sessão inicial, final e sempre que houvesse mudança significativa do quadro clínico. Foram obtidas usando o mesmo equipamento fotográfico, a mesma calibração e padronizando-se as condições de luminosidade do ambiente. O equipamento utilizado foi uma câmera digital Canon EOS Digital Rebel XTi equipada com lente Canon EF Autofoco 60mm f/2.8 USM Macro e flash circular Canon MR-14EX TTL.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados seguindo a ordem utilizada no capítulo 4, materiais e métodos e são discutidos à medida que forem apresentados.

5.1- Ensaio pré-clínicos

5.1.1- Formação do biofilme

O biofilme produzido é mostrado na imagem gerada pelo exame de tomografia por coerência óptica - OCT (FIG. 5). Tal exame permite a análise em profundidade de uma estrutura, sem ser invasivo e com necessidades mínimas de manipulação e processamento (Huang *et al.*, 1991), além de ser adequado para uso em biofilme produzido por *Candida albicans* (Suzuki *et al.*, 2010) e de não necessitar de processamento para desidratação, como na microscopia eletrônica de varredura. A desidratação faz com que a maior parte da matriz exopolimérica do biofilme seja perdida (Ramage *et al.*, 2005).

A certificação do crescimento do biofilme é necessária, pois a capacidade de formá-lo é a principal característica que faz com que *Candida* spp. possam causar doenças na boca e em outros sítios (Seneviratne *et al.*, 2008). Além disso, a sua ocorrência é um fator importante que contribui para a diminuição do efeito de antifúngicos convencionais (Ramage *et al.*, 2004). Quando crescida em biofilmes, a concentração fungicida mínima pode ser de 30 a 2000 vezes maior do que quando crescida de forma planctônica (Douglas, 2003; Hawser e Douglas, 1995; Seneviratne *et al.*, 2008).

FIGURA 5: Imagem gerada por OCT de protótipo com crescimento de biofilme de *C. albicans*. A seta isolada ao alto mostra a superfície líquida do meio de cultura, que se mostra curvada em toda a extensão da imagem. O quadrado engloba agregado celular com os canais de água sobre a matriz exopolimérica. As setas vermelhas agrupadas indicam a matriz exopolimérica crescida sobre a superfície irregular do protótipo de polímero de metil metacrilato. Os círculos envolvem colônias internas crescidas nas porosidades do protótipo.

A seta isolada ao alto da figura 5 mostra a superfície líquida do meio de cultura, que se mostra curvada em toda a extensão da imagem, devido à tensão superficial da água. O quadrado engloba agregado celular com os canais de água sobre a matriz exopolimérica. As setas vermelhas agrupadas indicam a matriz exopolimérica crescida sobre a superfície irregular do protótipo de metil metacrilato. De uma maneira geral, esta matriz age como uma barreira que dificulta o acesso dos antimicrobianos aos microrganismos no biofilme, contribuindo para aumentar sua resistência (Seneviratne *et al.*, 2008).

Para servir de substrato para o crescimento biofilme, vários materiais já foram utilizados, tais como discos de silicone elastomérico de catéteres (Suzuki *et al.*, 2010), discos de resina acrílica pré-fabricados (Pereira *et al.*, 2011), discos de fibra de celulose (Baillie e Douglas, 1999) e mesmo em microplacas de 96 poços de poliestireno (Jin *et al.*, 2004; Ramage *et al.*, 2004). No entanto, foi feita a opção pela utilização do polímero de metil metacrilato, o qual é o material padrão para a confecção de próteses totais. Optou-se também pelo processamento da maneira convencional, por meio de cura térmica, a fim de reproduzir, o máximo possível, as condições reais de uma prótese na boca, quando da formação do biofilme.

Macroscopicamente, a superfície dos protótipos é lisa e polida; porém, microscopicamente tal fato não se repete, nem mesmo em uma prótese real. Os círculos na figura 5 envolvem colônias internas crescidas nas porosidades do protótipo. Tais porosidades são inerentes à técnica utilizada para confecção dos protótipos, que é a mesma técnica utilizada para a confecção das próteses totais para pacientes. Estas porosidades, superficiais e internas, podem abrigar colônias de microrganismos (Ramage *et al.*, 2004), que dificultam sua remoção mecânica ou sua limpeza, mesmo com o uso de soluções químicas (Bollen, Lambrechts e Quirynen, 1997; Quirynen *et al.*, 1990; Radford, Challacombe e Walter, 1999).

O crescimento de tais colônias internas contribui para embasar a hipótese de que as porosidades do material utilizado como base para confecção das próteses seriam um dos fatores que contribuem para recidivas frequentes da estomatite protética, pois dificultariam a terapia antifúngica.

5.1.2- Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana nos biofilmes

As irregularidades superficiais das próteses favorecem a adesão dos microrganismos, condição necessária para o início do desenvolvimento do biofilme. O crescimento em forma de biofilme é um fator de virulência do fungo, pois sua formação dificulta a penetração de agentes antimicrobianos. Bactérias podem ter sua resistência a agentes antimicrobianos até mil vezes maior quando crescidas em biofilme e em comparação ao crescimento em forma planctônica (Davies, 2003).

O fato de termos usado o mesmo material utilizado para a confecção das próteses (polímero de metil metacrilato), processado sob cura térmica, para a confecção dos protótipos deve ser ressaltado. *Candida* spp. têm afinidade pelo polímero, favorecendo a fixação do fungo, o início da formação do biofilme e o estabelecimento da EP (Samaranayake *et al.*, 1980). Apesar do processo de cura térmica ser o procedimento padrão para a confecção das próteses, a cura química, sem envolvimento de calor, também pode ser utilizada. O processamento térmico de cura do polímero desfavorece a adesão de *Candida* spp. (He *et al.*, 2006), mas seu uso torna o experimento mais próximo da realidade das próteses utilizadas pelos pacientes.

A figura 6 mostra a média e o desvio padrão da contagem do número de UFC de *C. albicans* recuperadas após cada um dos procedimentos pelo qual passaram os quatro grupos. Pela sua análise, percebe-se uma pequena diminuição da contagem das UFC para o grupo L-A+ (somente azul de metileno), enquanto que para o grupo L+A- (somente laser) a contagem de UFC é praticamente a mesma do grupo L-A- (nem azul de metileno, nem laser). Já o grupo L+A+ (laser e azul de metileno - PDT) mostrou uma acentuada diminuição da contagem das UFC, quando comparado aos demais grupos.

FIGURA 6: Média e desvio padrão do número de UFC recuperadas para cada grupo de biofilme de *C. albicans* testado.

Para verificar se havia diferença estatística entre as contagens dos diferentes grupos, os dados foram lançados no software BioEstat 5.0 e submetidos inicialmente ao teste de Kruskal-Wallis. Ao se confirmar que havia diferença entre os grupos, foi executado o teste de Student-Newman-Keuls nos pares de grupos, para localizar as diferenças. Foram considerados diferentes entre si os grupos que apresentaram *p*-valor menor que 0,05.

Pela análise estatística citada, o grupo tratado com a PDT (L+A+) reduziu a contagem de UFC recuperadas e foi diferente de todos os demais grupos. Já estes, não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si (TAB. 2), corroborando estudos anteriores. Pereira *et al.*, 2011, promoveram o crescimento de biofilme de *C. albicans* em discos de resina acrílica e alcançaram uma redução média de 2,32 log₁₀. Suzuki (2009) cresceu biofilmes de *C. albicans*

em discos de silicone elastomérico (um material originalmente não poroso) e conseguiu até 100% de eliminação de colônias. Por outro lado, Dovigo *et al.* (2009) testaram a PDT mediada por Photogem[®] e obtiveram também redução da contagem de colônias em biofilmes de *C. albicans*; porém, tal redução não passou da ordem de 0,34 log₁₀.

No presente estudo, a diminuição média de UFC recuperadas foi de 2,88 log₁₀, demonstrando excelente desempenho na redução de colônias de *C. albicans* crescidas em biofilme.

Tabela 2: *p*-valor do teste de Student-Newman-Keuls para os grupos testados aos pares – linhagem *C. albicans*

Pares de grupos	L-A-/L-A+	L-A-/L+A-	L-A-/L+A+	L-A+/L+A-	L-A+/L+A+	L+A-/L+A+
<i>p</i> -valor	0,1005	0,8458	<0,0001	0,1371	0,0054	<0,0001

Comportamento similar ao demonstrado por *C. albicans* também foi encontrado para as linhagens de *C. dubliniensis* (FIG. 7 e TAB. 3), *C. tropicalis* (FIG. 8 e TAB. 4), *C. guilliermondii* (FIG.9 e TAB. 5) e *C. parapsilosis* (FIG. 10 e TAB. 6).

FIGURA 7: Média e desvio padrão do número de UFC recuperadas para cada grupo de biofilme de *C. dubliniensis* testado.

Tabela 3: *p*-valor do teste de Student-Newman-Keuls para os grupos testados aos pares – linhagem *C. dubliniensis*

Pares de grupos	L-A-/L-A+	L-A-/L+A-	L-A-/L+A+	L-A+/L+A-	L-A+/L+A+	L+A-/L+A+
p-valor	0,00624	0,1119	<0,0001	0,7888	0,0010	0,0004

FIGURA 8: Média e desvio padrão do número de UFC recuperadas para cada grupo de biofilme de *C. tropicalis* testado.

Tabela 4: *p*-valor do teste de Student-Newman-Keuls para os grupos testados aos pares – linhagem *C. tropicalis*

Pares de grupos	L-A-/L-A+	L-A-/L+A-	L-A-/L+A+	L-A+/L+A-	L-A+/L+A+	L+A-/L+A+
p-valor	0,0065	0,6074	0,0004	0,1988	0,0001	<0,0001

FIGURA 9: Média e desvio padrão do número de UFC recuperadas para cada grupo de biofilme de *C. guilliermondii* testado.

Tabela 5: *p*-valor do teste de Student-Newman-Keuls para os grupos testados aos pares – linhagem *C. guilliermondii*

Pares de grupos	L-A-/L-A+	L-A-/L+A-	L-A-/L+A+	L-A+/L+A-	L-A+/L+A+	L+A-/L+A+
p-valor	0,1060	0,0611	<0,0001	0,8377	0,0006	0,0010

FIGURA 10: Média e desvio padrão do número de UFC recuperadas para cada grupo de biofilme de *C. parapsilosis* testado.

Tabela 6: *p*-valor do teste de Student-Newman-Keuls para os grupos testados aos pares – linhagem *C. parapsilosis*

Pares de grupos	L-A-/L-A+	L-A-/L+A-	L-A-/L+A+	L-A+/L+A-	L-A+/L+A+	L+A-/L+A+
p-valor	0,0945	0,1632	<0,0001	0,7491	0,0005	0,0001

A redução média da recuperação de UFC após a PDT nestes protótipos foi de: *C. dubliniensis* (2,79 log₁₀), *C. tropicalis* (2,48 log₁₀), *C. guilliermondii* (3,72 log₁₀) e *C. parapsilosis* (2,96 log₁₀), evidenciando o bom desempenho da PDT nos parâmetros testados. Ribeiro *et al.* (2011) testaram a PDT mediada por Photogem® em dentaduras e obtiveram também bom desempenho em reduzir a recuperação de colônias de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Não foram encontrados relatos sobre PDT em biofilmes de *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*; no entanto, trabalhando em culturas em suspensão e usando o fotossensibilizador Photogem®, Dovigo *et al.* (2009) conseguiram eliminar completamente o crescimento de *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, sendo o resultado dependente da concentração do fotossensibilizador e da densidade de energia utilizada. Outro resultado interessante deste mesmo estudo foi que a iluminação das suspensões, sem fotossensibilizador, também teve efeito estatisticamente significativo em reduzir as UFC recuperadas.

