

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CAROLINA YOSHI CAMPOS SUGIO

**Resposta tecidual em modelo animal de condicionador de tecido  
contendo complexo de inclusão antifúngico:β-ciclodextrina para  
tratamento de estomatite protética**

BAURU  
2020



CAROLINA YOSHI CAMPOS SUGIO

**Resposta tecidual em modelo animal de condicionador de tecido  
contendo complexo de inclusão antifúngico:β-ciclodextrina para  
tratamento de estomatite protética**

Dissertação constituída por artigo apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral.

Orientador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

BAURU

2020

Sugio, Carolina Yoshi Campos Sugio

Resposta tecidual em modelo animal de condicionador de tecido contendo complexo de inclusão antifúngico:  $\beta$ -ciclodextrina para tratamento de estomatite protética

104 p. : il. ; 31 cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

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

Assinatura:

Data:

## FOLHA DE APROVAÇÃO



---

---

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meu pais, Laura e Sugio, pois ofereceram todo apoio e suporte para que, em tempos de crise, eu conseguisse me dedicar integralmente ao mestrado e obtenção deste título.

---

---





---

---

*“e o enchi do Espírito de Deus, de habilidade, de inteligência e de conhecimento, em todo artifício,”*

*Êxodo 31:3*

---

---



---

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, porque permite que eu alcance todos os lugares que eu desejo e sempre me abençoou em todos os meus caminhos, com prosperidade, honra e graça.

À minha família pelo infindável apoio, por se alegrar quando me alegro, chorar quando eu choro, celebrar quando eu celebro. Meus pais, irmãos, avós, tios, tias, meu muito obrigada pela família unida que somos.

A todos os meus professores que contribuíram para cada degrau do conhecimento desde o jardim de infância, até a pós-graduação.

Agradeço à Profa. Dra. Simone Soares pelas oportunidades na Prática Profissionalizante em Prótese Dentária em 2017. Também ao Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro por não medir esforços e permitir que eu participasse das atividades de Pós-Graduação no ano de 2017, como aluna especial. Sou muito grata por essa oportunidade e pelos muitos aprendizados que adquiri na Clínica de Reabilitação Oral e seminários coordenados por ele.

A todos os meus colegas de Pós-graduação da turma Reabilitação 2018-2020 e a todos os veteranos do departamento, em especial à Andréa, Oscar, Cindy, Janaína, Patrick, Ana Paula, Milena e Clara pela troca de conhecimentos e materiais, além de dicas que muito contribuíram para meu crescimento intelectual. A pós-graduação é um meio de verdadeiramente aprender um com o outro e entender que juntos podemos alcançar o topo mais rápido.

Agradeço toda equipe da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial à Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban e seu orientados Gustavo e Thaís pela parceria, amizade, além da grande contribuição intelectual e metodológica para essa pesquisa. Meu muito obrigada por tanto conhecimento. Profa Vanessa, Prof. César e Matheus, sou sempre grata por me receber na casa de vocês com tanta humildade e respeito.

---

---



---

---

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru, em especial ao Prof. Dr. Gustavo Galert, Profa. Dra. Vanessa Lara, às funcionárias Paty, Dani, Tê, Fatiminha e Marina, todos os alunos da histologia, em especial, Rodrigo, Rafa e Ever. Todas essas pessoas foram fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa, tanto de forma intelectual quanto por sempre me receberem bem em seus departamentos. O ambiente sempre foi bom e todos sempre prontos a me auxiliarem neste trabalho. Agradeço, em especial, a Tânia Cestari, que muito me ensinou e ajudou neste trabalho de maneira perfeccionista, detalhista e competente.

Ao Departamento de Prótese e Periodontia, docentes e funcionários, pelo bom convívio durante esses anos e por contribuírem para meu crescimento profissional. Prof. Dr. Accácio Lins do Valle, Profa. Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Estevam Augusto Bonfante, Prof. Dr. Gerson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Prof. Dra. Lucimar Falavinha, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, Prof. Dr. Renato de Freitas, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Soares, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto e Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela, Cleidinha e Déborah, meu muito obrigada.

Agradeço também ao Prof. Dr. Heitor Honório e ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris pela ajuda nos parâmetros estatísticos dessa pesquisa e por dividirem esse conhecimento a nós durante minha pós-graduação.

À funcionária Hebinha por ser como é, autêntica e sempre bem disposta no ambiente de trabalho. Agradeço também a todos os pacientes que tive o privilégio de atender na Clínica de Pós-graduação dessa Universidade.

Agradeço aos meus amigos de graduação que permaneceram nesse caminho acadêmico comigo mantendo as parcerias e amizade: Victor Mosquim, Mariele Vertuan e Gerson Foratori. Obrigada também à Profa. Dra. Linda Wang pela confiança sempre em mim depositada, toda ajuda, conhecimento e exemplo.

Eterna gratidão à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo por tantas oportunidades que me ofereceu e tive o prazer de aceitar. Agradeço ao Diretor Carlos Ferreira dos Santos como representante dessa amada casa por defender a ciência e manter o alto padrão da nossa Instituição.

---

---



---

---

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro por meio do auxílio bolsa no país sob processo 2017-22996-1, auxílios de pesquisa regular sob processos 2017/07314-1 e 2018/20316-6, além do temático 2015/03965-2. Por isso também agradeço a parceria no auxílio financeiro desta pesquisa à Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira e ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

Ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP), do Programa de Excelência Acadêmica da CAPES (PROEX) pelo auxílio financeiro.

**Obrigada!**

---

---





---

---

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Meu agradecimento especial vai para o meu time Nepp, que desde a minha graduação me acolheu, acreditou no meu potencial e tenho a honra de dizer que faço parte dessa equipe. Juliana Hotta, Janaína Gomes Maciel, Andréa Lemos Falcão Procópio, Cindy Ruiz Garcia, Anna Clara Gurgel Gomes e Amanda Aparecida Maia Neves Garcia, minhas contemporâneas nesse time, obrigada pela verdadeira parceria, ajuda, amizade e companheirismo. O grande diferencial dessa equipe é que não há competição, não há melhores ou piores, há um verdadeiro time em que o grande foco é avançar, sem preguiça, sem medo e sem individualidade. Sou muito grata a Deus, porque Ele me inseriu no melhor que a FOB pode me oferecer: o time Nepp. Meninas, sou eternamente agradecida a cada uma de vocês, por me fazerem crescer e saber que, para isso, é com a ajuda de todas.

Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek, a Nepp mentora de todo esse sucesso, nosso time tem sua cara. A cada dia sob sua orientação aprendemos não apenas cientificamente, os detalhes de como ter uma escrita perfeita, mas também como ser gentil, empática, humilde e amiga. A senhora não faz nada se não for dar o seu melhor e é referência para nós alunos de Pós-graduação, uma inspiração como docente. Obrigada por sempre fazer mais que sua função em qualquer papel que se propõe a assumir e tratar com muito respeito a todos, independente da hierarquia. GRATIDÃO (pra elas).