No presente trabalho, a iluminação por si só não teve tal efeito. Souza *et al.* (2006), trabalhando com espécies de *Candida* spp. em suspensão, relataram que a aplicação do laser isoladamente reduziu a contagem de UFC para *C. tropicalis*. Tal fato não foi endossado pelo presente estudo, que mostrou ligeiro aumento (estatisticamente não significante) da contagem de UFC de *C. tropicalis* quando comparado ao controle (L-A-). Ressalta-se que existem muitas diferenças entre este estudo e o de Souza *et al.* A linhagem de *C. tropicalis* (ATCC 28707 neste estudo e ATCC 13803 no outro), o modo de crescimento (em biofilme neste estudo e de forma planctônica no outro) e a concentração do

fotossensibilizador (450µg/mL neste estudo e 100µg/mL no outro). Tais diferenças podem justificar os resultados diversos encontrados.

Os dados obtidos com os testes da linhagem de *C. krusei* se apresentaram de forma um pouco diferente. O grupo tratado com a PDT (L+A+) apresentou redução da contagem média das unidades formadoras de colônia; no entanto, o grupo tratado somente com a solução de azul de metileno, também apresentou redução significativa das UFC (FIG. 11 e TAB. 7).

Apesar de haver diferença entre o grupo controle (L-A-) e o grupo tratado com a solução de azul metileno (L-A+), não ocorreu diferença estatisticamente significante entre este grupo e o grupo tratado somente com o laser (L+A-).

FIGURA 11: Média e desvio padrão do número de UFC recuperadas para cada grupo de biofilme de *C. krusei* testado.

Tabela 7: *p*-valor do teste de Student-Newman-Keuls para os grupos testados aos pares – linhagem *C. krusei*

Pares de grupos	L-A-/L-A+	L-A-/L+A-	L-A-/L+A+	L-A+/L+A-	L-A+/L+A+	L+A-/L+A+
p-valor	0,0005	0,1000	<0,0001	0,692	0,0389	0,0001

Padrão de comportamento similar também apresentou a linhagem de *C. glabrata* testada. A figura 12 mostra a média da contagem de UFC recuperadas dos testes dos grupos de *C. glabrata*. O resultado dos testes estatísticos entre os grupos (p-valor) são apresentados na tabela 8.

FIGURA 12: Média e desvio padrão do número de UFC recuperadas para cada grupo de biofilme de *C. glabrata* testado.

Tabela 8: p-valor do teste de Student-Newman-Keuls para os grupos testados aos pares – linhagem *C. glabrata*

Pares de grupos	L-A-/L-A+	L-A-/L+A-	L-A-/L+A+	L-A+/L+A-	L-A+/L+A+	L+A-/L+A+
p-valor	0,0016	0,2582	<0,0001	0,0603	0,0221	<0,0001

A PDT foi eficiente em diminuir a contagem de UFC tanto para *C. krusei*, quanto para *C. glabrata*. Tal achado torna-se mais interessante quando se observa que são duas espécies que tem apresentado crescente resistência aos antifúngicos: *C. krusei* é sabidamente resistente ao Fluconazol e *C. glabrata* tem-se mostrado, com frequência, resistente a vários azóis (Fidel *et al.*, 1999; Meurman *et al.*, 2010). Tais espécies estão muitas vezes envolvidas na estomatite protética.

Bliss *et al.* (2004) utilizando o fotossensibilizador Photofrin, relataram bom efeito na redução de *C. albicans* e *C. krusei*, mas não em *C. glabrata*. Dovigo *et al.* (2009) utilizando o fotossensibilizador Photogem[®] mostraram que *C. glabrata* foi menos susceptível à PDT que *C. albicans*, em linhagens resistentes ao Fluconazol.

O fato de a solução de azul de metileno apresentar redução de contagem de UFC para *C. krusei* e *C. glabrata*, considerando os resultados das cinco linhagens anteriores, nas quais a solução de azul de metileno não reduziu a contagem de UFC, foi peculiar. Silva *et al.* (2002) estudando maneiras de corar e evidenciar biofilmes aderidos em próteses totais encontraram ação antifúngica da solução de azul de metileno contra *C. glabrata* e *C. albicans*. No presente estudo, no grupo tratado com a PDT (L+A+) a redução de UFC de *C. glabrata* foi da ordem de 3,93 log₁₀, quando comparado com o grupo L-A+. Na mesma situação, *C. krusei* reduziu 3,51 log₁₀. Tais números são, em geral, maiores que os encontrados para as demais espécies desta pesquisa (*C. albicans*, 2,88 log₁₀; *C. dubliniensis* 2,79 log₁₀; *C. guilliermondii* 3,72 log₁₀; *C. parapsilosis* 2,96 log₁₀ e *C. tropicalis* 2,48 log₁₀) e sugerem que, de alguma forma, esta sensibilidade ao azul de metileno potencializou o efeito da PDT. Tal fato pode ser creditado à concentração da solução de azul de metileno utilizada neste trabalho, mais alta que a convencional em pesquisas de PDT com *Candida spp.* cultivadas de forma planctônica e mesmo em biofilmes. Estudos recentes sugerem que a concentração do fotossensibilizador deve ser maior quando utilizado em biofilme para que sua difusão seja favorecida no biofilme (Ribeiro *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2010).

5.2- Ensaios clínicos

5.2.1- Descrição da amostra

Foi feita avaliação clínica preliminar para diagnóstico da EP de 523 indivíduos usuários de prótese total superior ou superior e inferior. Deste total, 61 indivíduos preencheram todos os critérios preliminares de inclusão, consentiram

em participar da pesquisa e passaram por anamnese, exame clínico e culturas microbiológicas iniciais.

Entre os 61 indivíduos citados, 4 não tiveram colônias de *Candida* spp. detectadas nem na mucosa, nem na prótese, apesar de terem o diagnóstico clínico de EP e foram excluídos do estudo. Outros três indivíduos, apesar de consentirem em participar da pesquisa, não retornaram para início do tratamento. Assim, vinte e sete indivíduos foram direcionados para cada grupo da pesquisa.

No grupo submetido à PDT, 5 indivíduos abandonaram a terapia, 1 retirou o consentimento e 2 faltaram a mais de uma consulta, sendo todos estes excluídos das análises finais. Neste grupo, 18 indivíduos se submeteram à terapia proposta com assiduidade e concluíram a etapa clínica dos experimentos.

No grupo submetido à terapia antifúngica convencional, 4 indivíduos abandonaram o tratamento e 5 faltaram a mais de uma consulta, sendo todos estes excluídos das análises finais. Também neste grupo 18 indivíduos se submeteram à terapia proposta com assiduidade e concluíram a etapa clínica dos experimentos.

A figura 13 mostra o diagrama de fluxo de indivíduos, de acordo com as diretrizes para relatos de testes clínicos (*Consolidated Standards of Reporting Trials* – CONSORT), segundo Schulz *et al.* (2010).

FIGURA 13: Diagrama de fluxo de indivíduos na pesquisa. 523 indivíduos foram examinados. 462 foram excluídos por não preencherem todos os critérios de inclusão ou por não consentirem em participar da pesquisa. 61 foram eleitos para participar. Sete foram excluídos por não ter colônias de *Candida* spp. detectadas e 5 não retornaram para início de tratamento. 27 foram distribuídos aleatoriamente para cada grupo. O grupo PDT teve 5 indivíduos que abandonaram o tratamento, 1 indivíduo retirou o consentimento, 2 faltaram a mais de uma consulta e foram excluídos. Dezoito indivíduos foram analisados ao final. O grupo Terapia Convencional teve 4 indivíduos que abandonaram o tratamento e 5 que faltaram a mais de uma consulta, sendo excluídos das análises. Também 18 indivíduos foram analisados ao final.

De acordo com os critérios de inclusão, a idade poderia variar de 40 a 65 anos, evitando-se os extremos. Para o grupo submetido à PDT a idade variou entre 47 e 65 anos, com média de 58,1 anos. Já para o grupo submetido à terapia convencional as idades variaram entre 40 e 64 anos, com média de 54,7 anos. A média geral de idade da amostra foi de 56,4 anos. A tabela 9 mostra a distribuição dos indivíduos nos grupos com relação à faixa etária.

Tabela 9 – Distribuição dos indivíduos quanto a grupo e faixa etária

Faixa etária	Grupo				Total	
	Miconazol		PDT		n	%
	n	%	n	%		
40 a 45	2	5,56%	0	0%	2	5,56
46 a 50	3	8,34%	3	8,34%	6	16,68%
51 a 55	5	13,88%	2	5,56%	7	19,44%
56 a 60	5	13,88%	4	11,10%	9	25%
61 a 65	3	8,34%	9	25%	12	33,32%
Total	18	50%	18	50%	36	100%

O critério de divisão dos indivíduos em cada grupo se deu por ordem de início de tratamento. O primeiro indivíduo a iniciar o tratamento foi submetido à PDT, o segundo à terapia antifúngica convencional e alternadamente se prosseguiu. A divisão dos indivíduos, nos grupos quanto ao gênero, é mostrada na tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição dos indivíduos quanto a gênero e grupo

Grupo	Gênero				Total	
	Masculino		Feminino		n	%
	n	%	n	%		
PDT	2	5,5%	16	44,5%	18	50%
Miconazol	0	0%	18	40%	18	50%
Total	2	5,5%	34	94,5%	36	100%

Apesar de o número de indivíduos do gênero masculino (2) ter sido menor que o do gênero feminino (34), não há consenso na literatura sobre a maior prevalência no gênero feminino (Gendreau e Loewy, 2011). Kossioni, (2011) relatou prevalência maior em indivíduos do sexo masculino, enquanto Freitas *et al.* (2008) relataram não haver diferença de prevalência entre gêneros. Vários outros estudos relatam maior prevalência em mulheres (Zomorodian *et al.*, 2011; Figueiral *et al.*, 2007; Kovac-Kavcic e Skaleric, 2000, Santos *et al.*, 2010).

5.2.2- Classificação de Newton

Para classificar o grau da estomatite protética, foi utilizado o método de Newton (1962). A distribuição dos indivíduos quanto ao grau da estomatite protética e ao procedimento (grupo) é exibida na tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição dos indivíduos quanto à classificação da estomatite protética e grupo

Grupo	Classificação						Total	
	Grau I		Grau II		Grau III		n	%
	n	%	n	%	n	%		
PDT	3	8,3%	13	36,1%	2	5,5%	18	50%
Terapia convencional	3	8,3%	12	33,3%	3	8,3%	18	50%
Total	6	16,6%	25	69,4%	5	13,8%	36	100%

Percebe-se uma maior prevalência de lesões de grau II (n=25, 69,4%) e prevalências próximas para grau I (n=6, 16,6%) e para grau III (n=5, 13,8%). A prevalência das lesões de grau III está na média relatada por outros trabalhos (Barnabé *et al.*, 2004, Coco *et al.*, 2008, MacEntee, 1998, Kulak-Ozkan *et al.*, 2002, Figueiral *et al.*, 2007). A prevalência encontrada das lesões de grau I foi a menor quando comparada com a literatura pesquisada e a das lesões de grau II foi a maior quando comparada com tal literatura (Barnabé *et al.*, 2004, Coco *et al.*, 2008, MacEntee, 1998, Kulak-Ozkan *et al.*, 2002, Figueiral *et al.*, 2007). A tabela 12 resume os dados destes trabalhos.