---

---



# RESUMO

---

---



---

---

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar em modelo animal a resposta tecidual após indução de estomatite protética (EP) na mucosa palatina de ratos, com posterior tratamento por meio de dispositivos intraorais (DIOs) reembasados com condicionador tecidual modificado pelas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) ao biofilme de *Candida albicans* de fármacos em suas formas puras ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina. Ratos machos Wistar (N=37) foram divididos em oito grupos experimentais: Cn (controle negativo, sem EP), De (uso de DIO estéril, sem EP), EP (controle positivo, com EP, uso de DIO), Soft (com EP, uso do DIO com condicionador tecidual Softone, sem fármaco), Clx (com EP, tratados com DIO reembasado com Softone modificado pela CIM de clorexidina), Nis (com EP, tratados com DIO reembasado com Softone modificado pela CIM de nistatina), Clx: $\beta$ CD (com EP, tratados com DIO reembasado com Softone modificado pela CIM de clorexidina: $\beta$ -ciclodextrina), and Nis: $\beta$ CD (com EP, tratados com DIO reembasado com Softone modificado pela CIM do complexo de inclusão nistatina: $\beta$ -ciclodextrina). Após a indução (ou não- Cn) de EP com o uso por 4 dias de DIOs contaminados com *C. albicans*, os ratos tiveram seus DIOs reembasados ou não com Softone sem ou com as CIMs de Nis ou Clx em suas formas puras ou complexadas. Após 2 dias, os animais foram eutanasiados e a região palatina entre molares foi submetida às seguintes análises: morfohistopatológica qualitativa descritiva e ordinal por escores e histométrica por planimetria computadorizada. As variáveis foram correlacionadas estatisticamente utilizando o teste de Correlação de Pearson. Os resultados evidenciaram que os Grupos Cn e De foram histopatologicamente semelhantes entre si, apresentando tecido epitelial sem qualquer alteração. No Grupo EP, houve modificações epiteliais compatíveis com o quadro da doença, tanto na análise morfohistopatológica, quanto na histométrica por planimetria computadorizada. Em relação às diferentes formas de tratamento testadas, o Grupo Soft se apresentou histopatologicamente similar ao Grupo EP, sugerindo persistência da inflamação. Nos grupos testados com a incorporação de fármacos (Clx, Nis, Clx: $\beta$ CD e Nis: $\beta$ CD), todas as amostras mostraram diminuição da inflamação tecidual ou recuperação histopatológica completa dos tecidos, evidenciando um epitélio compatível com o sadio. O teste de Correlação de Pearson revelou, na maioria das vezes, relação linear

---

---



---

---

forte entre os escores atribuídos às amostras e as mensurações obtidas na análise histométria por planimetria computadorizada. Foi possível concluir que o tratamento da EP utilizando reembasamento dos DIOs com condicionador tecidual modificado pela incorporação das CIMs de antifúngicos em suas formas puras ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina mostrou recuperação tecidual nos aspectos histopatológicos do palato dos animais, podendo ser uma alternativa terapêutica promissora. No entanto, concentrações muito inferiores dos antifúngicos complexados foram necessárias para se obter o mesmo grau de resposta tecidual em relação aos fármacos puros, o que pode representar clinicamente menor potencial de toxicidade e efeitos adversos à saúde do paciente.

**Palavras-chave\*:** Ciclodextrinas; Clorexidina; Estomatite sob Prótese; Nistatina; Reembasadores de Dentadura; Toxicidade.

\* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): <http://decs.bvs.br/>

---

---





# ABSTRACT

---

---



---

---

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate in an animal model the tissue response after denture stomatitis (DS) induction in the palatal mucosa of rats, with subsequent treatment using intraoral devices (IODs) relined with tissue conditioner modified by minimal inhibitory concentrations (MICs) to the *Candida albicans* biofilm of drugs in their pure or complexed forms with  $\beta$ -cyclodextrin. Male Wistar rats (N = 37) were divided into eight experimental groups: Nc (negative control, without EP), Sd (use of sterile DIO, without EP), DS (positive control, with DS, use of IOD), Soft (with DS, use of IOD relined with tissue conditioner Softone, without drug), Chx (with EP, treated with IOD relined with Softone modified by the MIC of chlorhexidine), Nys (with DS, treated with IOD relined with Softone modified by the MIC of nystatin), Chx: $\beta$ CD (with DS, treated with IOD relined with Softone modified by the MIC of chlorhexidine: $\beta$ -cyclodextrin) and Nys: $\beta$ CD (with EP, treated with IOD relined with Softone modified by the MIC of the nystatin inclusion complex Nys: $\beta$ -cyclodextrin). After induction (or not - Nc) of DS with the use for 4 days of DIOs contaminated with *C. albicans*, the rats had their IODs relined or not with Softone without or with the MICs of Nys or Chx in their free or complexed forms. After 2 days, the animals were euthanized and the palatal region between molars was subjected to the following analyzes: descriptive morphohistopathological and ordinal scores, and histometric by computerized planimetry. The variables were statistically correlated using the Pearson's Correlation test. The results showed that Groups Nc and Sd were histopathologically similar to each other, displaying epithelial tissue without any alteration. In Group DS, there were epithelial changes compatible with the disease, both in morphohistopathological and histometric analysis using computerized planimetry. In relation to the different forms of treatment tested, Group Soft presented similar histopathological findings to Group DS, which suggested persistence of inflammation. In the other groups tested with the drug incorporation (Chx, Nys, Chx: $\beta$ CD, and Nys: $\beta$ CD), all samples showed a decrease in tissue inflammation or complete histopathological recovery of the tissues, with an epithelium compatible with the healthy one. Pearson's Correlation test showed, in most cases, a strong linear relation between the scores attributed to the samples and the measurements obtained in the histometric analysis by computerized planimetry. It was possible to conclude that the treatment from the relining of IODs with tissue conditioner

---

---



---

---

modified by the incorporation of MICs of antifungals in their pure or complexed forms with  $\beta$ -cyclodextrin showed tissue recovery in the histopathological aspects of the animals' palate, which can be a promising therapeutic alternative. However, much lower concentrations of complexed antifungals were necessary to obtain the same degree of tissue response compared to pure drugs, which may represent clinically less potential for toxicity and adverse effects on the patient's health.

**Key-words\*:** Chlorhexidine; Cyclodextrins; Denture Liners; Nystatin; Stomatitis, Denture; Toxicity.

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

---

---



---

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Moldagem, vazamento e enceramento dos modelos de trabalho. A: Moldagem de trabalho; B: Molde e C: Modelo de trabalho; D: Enceramento; E: Conferência da espessura da cera..... 44
- Figura 2 - Inclusão em mufla e polimerização dos dispositivos acrílicos. A: Modelo de trabalho encerado incluído em mufla; B: Muralha de silicóna; C: Modelo de trabalho em mufla após a eliminação da cera; D: DIO removido da mufla..... 44
- Figura 3 - Acabamento e planificação dos dispositivos. A: Acabamento do dispositivo com broca minicut; B: Planificação e padronização da rugosidade da superfície externa com lixas d'água; C: Superfície externa do DIO; D: Superfície interna do DIO..... 44
- Figura 4 - Preparo do inóculo. A: Cepa descongelada; B: Crescimento fúngico em ágar YEPD; C: Transferência de uma colônia de *C. albicans* para 20 mL de caldo YEPD; D: Lavagem do pellet em PBS estéril; E: Inóculo..... 46
- Figura 5 - Placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose e o crescimento fúngico resultante das diluições seriadas..... 46
- Figura 6 - Dispositivos imersos no meio de cultura após período de formação de biofilme..... 47
- Figura 7 - Inoculação oral com *C. albicans* e cimentação dos DIOs nos palatos dos animais. A: Inoculação do palato dos animais; B: Condicionamento ácido dos molares superiores; C: Lavagem com jato de água; D: Secagem; D: Cimentação do DIO..... 48
- Figura 8 - A: Softone manipulado acrescentado na região palatina desgastada dos DIOs; B: DIO reembasado; C: Remoção dos excessos do material reembasador e alívio na região dos molares; D: Aspecto final do DIO após reembasamento e alívio para cimentação; E: DIO cimentado..... 49
- Figura 9 - A: Softone manipulado acrescentado na região palatina desgastada dos DIOs; B: DIO reembasado; C: Remoção dos excessos do material reembasador e alívio na região dos molares; D: Aspecto final do DIO após reembasamento e alívio para cimentação; E: DIO cimentado..... 49
- Figura 10 - Delimitação esquemática da área de interesse (AI)- palato duro de mesial dos primeiros molares até a distal dos terceiros molares ..... 49
- Figura 11 - Fluxograma dos grupos estudados..... 55
- 
-