Tabela 12 – Prevalência da EP de acordo com os graus de Newton, país da pesquisa, autor, ano, tamanho da amostra e idade média da amostra

Grau	País	Autor	Ano	n	Idade média (anos)	Prevalência (%)
Newton Tipo I	Brasil	Senna (este trabalho)	2011	36	56	16,6
	Brasil	Gasparoto <i>et al.</i>	2009	56	69	64,2
	Brasil	Pinto <i>et al.</i>	2008	34	57	50,0
	Escócia	Coco <i>et al.</i>	2008	26	73	46,2
	Brasil	Neppelenbroek <i>et al.</i>	2008	60	59 ≥ ≤64 ¹	41,6
	Portugal	Figueiral <i>et al.</i>	2007	70	>18 ²	41,4
	Brasil	Barnabé <i>et al.</i>	2004	19	60	68,4
	Turquia	Kulak-Ozkan <i>et al.</i>	2002	44	-- ³	51,6
	Canadá	MacEntee	1998	59	≥70 ⁴	64,4
Newton Tipo II	Brasil	Senna (este trabalho)	2011	36	56	69,4
	Brasil	Gasparoto <i>et al.</i>	2009	56	69	30,3
	Brasil	Pinto <i>et al.</i>	2008	34	57	41,1
	Escócia	Coco <i>et al.</i>	2008	26	73	34,6
	Brasil	Neppelenbroek <i>et al.</i>	2008	60	59 ≥ ≤64 ¹	40,0
	Portugal	Figueiral <i>et al.</i>	2007	70	>18 ²	34,3
	Brasil	Barnabé <i>et al.</i>	2004	19	60	26,3
	Turquia	Kulak-Ozkan <i>et al.</i>	2002	44	-- ³	38,7
	Canadá	MacEntee	1998	59	≥70 ⁴	23,7
Newton Tipo III	Brasil	Senna (este trabalho)	2011	36	56	13,8
	Brasil	Gasparoto <i>et al.</i>	2009	56	69	5,3
	Brasil	Pinto <i>et al.</i>	2008	34	57	8,8
	Escócia	Coco <i>et al.</i>	2008	26	73	19,2
	Brasil	Neppelenbroek <i>et al.</i>	2008	60	59 ≥ ≤64 ¹	18,4
	Portugal	Figueiral <i>et al.</i>	2007	70	>18 ²	24,3
	Brasil	Barnabé <i>et al.</i>	2004	19	60	5,3
	Turquia	Kulak-Ozkan <i>et al.</i>	2002	44	-- ³	9,7
	Canadá	MacEntee	1998	59	≥70 ⁴	11,9

¹ Participaram do estudo 4 grupos com idades médias entre 59 e 64 anos.

² Participaram do estudo indivíduos maiores de 18 anos.

³ Não disponível idade dos participantes.

⁴ Participaram do estudo indivíduos com idade maior ou igual a 70 anos.

A disparidade da prevalência de EP Tipo I e II no presente trabalho, em relação à prevalência relatada em trabalhos similares, pode ser devido à maneira de fazer o uso da classificação de Newton (1962). Apesar de os tipos serem bem descritos (tipo I: presença de áreas puntiformes de inflamação dispersas pela

mucosa normal, limitadas aos ductos das glândulas salivares palatinas menores e tipo II: inflamação generalizada - a mucosa apresenta-se lisa e atrófica, abrangendo a região recoberta pela prótese), situações intermediárias a essas podem gerar dúvida em relação à classificação.

Foram classificados como grau I, somente aqueles tipos que se apresentaram clinicamente exatamente conforme a descrição. Por outro lado, casos que se apresentaram com características de tipo I, porém associadas com eritema difuso localizado em pequenas áreas do palato foram considerados como tipo II. A suposição de a disparidade citada ser devida à maneira de se realizar a classificação é reforçada pelo fato de a prevalência do tipo III encontrada neste trabalho ser similar àquela encontrada na literatura. Para receber tal tipificação, a mucosa deve apresentar a característica hiperplasia papilar.

5.2.3 Ocorrência de *Candida* spp.

A verificação da ocorrência de espécies do gênero *Candida* tanto na mucosa palatina quanto na prótese foi realizada nos 61 indivíduos que preencheram todos os critérios preliminares de inclusão, consentiram em participar da pesquisa e passaram por anamnese e exame clínico. Tal verificação foi realizada tanto nos locais da mucosa palatina com sinais da EP, quanto na face ventral da prótese que permanece em contato com a mucosa.

Na mucosa palatina, a espécie mais prevalente foi *C. albicans* (n=32, 59,26%), seguida de *C. glabrata*, (n=13, 24,07%), *C. tropicalis* (n=5, 9.26 %), *Candida* sp. (n=3, 5.56%) e *C. krusei* (n=1, 1.85%). A tabela 13 exibe a prevalência de espécies do gênero *Candida* isoladas a partir de amostras da mucosa palatina dos indivíduos.

Tabela 13 – Prevalência de espécies do gênero *Candida* isoladas a partir de amostras da mucosa palatina dos indivíduos

Espécie	Ocorrência	
	n	%
<i>C. albicans</i>	32	59,26
<i>C. glabrata</i>	13	24,07
<i>C. tropicalis</i>	5	9,26
<i>Candida</i> sp.	3	5,56
<i>C. krusei</i>	1	1,85
Total	54	100

Em relação às próteses, a espécie mais prevalente foi *C. albicans* (n=50, 53,76%), seguida de *C. glabrata*, (n=29, 31,18%), *C. tropicalis* (n=6, 6,45%), *Candida* sp. (n=3, 5,38%), *C. krusei* (n=2, 2,15%) e *C. dubliniensis* (n=1, 1,08%). A tabela 14 exibe a prevalência de espécies do gênero *Candida* verificada nas culturas oriundas da face ventral das próteses dos indivíduos

Tabela 14 – Prevalência de espécies do gênero *Candida* nas próteses dos indivíduos

Espécie	Ocorrência	
	n	%
<i>C. albicans</i>	50	53,76
<i>C. glabrata</i>	29	31,18
<i>C. tropicalis</i>	6	6,45
<i>Candida</i> sp.	5	5,38
<i>C. krusei</i>	2	2,15
<i>C. dubliniensis</i>	1	1,08
Total	93	100

O perfil de prevalência das espécies na mucosa e na prótese dos indivíduos foi parecido. *Candida albicans* foi a mais prevalente, seguida de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Tal achado corrobora dados de Marcos-Arias *et al.* (2009) e Zomorodian *et al.* (2011), que indicaram estas mesmas espécies como

as mais prevalentes. No entanto, Coco *et al.* (2008) citaram como mais prevalentes, pela ordem, *C. albicans*, *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Neste estudo, *Candida krusei* foi detectada somente uma vez na mucosa e duas vezes na prótese, enquanto *C. dubliniensis* foi detectada uma vez, associada a *C. glabrata* (tabela 15), e apenas na amostra oriunda da prótese do indivíduo. Marcos-Arias *et al.* (2009) também encontraram somente uma ocorrência de *C. dubliniensis* em 45 casos positivos para EP e, ao contrário do presente estudo, o fungo foi encontrado em associação com a espécie *C. krusei* em amostra oriunda do palato.

Tanto na mucosa (24,07%) quanto na prótese (31,18%), *C. glabrata* foi a segunda espécie mais prevalente, confirmando a tendência de ascensão de seu envolvimento em infecções (Redding e Dongari-Bagtzoglou, 2006; Coco *et al.*, 2008). Curiosamente, ao contrário do trabalho que citou o avanço de *C. glabrata*, (Coco *et al.*, 2008) e relatou não ter encontrado qualquer indivíduo com infecção causada isoladamente por esta espécie, no presente trabalho, quatro casos foram encontrados tendo *C. glabrata* como espécie fúngica única envolvida na infecção. Além disto, *C. glabrata* foi a única espécie, além de *C. albicans*, a ser encontrada causando infecção sem associação com outra espécie de fungo (tabelas 15 e 16).

Tabela 15 – Prevalência de espécies em infecções simples e mistas nas próteses dos indivíduos

Espécie	Ocorrência	
	n	%
<i>C. albicans</i>	22	36,05
<i>C. glabrata</i>	4	6,56
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	17	27,87
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	4	6,56
<i>C. albicans</i> + <i>Candida</i> sp.	3	4,92
<i>C. glabrata</i> + <i>C. tropicalis</i>	2	3,28
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	1	1,64
<i>C. glabrata</i> + <i>C. dubliniensis</i>	1	1,64
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> + <i>Candida</i> sp.	2	3,28
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> + <i>C. krusei</i>	1	1,64
SC	4	6,56
Total	61	100

SC: Amostras sem crescimento

O número de ocorrências de *Candida* spp. em amostras oriundas da prótese dos indivíduos (93) foi maior que o número de indivíduos analisados (61), pois em quase todos eles (n=57) foi detectada a presença de mais de uma espécie do gênero *Candida*. Em 31 destes 57, a infecção foi mista (duas ou três espécies ocorrendo simultaneamente). A tabela 15 exibe a prevalência de espécies em infecções simples e mistas nas próteses dos indivíduos.

O número de ocorrências em amostras oriundas do palato (n=54, tabela 16) foi menor que o número de indivíduos analisados (61), mesmo apresentando uma maior diversidade de combinações de infecções mistas (tabela 15) pois em 26 casos, não foi detectada presença de espécies do gênero *Candida*.

O número de amostras advindas do palato dos 61 indivíduos com EP sem crescimento de colônias foi maior (n= 26) do que o de amostras da prótese (n=4). Isto contribui para embasar a teoria de que o principal agente etiológico da EP é a presença de *Candida* spp. no biofilme da prótese e não na mucosa. No entanto, nosso achado é oposto ao relatado por Marcos-Arias *et al.* (2009) que,

em 45 indivíduos positivos clinicamente para EP, encontraram número maior de amostras sem crescimento na prótese (n=15) em relação à mucosa palatina (n=13).

Tabela 16 – Prevalência de espécies em infecções simples e mistas na mucosa palatina dos indivíduos

Espécie	Ocorrência	
	n	%
<i>C. albicans</i>	16	26,23
<i>C. glabrata</i>	3	4,92
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	8	13,11
<i>C. albicans</i> + <i>Candida</i> sp.	2	3,28
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	2	3,28
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	1	1,64
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> + <i>C. tropicalis</i>	2	3,28
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i> + <i>Candida</i> sp.	1	1,64
SC	26	42,62
Total	61	100

SC: Amostras sem crescimento

Entre os 61 casos analisados, 31 amostras oriundas da prótese e 15 oriundas da mucosa palatina exibiram crescimento de mais de uma espécie de *Candida*. Como espécies diferentes podem ter diferentes sensibilidades aos antifúngicos, tal fato pode ser um fator a mais a dificultar a terapia antifúngica. Além do mais, foi demonstrado que, quanto mais complexa a composição do biofilme, menos susceptível ele pode ser à PDT (Pereira *et al.*, 2011)

5.2.4 Diagnóstico clínico de EP e ausência de *Candida* spp.

Quatro dos 61 indivíduos iniciais, apesar de terem fechado o diagnóstico clínico de EP (FIG. 14), não tiveram colônias de *Candida* spp. detectadas nem na mucosa, nem na prótese (FIG.15) e foram excluídos do estudo.

FIGURA 14: Aspecto clínico da mucosa palatina, evidenciando sinais clínicos da EP em indivíduo que não teve a presença de *Candida* spp. detectada na prótese nem na mucosa palatina.

FIGURA 15: Réplica em ágar da prótese de indivíduo com diagnóstico clínico de EP. Mesmo com sinais clínicos de EP não foram detectadas colônias de *Candida* spp.

Apesar de a presença de *Candida* spp. ser o fator mais importante para o desenvolvimento da estomatite protética, em 4 (6,5%) dos 61 casos, como relatado acima, não havia a presença do microrganismo ou de outra espécie de levedura. Figueiral *et al.* (2007) encontraram 5 (7,1%) de 70 casos e Gasparoto *et al.* (2009) encontraram somente 1 (1,8%) de 55 casos na mesma situação. No entanto, para a pesquisa do microrganismo, os autores não se limitaram a coletar amostras somente da área afetada ou da superfície ventral da prótese, fato que pode comprometer esta análise, pois *Candida* spp. pode fazer parte da microbiota bucal, mesmo em indivíduos saudáveis.