- 
- Figura 12 - Consumo médio diário de água (mL) pelos animais dos diferentes grupos avaliados. .... 56
- Figura 13 - Acompanhamento do peso (g) dos animais ao longo do experimento. .... 57
- Figura 14 - Quadro histopatológico das amostras dos grupos testados. **Grupo Cn (A) e De (B e C)- Escore 1:** epitélio estratificado pavimentoso com espessa e contínua camada queratinizada (seta amarela) acima da camada granulosa (seta azul), exceto na amostra da imagem C (camada córnea reduzida); camada basal com papilas epiteliais rasas e camada basal intacta (seta vermelha) adjacente à lâmina própria (LP). **Grupo EP (D, E e F)- Escore 2 (D):** redução da camada córnea (seta amarela) e aumento das células inflamatórias (área circundada em amarelo) na LP; **Escore 4 (E):** paraqueratose (seta verde), hiperplasia com projeções epiteliais longas (seta vermelha), pontas de papilas expostas na superfície (seta preta) e células inflamatórias (área circundada em amarelo); **Escore 5 (F):** Acantose, alongamento desorganizado das projeções epiteliais (seta vermelha) entre as papilas dérmicas, paraqueratose (seta verde), ausência da camada granulosa e densa LP. **Grupo Soft (G,H)- Escore 2 (G):** papilas epiteliais rasas com células inflamatórias na LP e no tecido epitelial (área circundada em amarelo); **Escore 5 (H):** Paraqueratose, acantose e alongamento desorganizado das projeções das epiteliais (seta vermelha) entre as papilas dérmicas. HE, 10× e 40× ..... 61
- Figura 14 - Quadro histopatológico das amostras dos grupos testados. **Grupo Nis (I, J, K, L)- Escore 1 (I):** camada queratinizada espessa e contínua (seta amarela) acima da camada granulosa (seta azul) e camada basal com papilas epiteliais rasas (seta vermelha); **Escore 2 (J):** aumento desorganizado das projeções epiteliais (seta vermelha), espessamento das papilas dérmicas e da lâmina própria (LP); **Escore 3 (K):** fina camada córnea (seta amarela) adjacente a granulosa (seta azul) e projeções epiteliais alongadas e desorganizadas (seta vermelha) com células inflamatórias (área circundada em amarelo); **Escore 4 (L):** fina camada córnea paraqueratinizada (seta amarela), ausência da camada granulosa, desorganização e destruição das projeções epiteliais (seta vermelha) invadidas por células inflamatórias (área circundada em amarelo) advindas das papilas dérmicas. **Grupo Clx (M e N)- Escore 1 (M):** camada queratinizada espessa e contínua (seta amarela) adjacente a camada granulosa (seta azul), projeções epiteliais (seta vermelha) e papilas dérmicas rasas; **Escore 2 (N):** perda parcial da camada queratinizada (seta amarela) adjacente à camada granulosa (seta azul) e leve aumento das projeções
-



- 
- 
- epiteliais (seta vermelha) com presença de células inflamatórias (área circundada em amarelo). HE, 10× e 40× ..... 62
- Figura 14 - Quadro histopatológico das amostras dos grupos testados. **Grupo Clx- Escore 3 (O):** paraqueratose (seta amarela), hiperplasia epitelial com projeções longas e desorganizadas (seta vermelha) invadidas por células inflamatórias provenientes das papilas dérmicas (área circundada em amarelo). **Grupo Nis:βCD (P e Q)- Escore 1 (P):** camada córnea espessa (seta amarela) e raras células inflamatórias (área circundada em amarelo); **Escore 3 (Q):** paraqueratose (seta amarela), hiperplasia com projeções epiteliais longas e desorganizadas e células inflamatórias nas papilas dérmicas (área circundada em amarelo). **Grupo Clx:βCD (R, S e T)- Escore 1 (R):** camada queratinizada espessa (seta amarela) acima da camada granulosa (seta azul); camada basal com papilas epiteliais rasas (seta vermelha) adjacente à lamina própria (LP) formada por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas; **Escore 2 (S e T):** camada córnea espessa paraqueratinizada (seta amarela, camada granulosa reduzida (seta azul) e projeções epiteliais (setas vermelhas) com raras células inflamatórias (área circundada em amarelo). HE, 10× e 40× ..... 63
- Figura 15 - Imagens representativas do palato dos animais ao final do experimento nos diferentes grupos testados: A: Cn; B: De, C: EP; D: Soft; E: Clx; F: Nis; G: Clx:βCD; H: Nis:βCD..... 64
- Figura 16 - Gráficos representativos das análises histopatológicas quantitativas a partir das imagens do epitélio do palato dos Grupos estudados. A: Comprimento; B: Espessura; C: Área. .... 66
- Figura 17 - Gráficos da correlação de Pearson entre os escores da análise morfohistológica e as mensurações da planimetria computadorizada na camada queratinizada (A, B e C), compartimento da camada celular (A', B' e C') e relação entre ambos (A'', B'' e C'') referentes às variáveis comprimento (A, A' e A''), espessura (B, B' e B'') e área (C, C' e C''). ..... 67
- 
-



---

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de estudo avaliados neste estudo .....	40
--	----



---

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	Animais de experimentação.....	39
3.2	Materiais .....	42
3.3	Obtenção dos dispositivos intraorais (DIOs).....	42
3.4	Obtenção do inóculo de <i>C. albicans</i> .....	44
3.5	Contaminação dos DIOs.....	46
3.6	Inoculação oral de <i>C. albicans</i> e cimentação dos DIOs nos molares superiores dos animais.....	47
3.7	Reembasamento dos DIOs nos palatos dos animais .....	48
3.8	Obtenção e processamento das amostras histológicas.....	49
3.9	Monitoramento da saúde dos animais .....	50
3.10	Avaliação da resposta tecidual .....	50
3.10.1	Análise morfohistopatológica .....	50
3.10.2	Análise histométrica por planimetria computadorizada.....	51
3.11	Forma de análise dos resultados.....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
4.1	Triagem dos Animais .....	55
4.2	Monitoramento dos Animais .....	55
4.3	Avaliação da Resposta Tecidual.....	57
4.3.1	Análise morfohistopatológica .....	57
4.3.2	Análise histométrica por planimetria computadorizada.....	66
4.3.3	Correlação entre as análises morfohistopatológica e histométrica por planimetria computadorizada.....	67
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>

---

---





# **1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA**

---

---



## 1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A estomatite protética, considerada a forma mais comum de candidose oral, tem sido relatada em até 88% dos portadores de próteses removíveis (BARBEAU *et al.*, 2003; BARNABÉ *et al.*, 2004; RAMAGE *et al.*, 2004; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005; FIGUEIRAL *et al.*, 2007; GENDREAU; LOEWY, 2011; SALERNO *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-SERRANO *et al.*, 2016; MOOSAZADEH *et al.*, 2016; AOUN; BERBERI, 2017; RIVERA; DROGUETT; ARENAS-MÁRQUEZ, 2017; KANSKY *et al.*, 2018). Embora tenha sua etiologia reconhecida como multifatorial, a infecção por *Candida* tem sido apontada como o principal fator associado à essa doença, atingindo aproximadamente 93% dos indivíduos com sinais clínicos de inflamação e eritema nos tecidos de suporte da prótese (BAENA-MONROY *et al.*, 2005). *C. albicans* é a espécie predominante na estomatite protética, identificada em 50 a 98% dos casos (BAENA-MONROY *et al.*, 2005; AOUN *et al.*, 2016; YARBOROUGH *et al.*, 2016). Por conseguinte, são relevantes os fatores etiológicos locais e sistêmicos relacionados com a capacidade de adesão e proliferação de *Candida* spp. nos tecidos bucais do paciente, que podem levar ao desenvolvimento dessa doença quando as condições do ambiente bucal se tornam favoráveis, e também quando os fatores sistêmicos levam a uma diminuição dos mecanismos de defesa do organismo (BILHAN *et al.*, 2009; SALERNO *et al.*, 2011). Dos fatores locais associados às próteses acrílicas removíveis, destacam-se seu uso contínuo (NEPPELENBROEK *et al.*, 2008), o trauma local causado por elas, sobretudo as antigas e mal adaptadas, com instabilidade oclusal e dimensão vertical reduzida (GENDREAU, LOEWY, 2011), a presença de biofilme protético (PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008), a xerostomia (SHIP; PILLEMER; BAUM, 2002) e a alteração do pH da saliva (FIGUEIRAL *et al.*, 2007).

Apesar de envolver fatores predisponentes locais e sistêmicos, a colonização da base protética pelas espécies de *Candida*, em especial *C. albicans*, são fatores determinantes na formação de um biofilme com potencial patogênico (FIGUEIRAL *et al.* 2007; SUGIO *et al.*, 2020). Para isso, primeiramente ocorre a adesão das células fúngicas em forma de leveduras na superfície acrílica com coagregação de adesinas, células epiteliais e microbianas, além de resíduos de carboidratos alimentares. Como consequência, ocorre a colonização, onde há proliferação celular, o que facilita a

---

maturação desse biofilme protético, considerado até então inofensivo. Se não removido, o biofilme se torna maduro, podendo conter formas patogênicas de *Candida*, capazes de não só se aderir às superfícies, mas também com propriedades de invasão tecidual, o que pode culminar no processo infeccioso conhecido como estomatite protética (CANNON *et al.*, 1995; FIGUEIRAL *et al.* 2007; SUGIO *et al.*, 2020).