Golecka *et al.* (2006) verificaram a presença de *Candida* spp. em indivíduos imunossuprimidos e com EP. Em 16,7% dos casos havia EP, mas não infecção por *Candida* spp. Marcos-Arias *et al.* (2009) avaliaram 100 usuários de prótese total e relataram 45 casos positivos para EP. Em 15 (33,33%) destes casos não foi detectada a presença de *Candida* spp. nas próteses dos indivíduos. Dagistan *et al.* (2008) em um estudo com 70 usuários de prótese total, encontraram 49 casos positivos para EP e em 10 (20,4%) destes casos não foi detectada a presença de *Candida* spp. Coco *et al.* (2008) coletaram amostras com swab da mucosa palatina, da superfície ventral da prótese e de toda a prótese, por meio de submissão a ultrassom. De 26 indivíduos com sinais clínicos de EP, 3 (11,5%) não apresentaram crescimento de *Candida* spp.

Apesar de no presente trabalho a prevalência de casos sem a detecção de *Candida* spp. ter sido bem menor (6,5%), credita-se isto ao fato de ter sido usada, como base para desenvolvimento da metodologia empregada, uma técnica que permite maior sensibilidade para detecção da presença de leveduras (Santarpia *et al.* 1990; Barbeau *et al.*, 2003).

Outros fatores citados como importantes para a ocorrência da EP são a má condição de higienização da prótese e sua má adaptação, fator que gera trauma (Salerno *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2008). Emami *et al.* (2008) sugeriram que o principal fator etiológico da EP, mais importante até que a infecção por *Candida* spp., seria o trauma oclusal. No entanto, é importante enfatizar que no caso descrito, tais condições também não foram encontradas (FIG. 16 e 17).

FIGURA 16: Aspecto ventral da prótese total do indivíduo: boa qualidade de higienização e áreas limítrofes bem delineadas.

FIGURA 17: Aspecto oclusal da prótese total do indivíduo: bom aspecto geral.

Dagistan *et al.* (2008) relataram que há boas evidências de que casos como este somente ocorreriam em indivíduos com estomatite grau I de Newton. Tal afirmação não encontra sustentação no caso descrito, por ser este classificado com Newton tipo II. Barbeau *et al.* (2003) relatou que casos de EP sem a presença de leveduras ocorreriam não em situações de Newton tipo I, mas sim em casos de pouca extensão da inflamação. Tal afirmação também não é suportada pelo caso descrito, visto que a área inflamada não é pequena (FIG.14).

A instituição de terapia antifúngica para tratamento da EP sem confirmação prévia da presença de leveduras é comum na rotina de consultórios odontológicos. Tal fato pode ser parcialmente explicado pelo fato de os artigos

que abordam o tratamento da EP não citarem a análise microbiológica prévia para instituição da terapia (Salerno *et al.*, 2011; Gendreau e Loewy, 2011). Porém, casos como o aqui descrito tornam preocupante a adoção de tal conduta e podem ajudar a explicar a ausência de resposta durante o tratamento de certos casos.

5.2.5 - Avaliação Clínica da terapia convencional e da PDT

Para avaliar a resposta clínica da mucosa dos indivíduos, seu aspecto foi classificado de acordo com o grau de eritema por um índice proposto por Budtz-Jorgensen *et al.* (1988), que compreende quatro níveis: 0- sem inflamação, 1- inflamação leve, 2- inflamação moderada e 3- inflamação severa. Esta classificação foi feita antes do início do tratamento e 48 horas após o final do tratamento para os dois grupos.

5.2.5.1- Avaliação clínica da terapia convencional

A tabela 17 apresenta o grau de eritema da mucosa palatina de cada indivíduo submetido à terapia convencional, de acordo com o Índice de Budtz-Jorgensen *et al.* (1988), antes e 48 horas após o final do tratamento.

TABELA 17 – Classificação do grau de eritema de acordo com o Índice de Budtz-Jorgensen *et al.*, para indivíduos submetidos à terapia convencional, antes e 48 horas após o final do tratamento

Indivíduo	Grau de eritema	
	Antes	Depois
1m	2	1
2m	2	0
3m	3	1
4m	3	2
5m	1	0
6m	2	0
7m	3	0
8m	3	0
9m	3	1
10m	3	0
11m	3	2
12m	3	1
13m	2	2
14m	3	1
15m	3	1
16m	3	1
17m	1	0
18m	1	0

m: indivíduo submetido à terapia com Miconazol

De 18 indivíduos submetidos à terapia convencional, 17 apresentaram melhora no grau de eritema e foram reposicionados para melhor no índice proposto por Budtz-Jorgensen *et al.*, o que equivale a um percentual de melhora de 94,5%. Outros trabalhos também relataram bom índice de melhora com o uso do Miconazol em formulação gel oral (Santos *et al.*, 2008, Amanlou *et al.*, 2006, Konsberg e Axel, 1994); no entanto, Neppelenbroek *et al.* (2008) relataram que só conseguiram melhora no quadro de eritema dos indivíduos tratados com Miconazol quando a esta terapia foi associado o tratamento da prótese do indivíduo em forno de micro-ondas.

Antes do início do tratamento, 11 indivíduos apresentavam eritema severo, 4 apresentavam eritema moderado, 3 apresentavam eritema leve e nenhum se apresentava sem eritema. Já ao final do tratamento, nenhum indivíduo

apresentava inflamação severa, 3 apresentavam inflamação moderada, 7 inflamação leve e 8 não apresentavam inflamação, conforme pode ser verificado na tabela 18.

Tabela 18 - Grau de eritema de acordo com o Índice de Budtz-Jorgensen *et al.* e número de indivíduos submetidos à terapia convencional, antes e 48 horas após o final do tratamento

Grau de Eritema	Número de indivíduos	
	Antes	Depois
Sem Inflamação	0	8
Inflamação Leve	3	7
Inflamação Moderada	4	3
Inflamação Severa	11	0
Total	18	18

Para verificar a efetividade clínica da terapia convencional e testar a hipótese de o grau de eritema anterior à terapia ser igual ao grau de eritema após a terapia, foi realizado o teste estatístico de Wilcoxon e obteve-se um p-valor de 0,00024. Portanto, ao nível de 95% de confiança, rejeita-se a hipótese nula. Há diferença significativa entre o antes e o depois da nova terapia, confirmando a efetividade da terapia convencional em tratar a estomatite protética.

5.2.5.2- Avaliação clínica da PDT

A tabela 19 apresenta o grau de eritema da mucosa palatina de cada indivíduo submetido à terapia convencional, de acordo com o Índice de Budtz-Jorgensen *et al.* (1988), antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 19 - Classificação do grau de eritema de acordo com o Índice de Budtz-Jorgensen *et al.*, para indivíduos submetidos à PDT, antes e 48 horas após o final do tratamento

indivíduo	Grau eritema	
	Antes	Depois
1p	2	1
2p	2	1
3p	3	3
4p	2	1
5p	3	0
6p	3	1
7p	2	1
8p	2	1
9p	3	2
10p	3	0
11p	3	0
12p	2	0
13p	3	0
14p	2	1
15p	3	1
16p	3	0
17p	3	1
18p	3	0

p: indivíduo submetido à PDT

De 18 indivíduos submetidos à PDT, 17 apresentaram melhora no grau de eritema e foram reposicionados para melhor no índice proposto por Budtz-Jorgensen *et al.*, o que equivale a um percentual de melhora de 94,5%, similar ao obtido pela terapia convencional. Não foram encontrados outros relatos de tratamento de estomatite protética por meio da PDT.

Antes do início do tratamento, 11 indivíduos apresentavam eritema severo, 7 apresentavam eritema moderado e nenhum se apresentava sem eritema ou com eritema leve. Ao final do tratamento, 1 indivíduo apresentava inflamação severa, 1 apresentava inflamação moderada, 9 apresentavam inflamação leve e 7 não apresentavam inflamação, conforme pode ser verificado na tabela 20.

Tabela 20 - Grau de eritema de acordo com o Índice de Budtz-Jorgensen *et al.* e número de indivíduos submetidos à terapia convencional antes e 48 horas após o final do tratamento

Grau de Eritema	Número de indivíduos	
	Antes	Depois
Sem Inflamação	0	7
Inflamação Leve	0	9
Inflamação Moderada	7	1
Inflamação Severa	11	1
Total	18	18

A avaliação do aspecto clínico e do grau de eritema é importante, pois a maioria dos indivíduos não busca tratamento para a estomatite protética devido à sua ocorrência assintomática na maioria das pessoas. Desta forma, na maior parte das ocorrências, o diagnóstico é feito pelo aspecto clínico visualizado em consultas de rotina no consultório do Cirurgião-Dentista.

As figuras 18 e 19, 20 e 21, 22 e 23 apresentam casos tratados com a PDT, evidenciando cura clínica, respectivamente para EP graus I, II e III de Newton.

FIGURA 18: Aspecto clínico inicial da mucosa palatina, evidenciando EP classe I de Newton.

FIGURA 19: Aspecto clínico final após a PDT: remissão total.

FIGURA 20: Aspecto clínico inicial da mucosa palatina, evidenciando EP classe II de Newton.

FIGURA 21: Aspecto clínico final após a PDT: remissão total

FIGURA 22: Aspecto clínico inicial da mucosa palatina, evidenciando EP classe III de Newton.

FIGURA 23: Aspecto clínico final após a PDT: remissão total do eritema. A permanência da hiperplasia papilar será discutida no item 5.2.7.

Para verificar a efetividade clínica da terapia convencional e testar a hipótese de o grau de eritema anterior à terapia ser igual ao grau de eritema após a terapia (tabelas 19 e 20), foi realizado o teste estatístico de Wilcoxon e obteve-se um p-valor de 0,00024. Portanto, ao nível de 95% de confiança, rejeita-se a hipótese nula. Há diferença significativa entre o antes e o depois da nova terapia, comprovando a efetividade da PDT em tratar a estomatite protética.

5.2.6- Avaliações microbiológicas relativas aos ensaios clínicos

As análises microbiológicas foram realizadas na mucosa palatina e na prótese do indivíduo antes do início do tratamento e também 48 horas após o final do tratamento. As colônias recuperadas da mucosa e da prótese de cada indivíduo foram contadas e o resultado foi expresso em graus de densidade, de acordo com o método proposto por Olsen, em 1974: grau 0 - ausência de crescimento de UFC; grau 1 - crescimento de 1 a 9 UFC; grau 2 - crescimento de 10 a 24 UFC; grau 3 - crescimento de 25 a 100 UFC; grau 4 - crescimento maior que 100 UFC; grau 5 - crescimento confluyente.

5.2.6.1- Avaliação microbiológica da terapia convencional na mucosa

A tabela 21 apresenta o grau densidade de UFC/mL nas amostras obtidas da mucosa palatina de cada indivíduo submetido à terapia convencional, de acordo com o Índice de Olsen, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 21 – Classificação da densidade de UFC/mL nas amostras da mucosa palatina de acordo com o Índice de Olsen para indivíduos submetidos à terapia convencional antes e 48 horas após o final do tratamento

Indivíduo	Grau de Densidade	
	Antes	Depois
1m	0	0
2m	0	0
3m	1	0
4m	0	0
5m	1	1
6m	2	0
7m	4	1
8m	2	0
9m	4	0
10m	3	0
11m	4	0
12m	3	0
13m	1	0
14m	0	0
15m	3	1
16m	2	0
17m	1	0
18m	3	0

m: indivíduo submetido à terapia com Miconazol

De 18 indivíduos que receberam a terapia convencional, 4 não apresentaram crescimento de fungos nas amostras oriundas da mucosa palatina antes do início do tratamento. Quatorze indivíduos tiveram crescimento de fungos antes do início da terapia e, dentre eles, 13 diminuíram ou zeraram o grau de densidade de UFC/mL, o que corresponde a um índice de melhora de 92,8%.

A tabela 22 exibe o crescimento de fungos, de acordo com a escala de Olsen, nas amostras oriundas da mucosa palatina dos indivíduos submetidos à terapia convencional, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 22 – UFC/mL de acordo com a escala de Olsen em amostra de mucosa palatina dos indivíduos submetidos à terapia convencional antes e 48 horas após o final do tratamento

UFC/mL	Número de indivíduos	
	Antes	Depois
Ausência de crescimento	4	15
Crescimento de 1 a 9	4	3
Crescimento de 10 a 24	3	0
Crescimento de 25 a 100	4	0
Crescimento maior que 100	3	0
Crescimento confluyente	0	0
Total	18	18

Para verificar a efetividade da terapia convencional em reduzir o número de colônias recuperadas da mucosa palatina e testar a hipótese de a densidade de UFC/mL recuperadas antes da terapia ser igual à densidade de UFC/mL recuperadas depois do tratamento (tabelas 21 e 22), foi realizado o teste estatístico de Wilcoxon e obteve-se um p-valor de 0,00135. Portanto, ao nível de 95% de confiança, rejeita-se a hipótese nula. Há diferença significativa entre o antes e o depois da terapia, confirmando a efetividade da terapia convencional em reduzir a contagem de *Candida* spp. na mucosa palatina.

5.2.6.2- Avaliação microbiológica da PDT na mucosa

A tabela 23 apresenta o grau densidade de UFC/mL nas amostras obtidas da mucosa palatina de cada indivíduo submetido à PDT, de acordo com o Índice de Olsen, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 23 – Classificação da densidade de UFC/mL nas amostras da mucosa palatina de acordo com o Índice de Olsen para indivíduos submetidos à PDT antes e 48 horas após o final do tratamento

Indivíduo	Grau de Densidade	
	Antes	Depois
1p	0	0
2p	0	0
3p	4	3
4p	3	0
5p	5	1
6p	5	1
7p	1	2
8p	5	5
9p	4	2
10p	2	0
11p	1	2
12p	1	1
13p	0	0
14p	1	0
15p	1	3
16p	2	0
17p	0	0
18p	0	0

p: indivíduo submetido à PDT

De 18 indivíduos que receberam a PDT, 5 não apresentaram crescimento de fungos nas amostras oriundas da mucosa palatina antes do início do tratamento. Treze indivíduos tiveram crescimento de fungos antes do início da terapia e dentre eles, 9 diminuíram ou zeraram o grau de densidade de UFC, o que corresponde a um índice de melhora de 69,2%.

A tabela 24 exhibe o crescimento de fungos, de acordo com a escala de Olsen, em amostras de mucosa palatina dos indivíduos submetidos à PDT, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 24 – UFC/mL de acordo com a escala de Olsen em amostra de mucosa palatina dos indivíduos submetidos à PDT antes e 48 horas após o final do tratamento

UFC/mL	Número de indivíduos	
	Antes	Depois
Ausência de crescimento	5	9
Crescimento de 1 a 9	5	3
Crescimento de 10 a 24	2	3
Crescimento de 25 a 100	1	2
Crescimento maior que 100	2	0
Crescimento confluyente	3	1
Total	18	18

Para verificar a efetividade da PDT em reduzir o número de colônias de *Candida* spp. recuperadas da mucosa palatina e testar a hipótese de a densidade de crescimento de microrganismos antes da terapia ser igual à densidade de crescimento de microrganismos depois do tratamento (tabelas 23 e 24), foi realizado o teste estatístico de Wilcoxon e obteve-se um p-valor de 0,053. Portanto, ao nível de 95% de confiança, não se rejeita a hipótese nula e não há diferença significativa entre o antes e o depois da PDT.

5.2.6.3- Avaliação microbiológica da terapia convencional na prótese

A tabela 25 exibe o grau densidade de UFC obtidas nas culturas advindas da prótese de cada indivíduo submetido à terapia convencional, de acordo com o Índice de Olsen, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 25 – Classificação da densidade de UFC obtida nas culturas advindas da prótese de cada indivíduo submetido à terapia convencional de acordo com o Índice de Olsen antes e 48 horas após o final do tratamento

Indivíduo	Grau de Densidade	
	Antes	Depois
1m	3	2
2m	3	0
3m	4	3
4m	4	1
5m	4	2
6m	4	0
7m	5	3
8m	4	0
9m	4	0
10m	5	0
11m	5	2
12m	5	0
13m	5	0
14m	1	0
15m	3	1
16m	4	2
17m	3	0
18m	2	0

m: indivíduo submetido à terapia com Miconazol

Todos os 18 indivíduos que receberam a terapia convencional apresentaram crescimento de colônias de *Candida* spp. nas culturas advindas das próteses antes do início do tratamento. Após a terapia convencional, todos estes indivíduos diminuíram ou zeraram o grau de densidade de UFC, o que corresponde a um índice de melhora de 100%.

A tabela 26 exibe o crescimento de colônias, de acordo com a escala de Olsen, em culturas oriundas das próteses dos indivíduos submetidos à terapia convencional, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 26 – UFC nas culturas advindas da prótese de cada indivíduo submetido à terapia convencional, de acordo com a escala de Olsen antes e 48 horas após o final do tratamento

UFC	Número de indivíduos	
	Antes	Depois
Ausência de crescimento	0	10
Crescimento de 1 a 9	1	2
Crescimento de 10 a 24	1	4
Crescimento de 25 a 100	4	2
Crescimento maior que 100	7	0
Crescimento confluyente	5	0
Total	18	18

Para verificar a efetividade da terapia convencional em reduzir o número de UFC nas culturas oriundas das próteses dos indivíduos e testar a hipótese de a densidade de crescimento de UFC antes da terapia ser igual à densidade de crescimento de UFC depois do tratamento (tabelas 25 e 26), foi realizado o teste estatístico de Wilcoxon e obteve-se um p-valor de 0,00018. Portanto, ao nível de 95% de confiança, rejeita-se a hipótese nula. Há diferença significativa entre o antes e o depois da terapia, confirmando a efetividade da terapia convencional em reduzir as UFC de culturas oriundas das próteses dos indivíduos.

5.2.6.4- Avaliação microbiológica da PDT na prótese

A tabela 27 exhibe o grau densidade de UFC obtidas nas culturas advindas da prótese de cada indivíduo submetido à PDT, de acordo com o Índice de Olsen, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 27 – Classificação da densidade de UFC obtida nas culturas advindas da prótese de cada indivíduo submetido à PDT de acordo com o Índice de Olsen antes e 48 horas após o final do tratamento

Indivíduo	Grau de Densidade	
	Antes	Depois
1p	1	0
2p	3	0
3p	4	4
4p	5	1
5p	5	3
6p	5	1
7p	5	2
8p	5	4
9p	5	4
10p	5	3
11p	5	3
12p	4	3
13p	2	0
14p	3	1
15p	4	1
16p	3	0
17p	3	0
18p	1	0

p: indivíduo submetido à PDT

Todos os 18 indivíduos que receberam a PDT apresentaram crescimento de colônias nas culturas advindas das próteses antes do início do tratamento. Dentre estes 18 indivíduos, somente 1 não zerou ou apresentou redução do grau de densidade de UFC ao final do tratamento, fato que corresponde a um índice de melhora de 94,4%.

A tabela 28 exibe o crescimento de colônias, de acordo com a escala de Olsen, em culturas oriundas das próteses dos indivíduos submetidos à PDT, antes e 48 horas após o final do tratamento.

Tabela 28 – UFC nas culturas advindas da prótese de cada indivíduo submetido à PDT, de acordo com a escala de Olsen antes e 48 horas após o final do tratamento.

UFC	Número de indivíduos	
	Antes	Depois
Ausência de crescimento	0	6
Crescimento de 1 a 9	2	4
Crescimento de 10 a 24	1	1
Crescimento de 25 a 100	4	4
Crescimento maior que 100	3	3
Crescimento confluyente	8	0
Total	18	18

Para verificar a efetividade da PDT em reduzir o número de UFC nas culturas oriundas das próteses dos indivíduos e testar a hipótese de a densidade de crescimento de UFC antes da terapia ser igual à densidade de crescimento de UFC depois do tratamento (tabelas 27 e 28), foi realizado o teste estatístico de Wilcoxon e obteve-se um p-valor de 0,00024. Portanto ao nível de 95% de confiança rejeita-se a hipótese nula. Há diferença significativa entre antes e depois terapia, confirmando a efetividade da PDT em reduzir as UFC de culturas oriundas das próteses dos indivíduos.

Maver-Biscanin *et al.* (2004) relataram ter conseguido a redução da contagem de fungos recuperados de próteses totais de indivíduos com EP, sem uso de fotosensibilizador, utilizando lasers com comprimento de onda de 685nm e 830nm. Tais achados são antagônicos ao encontradas na presente pesquisa, pois, nos ensaios pré-clínicos, nenhuma linhagem de *Candida* spp. foi susceptível ao laser isoladamente. Tal trabalho somente realizou a contagem de *Candida albicans*, ao passo que a infecção na EP pode ser causada por diversas outras espécies (vide item 5.2.3).

A redução encontrada no presente trabalho corrobora os achados de Ribeiro *et al.* (2011), que também testaram a PDT em próteses. O trabalho não tinha como objetivo tratar a EP, mas apenas esterilizar as próteses. Os pesquisadores utilizaram metodologia bem distinta do presente trabalho: como

fonte de luz, no lugar do laser, utilizaram um led; como fotossensibilizador foi usado o Photogem[®] ao invés da solução de azul de metileno e os usuários de próteses eram indivíduos saudáveis, ao invés de portadores de EP. Apesar destas diferenças, eles também avaliaram a redução microbiana na prótese e concluíram que a PDT é efetiva em sua desinfecção, pois encontraram redução mínima de 90% da população microbiana das próteses.

5.2.7 - A permanência da hiperplasia papilar

Apesar da remissão total do eritema, um indivíduo, portador de EP tipo III de Newton permaneceu com a hiperplasia papilar no palato ao final da PDT. As figuras 24, 25, 26 e 27 mostram o palato do indivíduo com a evolução semanal do aspecto clínico.

FIGURA 24: Aspecto da mucosa palatina do indivíduo na semana 1. Presença de hiperplasia papilar inflamatória e eritema acentuado

FIGURA 25: Aspecto da mucosa palatina na semana 2. Discreta melhora no quadro de eritema.

FIGURA 26: Aspecto da mucosa palatina na semana 3. Continúa melhora no quadro de eritema.

FIGURA 27: Aspecto da mucosa palatina na semana 4: permanência da hiperplasia, mas ausência de eritema.

A hiperplasia papilar inflamatória, em geral, é consequência de uma prótese mal delineada, mal confeccionada ou conservada e da infecção por *Candida* spp. (Infante-Cossio *et al.*, 2007). Tal fato é suportado pela análise da condição da prótese do indivíduo, a qual se apresenta com bordos mal delineados, com ausência de dentes, com fratura extensa, além de manchas ao longo da junção entre os dentes e a base da prótese. As figuras 28 e 29 mostram a condição da prótese no início do tratamento do indivíduo.

FIGURA 28: Aspecto frontal da prótese do indivíduo. Péssimo estado de conservação: ausência de um incisivo central e fratura lateral.

FIGURA 29: Aspecto lateral da prótese do indivíduo. Péssimo estado de conservação: extensa fratura e pigmentação ao longo da união entre dente e base da prótese.

Independente da terapia antifúngica instituída, a hiperplasia papilar pode permanecer ao final do tratamento. Salonen *et al.* (1996) trataram indivíduos com EP e hiperplasia papilar inflamatória por meio de dois métodos diferentes: tratamento tópico à base de miconazol em gel e terapia sistêmica à base de fluconazol. Apesar de considerarem o resultado satisfatório, os dois grupos apresentaram indivíduos sem remissão da hiperplasia.

Mesmo com a permanência da hiperplasia papilar, a PDT pode ser considerada exitosa, pois, em tais casos, a terapia antifúngica deve ser complementada com remoção cirúrgica da hiperplasia (Infante-Cossio *et al.*, 2007; Coleman e Nelson, 1993; Salonen *et al.*, 1996).

5.2.8- A falta de resposta clínica

Apesar de 17 dos 18 casos tratados com a PDT terem obtido bons resultados clínicos, em um caso não ocorreu resposta clínica satisfatória e o grau de eritema foi mantido, de acordo com o Índice de Budtz-Jorgensen *et al.* As figuras 30 e 31 mostram os aspectos clínicos inicial e 48 horas após o final da PDT.

FIGURA 30: Aspecto clínico inicial da mucosa palatina, evidenciando EP.

FIGURA 31: Aspecto clínico final da mucosa palatina, ainda evidenciando EP.

Para encontrar fundamentação para a ausência de resultado clínico satisfatório, a análise deve ser feita pelo ponto de vista da etiologia multifatorial da EP. Além da presença de *Candida spp.*, outros fatores estão relacionados à sua ocorrência, tais como grau de higienização da prótese, hábito de dormir com a mesma, qualidade do material de base da dentadura, presença de xerostomia, trauma oclusal, entre outros (Gendreau e Loewy, 2011; Salerno *et al.*, 2011).

Durante a anamnese, na consulta inicial, quando questionado sobre os cuidados diários com a prótese, o indivíduo relatou sempre dormir sem a prótese, bem como remover e escovar a prótese três vezes ao dia. Apesar de considerar o relato do indivíduo, as evidências clínicas durante as sessões de acompanhamento forneceram indícios contrários. As figuras 32 e 33 mostram a inadequada condição de higienização da prótese e da mucosa bucal, verificada em uma das sessões de controle. A qualidade do material de base da prótese

também pode ser questionada. As porosidades e irregularidades são nítidas, mesmo macroscopicamente.

FIGURA 32: Aspecto da face da prótese total que entra em contato com a mucosa palatina: baixa qualidade de higienização, defeitos e porosidades generalizados. A aparência azulada se deve ao fato de a imagem ter sido feita após sessão clínica de PDT e o biofilme estar corado pela solução de azul de metileno.

FIGURA 33: Aspecto clínico da boca do indivíduo prévio à sessão de PDT. As setas e o círculo mostram resíduos alimentares: baixa qualidade de higienização.

Devido à ausência de estudos clínicos sobre a PDT, uma possível explicação seria a ausência de efeitos antifúngicos da PDT neste indivíduo. Tal suposição não tem fundamento, dado o efeito antifúngico demonstrado em nossos experimentos pré-clínicos em protótipos e visto que os exames laboratoriais iniciais e finais da mucosa palatina mostram redução das UFC (FIG. 34 e 35).

Ressalta-se ainda que também um caso tratado com Miconazol não apresentou melhora no quadro clínico, no entanto, outros trabalhos já demonstraram que nem sempre todos os indivíduos melhoram com o uso do antifúngico, mesmo que seja o Fluconazol (Budtz-Jorgensen *et al.*, 1988; Kulak, *et al.*, 1994).

FIGURA 34: Placa de Petri com cultura de material obtido da mucosa palatina do indivíduo, exibindo diversas unidades formadoras de colônia, em meio cromogênico CHROMagar Candida®, antes do início da PDT.

FIGURA 35: Placa de Petri com cultura de material obtido da mucosa palatina do indivíduo, 48 horas após o final da PDT. O meio cromogênico permite distinguir UFC de duas espécies distintas. Número de UFC reduzido em relação à cultura inicial.

Budtz-Jorgensen *et al.* (1988) relataram que de 19 indivíduos tratados com comprimidos de Fluconazol, 3 foram curados, 14 melhoraram a condição clínica e 2 não apresentaram melhora. Já nas culturas advindas tanto da prótese quanto da mucosa palatina destes indivíduos, somente 3 casos apresentaram ausência de contagem de UFC.

Kulak, *et al.* (1994) trataram três grupos de 15 indivíduos. O primeiro grupo recebeu tratamento à base de Fluconazol em comprimidos, o segundo grupo recebeu a mesma medicação e foi orientado a higienizar a prótese duas vezes ao dia com uma solução antimicrobiana à base de Clorexidina e o terceiro grupo teve como tratamento somente a confecção de novas e bem delineadas próteses. Com a metodologia proposta, 2 de 15 indivíduos do grupo tratado com o Fluconazol e 2 de 15 indivíduos tratados com a associação de Fluconazol e Clorexidina também não apresentaram cura clínica.

É importante observar que, por uma questão metodológica e objetivando excluir possíveis fatores de confundimento, a substituição das próteses dos indivíduos submetidos à PDT não foi realizada durante o andamento da pesquisa, bem como tais indivíduos foram orientados a manter os hábitos de manutenção e higiene da prótese. Se por um lado tal conduta contribui para isolar o efeito da PDT, por outro, deixa margem para especulação de um possível resultado mais favorável se o indivíduo tivesse recebido a terapia completa, com renovação da prótese e orientações completas sobre seus cuidados.

5.2.9- A questão do tingimento das próteses pelo Azul de Metileno

Uma discussão recorrente quando se discute PDT é a possibilidade de o fotossensibilizador acarretar manchas nos tecidos submetidos a tratamento. Caso tal fato ocorresse com as próteses dos indivíduos, poderia ser um efeito adverso muito inconveniente. Silva *et al.* (2002) estudaram soluções evidenciadoras de biofilme em próteses totais. Para tanto, utilizaram soluções de azul de metileno, eosina, eritrosina, fluoresceína sódica, proflavina monossulfato e vermelho neutro, além de um produto comercial em forma de pastilha, denominado Replak[®]. Entre todas estas soluções evidenciadoras de biofilme testadas, a solução de azul de metileno foi a que corou melhor o biofilme, a que foi mais difícil de remover e a que mais corou áreas da prótese sem biofilme aparente.

Tal panorama indica um prognóstico desfavorável ao uso da solução de azul de metileno em próteses totais. Surpreendentemente, tal prognóstico não foi confirmado no presente estudo. Apenas as próteses com higienização precária e com muito biofilme se mostraram bastante coradas (FIG. 36, 37, 38 e 39).

FIGURA 36: Face externa da prótese antes da realização da PDT, exibindo ausência de dente, manchas variadas e baixa qualidade de higienização da mesma.

FIGURA 37: Face interna (dorsal) da prótese antes da realização da PDT, exibindo, manchas variadas e baixa qualidade de higienização da mesma.

FIGURA 38: Face externa da prótese, após realização da PDT e enxague em água corrente. A baixa qualidade de higienização favorece o tingimento das superfícies. Apesar de a solução ter sido aplicada na face interna, devido à transparência de algumas áreas da prótese, é possível visualizar manchas azuis.

FIGURA 39: Face interna da prótese (face que entra em contato com a mucosa palatina) após realização da PDT e enxague em água corrente. A baixa qualidade de higienização e o acúmulo de biofilme favorece o aparecimento de manchas.

FIGURA 40: Face interna da prótese, exibindo relativa boa higienização, antes de execução da PDT.

FIGURA 41: Face interna da prótese após a execução da PDT e enxágue em água corrente. Quando há pelo menos razoável qualidade de higienização, a tendência a tingimento é menor.

Quando as próteses possuíam pelo menos um grau razoável de higienização, as manchas não ocorriam com facilidade (FIG. 40 e 41). Mesmo nos casos em que o tingimento possa ocorrer, o mesmo pode ser interpretado de forma positiva para a terapia. Como a solução fotossensibilizadora somente é levada na parte da prótese que entra em contato com o palato, ainda que ocorram manchas, estas não aparecerão quando a prótese estiver em posição de uso. Considerando que a solução de azul de metileno tem maior afinidade pelo biofilme, que a presença do biofilme é de crucial importância no estabelecimento e manutenção da EP e que é principalmente o biofilme que se apresenta corado, o indivíduo poderia vir a ser orientado, após a sessão de PDT e o surgimento das manchas, a proceder à higienização mais criteriosa nas partes da prótese que viessem a ser tingidas de azul.

Desta forma, um fator que é amplamente discutido como inconveniente do uso da PDT, o tingimento dos tecidos, passaria a ser um fator de potencialização da terapia.

5.2.10- Comparação entre a terapia convencional e a PDT

Para confrontar a PDT com a terapia convencional, foram comparados os resultados finais das análises microbiológicas da prótese e da mucosa, bem como do aspecto clínico da mucosa dos indivíduos. Para tanto, foi usado o Teste Exato de Fisher e foram encontrados, respectivamente, os seguintes valores: $p=0,1196$; $p=0,136$ e $p=0,7229$. Tais valores demonstram que não há diferença estatística significativa entre os resultados da PDT e da terapia convencional.

Quando realizada a avaliação microbiológica da PDT na mucosa (item 5.2.6.2), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para o número de UFC recuperadas, ao contrário da terapia convencional, que mostrou resultados mais favoráveis (item 5.2.6.1). A PDT reduziu o número de UFC, mas não a ponto de apresentar significância estatística. Porém, ao se comparar os resultados da PDT com os da terapia convencional, não há diferença estatisticamente significativa. Há que se enfatizar que a sede da infecção por *Candida* spp. é a prótese, e não a mucosa palatina. Tal fato fica bem claro quando se compara o grau de densidade de UFC na mucosa palatina e na

prótese para ambos os grupos. A média do grau de densidade de UFC na mucosa antes da terapia convencional e da PDT foi de, respectivamente, 1,88 e 1,94 e a mesma medida na prótese foi de 3,77 e 3,77.

Outra observação pertinente é que não houve amostra advinda da mucosa com crescimento confluyente em qualquer indivíduo dos dois grupos (tabela 22 e 24), ao passo que para amostras das próteses, de 18 indivíduos, 8 deles, em cada grupo, exibiram crescimento confluyente (tabelas 26 e 28). Ao que tudo indica, a presença de *Candida* spp. na mucosa tem caráter apenas transitório, de colonização, sendo a infecção localizada na prótese. Desta forma, a análise microbiológica da mucosa não seria o melhor parâmetro de avaliação das terapias e sim o da prótese. Apesar desta constatação e dos resultados obtidos não terem sido estatisticamente significantes para a redução de UFC na mucosa com o uso da PDT, considera-se seu uso viável, pois possibilitou a redução da contaminação e, quando comparado à terapia convencional, os resultados alcançados por uma e por outra não tiveram diferença estatística significativa.

7- CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que, em aproximadamente metade dos casos, a infecção por *Candida spp.* foi ocasionada por duas ou mais espécies diferentes. Essas espécies têm sensibilidades diferentes aos diversos tipos de antifúngicos convencionais, podendo, inclusive, apresentar resistência. Tal fato pode gerar insucesso na terapia instituída. Nesse contexto, a PDT também pode ser útil e apresentar vantagens, dada a ausência de relatos de resistência fúngica.

Apesar dos bons resultados pré-clínicos, os resultados clínicos nos indicaram que a PDT está exibindo seu potencial terapêutico. É motivador o fato de, nesta pesquisa, o sucesso clínico alcançado pela terapia fotodinâmica antimicrobiana ter sido similar ao da terapia convencional para o tratamento da estomatite protética, pois, enquanto os antifúngicos convencionais já se encontram bem desenvolvidos, com esquema terapêutico, doses e posologia bem determinados e estudados, a PDT ainda está em início de seu desenvolvimento clínico.

Novas pesquisas clínicas, estudando isoladamente a concentração do fotosensibilizador, a potência, a densidade de potência, a densidade de energia e o intervalo entre sessões podem ainda aperfeiçoar a terapêutica por meio da PDT. Outros fotossensibilizadores podem também ser desenvolvidos ou testados para serem utilizados com a irradiação em diversos comprimentos de onda. Assim, as possibilidades de desenvolvimento clínico ainda são diversas para a PDT.

Os resultados apresentados neste trabalho permitem supor um futuro promissor para a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Os resultados pré-clínicos exibiram redução para todas as espécies avaliadas de no mínimo 99,9% dos microrganismos, mas chegando até quase 99,999% (*C. glabrata*). Considerando que algumas das espécies testadas apresentam, com frequência, resistência aos antifúngicos convencionais e que ainda não há relatos de resistência à PDT, o panorama se torna ainda mais promissor.

Diversas vantagens podem ser citadas para o uso da PDT. A redução da necessidade de colaboração do indivíduo tratado é uma delas. Quando do uso de medicamentos, a não ser que o paciente esteja internado ou sob a responsabilidade de cuidadores, o compromisso de seguir horários e demais recomendações de posologia fica unicamente sob a responsabilidade do paciente. Qualquer insucesso na terapia pode gerar dúvidas sobre se foi causado pela falta de eficácia do medicamento, ou pelo uso inadequado do mesmo. Neste panorama, a PDT contribui por trazer maior controle sobre o curso do tratamento, uma vez que as aplicações ficam a cargo da equipe clínica.

A possível redução de custos de tratamento pode também ser relacionada como benefício da PDT. A quantidade do fármaco testado, o azul de metileno, é mínima e seu custo extremamente reduzido. Além disso, o custo dos equipamentos de laser vem gradativamente diminuindo, assim como o tamanho do aparelho em si, fatos que possibilitariam uma maior disseminação de seu uso.

Outra grande vantagem da PDT é a possibilidade de uso em pacientes imunocomprometidos. A necessidade de terapia antimicrobiana, frequente nestes indivíduos, faz com que se aumente muito a possibilidade de surgimento de resistência fúngica. Neste contexto, a PDT atuaria em duas condições distintas: se por um lado seu uso diminui o surgimento de cepas resistentes, por outro, quando da resistência instalada, seu potencial de ação ainda é considerável. O uso da PDT em grávidas também é muito promissor, pois evitaria os efeitos sistêmicos indesejáveis e as possíveis consequências ao feto.

Especificamente para o tratamento da EP, este trabalho demonstrou a sua viabilidade clínica, reduzindo a contagem microbiana, aliviando o quadro de eritema e demonstrando eficiência na melhora do quadro clínico, tendo eficácia similar à terapia convencional à base do antifúngico Miconazol. Desta forma, acredita-se ser a terapia fotodinâmica antimicrobiana uma real alternativa de tratamento da estomatite protética.

De forma resumida, os dados obtidos permitiram a elaboração das seguintes conclusões:

- A metodologia proposta foi adequada para crescimento de biofilme de *Candida* spp. e teste de terapia fotodinâmica antimicrobiana;
- A terapia fotodinâmica antimicrobiana, nos parâmetros testados, foi efetiva no combate a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, quando crescidas em biofilme;
- A terapia convencional, baseada no uso do Miconazol em gel oral, nos parâmetros testados, foi eficiente no tratamento da estomatite protética.
- A terapia fotodinâmica antimicrobiana com o uso da solução de azul de metileno como fotosensibilizador, nos parâmetros testados, foi eficiente no tratamento da estomatite protética.
- A PDT pode ser uma opção viável de tratamento da estomatite protética.

REFERÊNCIAS

- AMANLOU, M., BEITOLLAHI, J.M. ABDOLLAHZADEH, S. TOHIDAST-EKRAD, Z. Miconazole gel compared with *Zataria multiflora* Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis. **Phytother Res.** v. 20, n. 11, p. 966-969, 2006.
- ARITA, M., NAGAYOSHI, M., FUKUIZUMI, T., OKINAGA, T. MASUMI, S., MORIKAWA, M., KAKINOKI, Y., NISHIHARA, T. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates adhering to acrylic denture plates. **Oral Microbiol Immunol** v. 20, p. 206-210, 2005.
- BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilm. **J. Med. Microbiol.** v. 48, p. 671-679, 1999.
- BARBEAU, J., SÉGUIN, J., GOULET, J. P., KONINCK, L., AVON, S. L., LALONDE, B., ROMPRÉ, P., DESLAURIERS, N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** v. 95, p.51-9, 2003.
- BARNABÉ, W. MENDONÇA NETO, T., PIMENTA, F.C., PEGORARO, L.F. 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.** v. 31, n. 5, p. 453-459, 2004.
- BATISTA, J. M., BIRMAN, E. G., CURY, A. C. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de indivíduos com estomatite protética. **Rev Odontol Univ São Paulo** v.13, n.4, p.343-348, 1999.
- BLISS, J.M.; BIGELOW, C.E.; FOSTER, T.H.; HAIDARIS, C.G. Susceptibility of *Candida* Species to Photodynamic Effects of Photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 48, n.6, p.2000-2006, 2004.
- BOLLEN, C.M.; LAMBRECHTS, P.; QUIRYNEN, M.D.M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. **Dent Mater.** v.13, p. 258–269, 1997.
- BORAKS, S. **Diagnóstico Bucal.** São Paulo: Artes Médicas, 2001.
- BUDTZ-JORGENSEN, E; HOLMSTRUP, P.; KROGH, P. Fluconazole in the Treatment of *Candida*-Associated Denture Stomatitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 32, n. 12, p. 1859-1863, 1988.

CAWSON, R. A. BINNIE, W. H., EVESON, J. W. **Atlas Colorido de Enfermidades da Boca**. São Paulo: Artes Médicas, 1997.

COCO, B.J., BAGG, J., CROSS, L.J., JOSE, A. CROSS, J., RAMAGE, G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 23, n.5, p. 377-383, 2008.

COLEMAN, G. C. ; NELSON, J. F. **Princípios de diagnóstico bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiol** v. 49, p. 711-745, 1995.

DAGISTAN, S.; AKTAS, E.; CAGLAYAN, F.; AYYILDIZ, A. BILGE, M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, *Candida*, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. **Mycoses**. v.52, p. 266-271, 2009.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**. v. 2, p.114-122, 2003.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**. v. 11, n. 1, 2003.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; MIMA, E.G.O.; GIAMPAOLO, C.E.; VERGANI, C.E. BAGNATO, V.S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**. v.54, p.123–130, 2011.

EMAMI, E.; GRANDMONT, P.; ROMPRÉ, P.H.; BARBEAU, J.; PAN, S.; FEINE, J.S. Favoring Trauma as an Etiological Factor in Denture Stomatitis. **Jornal of Dental Research**. v.87, n. 5, p. 440-444, 2008.

FIDEL JR, P.L; VAZQUEZ, J.A; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.80-96, 1999.

FIGUEIRAL, M.H., AZUL, A., PINTO, P. A., BRANCO, F.M., SCULLY, C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors- a large cohort. **J Oral Rehabil**. v. 34, n. 6, p.448-455, 2007.

FITZPATRICK, T. B.; et al. **Dermatologia Atlas e Texto**. Rio de Janeiro: The McGraw-Hill Companies, 1997.

FREITAS, J.B., GOMEZ, R.S.; DE ABREU, M.H.N.G., FERREIRA E FERREIRA, E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. **J Oral Rehabil**, v. 35, p. 370-374, 2008.

GASPAROTO, T.H.; DIONÍSIO, T.J.; OLIVEIRA, C.E.; PORTO, V.C.; GELANI, V.; SANTOS, C.F.; CAMPANELLI, A.P.; LARA, V.S. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 959-962, 2009.

GENDREAU, L.; LOEWY, Z.G. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. **Journal of Prosthodontics**. v.20, n. 4, p. 251-260, 2011.

GLASS, R. T., BULLARD, J. W., CONRAD, R. S., BLEWETT, E. L. Evaluation of the sanitization effectiveness of a denture-cleaning product on dentures contaminated with known microbial flora. An in vitro study. **Quintessence Int** v.35, n.3, p.194-199, 2004.

GOLECKA, M.; OLDAKOWSKA-JEDYNAK, U.; MIERZWINSKA-NASTALSKA, E.; ADAMCZYK-SOSINSKA, E. Candida-Associated denture Stomatitis in Patients After Immunosuppression Therapy. **Transplantation Proceedings**, v. 38, n. 1, p. 155-156, 2006.

GONZALES, F.P.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Mycological Research**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2012.

HE, X.Y.; MEURMAN, J.H.; KARI, K.; RAUTEMAA, R.; SAMARANAYAKE, L.P. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. **Mycoses**, v.49, p. 80-84, 2006.

HARRISON, Z., JOHNSON, A., DOUGLAS, C. W. I. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. **J Oral Rehabil** v.31, p. 460-467, 2004.

HUANG, D., SWANSON, E.A., LIN, C.P., SCHUMAN, J.S., STINSON, W.G., HEE, M.R., FLOTTE, T., GREGORY, K., PULIAFITO, C.A., FUJIMOTO, J.G. Optical Coherence Tomography. **Science**, v. 254, p.1178-1181, 1991.

INFANTE-COSSIO, P.; MARTINEZ-DE-FUENTES, R.; TORRES-CARRANZA, E.; GUTIERREZ-PEREZ, J.L. Inflammatory papillary hyperplasia of the palate: Treatment with carbon dioxide laser, followed by restoration with an implant-supported prosthesis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, p. 658-660, 2007.

JENKINSON, H.F.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms Adhere to Stay. **Trends in Microbiology**, v.9, n.1, 2001.

JETT, B.D; HATTER, K.L; HUYCKE, M.M; GILMORE, M.S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**. v. 23, n.4, p. 648-650, 1997.

JIN, Y.; SAMARANAYAKE, L.P.; SAMARANAYAKE, Y.; YIP, H.K. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Archives of Oral Biology**. v. 49, p. 789-798, 2004.

KONSBERG, R., AXÉLL, T. Treatment of *Candida*-infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**. v. 78, p. 306-311, 1994.

KORAY, M.; AK, G.; KURKLU, E.; ISSEVER, H.; TANYERI, H.; KULEKEI, G.; GUE, U. Fluconazole and/or hexetidine for management of oral candidiasis associated with denture-induced stomatitis. **Oral Diseases**, v. 11, p. 309-313, 2005.

KOSSIONI, K.A. The prevalence of denture stomatitis and its predisposing conditions in an older Greek population. **Gerodontology**. v. 28, n. 2, p. 85-90, 2011.

KULAK, Y; ARIKAN, A.; DELIBALTA, N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. v.72, n. 3, p.283-288, 1994.

KULAK-OZKAN Y, KAZAZOGLU E, ARIKAN A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **J. Oral Rehabil.** v. 29, n. 3, p. 300-304, 2002.

LI, L.; FINNEGAN, M.B.; OZKAN, S.; KIM, Y.; LILLEHOJ, P.B.; HO, C.-M.; LUX, R.; MITO, R.; LOEWY, Z. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. **Molecular Oral Microbiology**. v. 25, p.384-390, 2010.

LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; ETGES, A.; RIBEIRO, G.A. ROSALEN, P.L. DEL PINO, F.A.B. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. and prevalence of variables associated to chronic atrophic candidiasis. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 232-238, 2010.

MACENTEE, M.I., GLICK, N., STOLAR E. Age, gender, dentures and oral mucosal disorders. **Oral. Dis.** v. 4, n. 1, p. 32-36, 1998.

MARCOS-ARIAS, C.; VICENTE, J.L.; SAHAND, I.H.; EGUIA, A.; DE-JUAN, A.; MADARIAGA, L., AGUIRRE, J.M.; ERASO, E.; QUINDÓS, G. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. **Archives of Oral Biology**. v. 54, p. 127-131, 2009.

MARTINEZ-BENEYTO, Y., LOPEZ-JORNET, P. VELANDRINO-NICOLAS, A. JORNET-GARCIA, V. Use of antifungal agents for oral candidiasis: results of a national survey. **Int J Dent Hyg**. v. 8, n. 1, p. 47-52, 2010.

MARTINS, J.S., JUNQUEIRA, J.C., FARIA, R.L., SANTIAGO, N.S., ROSSONI, R.D., COLOMBO, C.E.D. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 11, n. 1, p. 71-77, 2011.

MAVER-BISCANIN, M., MRAVAK-STIPETIC, M., JEROLIMOV, V., BISCANIN, A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. **Lasers in Surgery and Medicine** v.35 p.259-262, 2004.

MEURMAN, J.H.; PARNANEN, P.; SENEVIRATNE, C.J.; SAMARANAYAKE, L.P.; SAARINEN, A.M.J.; KARI, K. Prevalence and Antifungal drug sensitivity of non-albicans *Candida* in oral rinse samples of self-caring elderly. **Gerodontology**, v. 28, n. 4, p. 246-252, 2011.

NEPPELENBROEK, K.H., PAVARINA, A.C., SPOLIDORIO, D.M.P., MASSUCATO, E.M. S., SPOLIDORIO LC; VERGANI, C.E. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. **J Oral Rehabil.** v. 35, n.11, p. 836-846, 2008.

NEVILLE, B.W; DAMM, D.D. ALLEN, C.M; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral e Maxilofacial.** 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.

NEWTON, A.V. Denture sore mouth: a possible etiology. **Br Dent J**, v.1, p.357-360, 1962.

OLSEN, I. Denture Stomatitis Occurrence and distribution of fungi. **Acta Odont. Scand.** v. 32, p. 329-33, 1974.

PAUGAM, A.; BAIXENCH, M.-T.; VIGUIÉ, C. An update on *Candida dubliniensis*. **Médecine et maladies infectieuses.** v. 38, p. 1-7, 2008.

PEREIRA, C.A., ROMEIRO, R.L., COSTA, A.C.B.P., MACHADO, A.K.S., JUNQUEIRA, J.C., JORGE, A.O.C. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers Med. Sci.** v.26, p.341-48, 2011.

PINTO, T.M.S.; NEVES, A.C.C.; LEÃO, M.V.P.; JORGE, A.O.C. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. **J Appl Oral Sci.** v. 16, n. 6, p. 385-90, 2008.

QUIRYNEN, M.; MARECHAL, M.; BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H.; DARIUS, P.L.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. **J Clin Periodontol**, v.17, p. 138-144, 1990.

RADFORD, D.R.; CHALLACOMBE, S.J.; WALTER, J.D. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. **C.R.O.B.M.**, v.10, p. 99-116, 1999.

RAMAGE, G. TOMSETT, K., WICKES, B. L., LÓPEZ-RIBOT, J.L., REDDING, S. W. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** v. 98, p. 53-59, 2004.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-RIBOT, J. *Candida* Biofilms: an Update . **Eukariotic Cell**. v.4, n.4, p. 633-638, 2005.

RIBEIRO, D.G.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N. MIMA, E.G.O. MACHADO, A.L.; BAGNATO, V.S; VERGANI, C.E. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. **Lasers Med. Sci.** v. 27, n. 1, p. 161-168, 2011.

SALERNO, C.; PASCALE, M.; CONTALDO, M.; ESPOSITO, V.; BUSCIOLANO, M.; MILILLO, L.; GUIDA, A.; PETRUZZI, M.; SERPICO, R. *Candida*-associated denture stomatitis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 16, n. 2, p. 139-43, 2011.

SALONEN, M.A.M; RAUSTIA, A.M.; OIKARINEN, K.S. Effect of treatment of palatal inflammatory papillary hyperplasia with local and systemic antifungal agents accompanied by renewal of complete dentures. **Acta Odontol Scand**. v. 54, p. 87-91, 1996.

SAMARANAYAKE, L.P., MCCOURTIE, J., MACFARLANE, T.W. Factors affecting the in vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. **Arch Oral Biol**. v. 25, n.8-9, p. 611-615, 1980.

SANKAR, V.; HEARNDEN, V.; HULL, K.; VIDOVIC-JURAS, D; GREENBERG, M.S.; KERR, A.R.; LOCKHART, P.B.; PATTON, L.L.; PORTER, S.; THORNHILL, M. Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. **Oral Diseases**. v.17, n.1, p. 73-84, 2011.

SANTOS, C.M., HILGERT, J.B., PADILHA, D.M.P., HUGO, F.N. Denture stomatitis and its risk indicators in south Brazilian older adults. **Gerodontology**. v. 27, n. 2, p.134-40, 2010.

SANTOS, V.R., GOMES, R.T., MESQUITA, R.A., MOURA, M.D., FRANCA, E.C., AGUIAR, E.G., NAVES, M.D., ABREU, J.A., ABREU, S.R. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. **Phytother Res**. v. 22, n. 11, p. 1544-1547, 2008.

SCHULZ, K.F., ALTMAN, D. G., MOHER, D. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **BMJ**, v. 340, p. 698-702, 2010.

SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.; SAMARAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**. v. 14, p. 582-590, 2008.

SILVA, W.J.; JAYAMPATH, S.; SAMARANAYAKE, L.P. CURY, A.A.D.B. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 94B, n.1, p.149-56, 2010.

SILVA, C.H.L.; PARANHOS, H.F.O.; ITO, I.Y. Biofilm disclosing agents in complete denture: clinical and antimicrobial evaluation. **Pesqui Odontol Bras.** v. 16, n. 3, p. 270-275, 2002.

SOUZA, S. C., JUNQUEIRA, J. C., BALDUCCI, I., KOGA-ITO, C. Y., MUNIN, E., JORGE, A. O. C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **J Photochem Photobiol B Biol.** v. 83, p. 34-38, 2006.

SUZUKI, L.C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica. 2009. **Dissertação** (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares. São Paulo, 2009.

SUZUKI, L.C., PRATES, R.A. RAELE, M.P, FREITAS, A.Z., RIBEIRO, M. S. Real time optical coherence tomography monitoring of *Candida albicans* biofilm *in vitro* during photodynamic treatment. **Proceedings - SPIE**, v. 7715, p. 7715241-5, 2010.

TARDIVO, J. P., DEL GIGLIO, A., OLIVEIRA, C. S., GABRIELLI, D. S., JUNQUEIRA, H. C., TADA, D. B., SEVERINO, D., TURCHIELLO, R. F., BATISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 2, p. 175-191, 2005.

TAVARES, A.; CARVALHO, C.M.B.; FAUSTINO, M.A.; NEVES, M.G.P.M.S; TOMÉ, J.P.C.; TOMÉ, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; CUNHA, A.; GOMES, N.C.M.; ALVES, E.; ALMEIDA, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. **Mar. Drugs**, v. 8, p 91-105, 2010.

TEICHERT, M. C., JONES, J. W. USACHEVA, M. N. BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** v. 93, n.2, p.155-160, 2002.

ULUDAMAR, A.; OSYESIL, A.G.; OZKAN, Y.K. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. **Gerodontology**. v.28, p.104-110, 2011.

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P.; HARTY, D.W.S.; KNOX, K.W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by Candida species. **Australian Dental Journal**. v. 43, n.3, p.160-6, 1998.

ZOMORODIAN, K.; HAGHIGHI, N.N.; RAJAEI, N.; PAKSHIR, K.; TARAZOOIE, B.; VOJDANI, M.; SEDAGHAT, F.; VOSOGHI, M. Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Medical Mycology**, v. 49, p.208-211, 2011.

Anexo 1

Governo do Estado do Tocantins FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO TOCANTINS	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO		PROCESSO Nº <u>90</u>
PROJETO DE PESQUISA	X	
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO		

O parecer consubstanciado do relator será utilizado como subsídio para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins elaborar seu parecer final.

1 – Identificação da Proposta de Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso

Título: Terapia Fotodinâmica como alternativa de tratamento da Candidíase Bucal associada à estomatite protética
Coordenador do Projeto ou Professor Orientador do TCC: Martha Marques Ferreira Vieira
Aluno(a) Participante (TCC): André Machado de Senna
INSTITUIÇÃO: Fundação de Medicina Tropical

2 – Análise do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso

O projeto tem grande relevância científica, visto apresentar proposta de tratamento para candidíase bucal, com método que busca tanto a eficácia do tratamento bem tem o benefício de não ter os efeitos colaterais provocados pelo uso de medicações indicadas na terapia convencional. Ainda vemos a importância do monitoramento profissional na terapia, por ser realizada em consultório odontológico, com a garantia de ser executada adequadamente, o que não se pode obter quando da terapia medicamentosa realizada pelo próprio paciente.

2.1 – Objetivos e Adequação metodológica (Verificar a exequibilidade da proposta, isto é, se existe clareza do objeto, compatibilidade entre os objetivos, a fundamentação teórica e a metodologia ou plano de ação, evidenciando consistência entre objetivos, procedimentos, ações de execução da pesquisa e capacidade do proponente, demonstrada por outros trabalhos similares.)

Os objetivos gerais e específicos são claro, coerentes com o propósito da pesquisa, exequível dentro do plano proposto. A fundamentação teórica é adequada. A metodologia será ensaios in vitro de protótipos de prótese dentária submetidos ao azul de metileno para avaliação da terapia proposta e ensaios clínicos com 2 grupo de 15 pacientes cada, diagnosticados com estomatite protética. A infra-estrutura apresentada para desenvolvimento dos trabalhos propostos para efetivação da pesquisa é adequada e satisfatória. O pesquisador e orientador demonstram em seus currículos capacidade e condições de planejamento para execução do projeto. Os dados serão apresentados para tese de doutorado e o cronograma de atividade satisfatório.

2.2 – Avaliação do Questionário a ser aplicado e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

O TCLE obedece as normas do CONEP, possui linguagem clara, compreensível, relatando o propósito da pesquisa, evidenciando os benefícios concedidos ao sujeito da pesquisa, bem como os riscos a que estarão expostos, mesmo estes sendo mínimos. É facultado ao Sujeito a desistência de sua participação no projeto, sendo de responsabilidade do pesquisador, o atendimento as ocorrência de problemas advindos da pesquisa, tratamento dado as informações e materiais de estudo

2.3 – Revisão Bibliográfica

Satisfatória.

3 – Qualificação do Pesquisador/Orientador (Indicar os atributos do Pesquisador/Orientador, salientando a titulação e experiência compatível com a função de orientação; qualidade e regularidade da produção científica/tecnológica/artística, compatível com o projeto de pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

A orientadora possui graduação compatível com as atividades propostas na pesquisa, demonstra em seu currículos capacidade para execução do projeto, tendo varias publicações relatadas.

4 – Parecer conclusivo, recomendações e/ou sugestões:

Aprovado.

5 – Pendências: (Enumerar sucintamente as pendências a serem sanadas pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

Não consta

6 – Parecer Consubstanciado

Aprovado ☒ Aprovado com recomendações ☐ Pendências ☐ Não aprovado ☐

Assinatura do Coordenador do CEP:

fulapalm

Data da reunião:

12 / 06 / 2007