Devido à etiologia multifatorial, os tratamentos direcionados à estomatite protética podem abranger terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, substituição de próteses antigas, eliminação de irregularidades anatômicas, restabelecimento de oclusão não traumática, restituição nutricional e remoção das próteses no período noturno (NEPPELENBROEK *et al.*, 2008; SRINIVASAN; GULABANI, 2010). Os cuidados direcionados à saúde bucal e geral do indivíduo bem como aqueles relacionadas às próteses funcionam não apenas como medidas terapêuticas para a lesão, mas também para sua prevenção ao atuar diretamente na formação e maturação do biofilme protético (CANNON *et al.*, 1995; FIGUEIRAL *et al.*, 2007; NEPPELENBROEK *et al.*, 2008; SUGIO *et al.*, 2020).

Apesar dos fármacos antifúngicos serem eficazes no alívio dos sinais e sintomas da estomatite associada à *Candida* spp., é comumente observado um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após a suspensão do tratamento (RAMAGE *et al.*, 2004; NEPPELENBROEK *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016; OHSHIMA *et al.*, 2018). Essa reincidência tem sido atribuída à concentração insuficiente dos fármacos tópicos e sistêmicos na superfície protética que mantém contato com os tecidos bucais, em razão da formação do complexo biofilme microbiano em profundidade na resina acrílica (PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008; SALERNO *et al.*, 2011). No caso dos antifúngicos sistêmicos, o fármaco administrado não atinge a mucosa palatina em concentrações suficientes contra *Candida* (CROSS *et al.*, 2004; FIGUEIRAL *et al.*, 2015). A falha da terapia antifúngica também pode estar associada à posologia rigorosa (SCHNEID, 1992), custos com medicamento, efeitos adversos (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994) e, no caso dos agentes tópicos, sabor desagradável e rápida dissolução do fármaco pela ação do fluxo salivar, dos movimentos da língua e da deglutição (BANTING; HILL, 2001). Tais falhas podem levar à resistência dos microrganismos aos mecanismos de defesa das células

---

epiteliais e aos agentes antifúngicos (CHANDRA *et al.*, 2001; MAH; O'TOOLE, 2001; RAMAGE *et al.*, 2004). A resistência microbiana fortalece ainda mais a maturação do biofilme (MAH; O'TOOLE, 2001), favorecendo a recorrência da doença (TUMBARELLO *et al.*, 2012).

Nesse sentido, protocolos de desinfecção são de fundamental importância na prevenção e no tratamento da estomatite protética. No entanto, desvantagens são relatadas em relação ao uso prolongado de soluções desinfetantes, como alteração de cor da resina acrílica (PARANHOS *et al.*, 2014), gosto residual desagradável (LALLA *et al.*, 2010), alterações nas propriedades físicas e mecânicas de dentes artificiais (CAMPANHA *et al.*, 2012; PISANI *et al.*, 2012), além de maior tempo requerido no protocolo de desinfecção. Por outro lado, a atuação exclusiva na eliminação do biofilme protético durante o tratamento da estomatite protética pode levar a falha na terapia, uma vez que são requeridas abordagens múltiplas. A comparação clínica da administração de fluconazol, fluconazol associado à imersão em Clx ou apenas a confecção de novas próteses mostrou que essa última abordagem apresentou resultados menos satisfatórios no tratamento da doença em relação àquelas que utilizaram o agente antifúngico (KULAK; ARIKAN; DELIBALTA, 1994). Tais resultados apoiam a premissa que novas bases protéticas não conseguem atuar de forma efetiva no tecido epitelial infectado pelas estruturas miceliais de *Candida* (KULAK; ARIKAN; DELIBALTA, 1994; SALONEN; RAUSTIA; OIKARINEN, 1996). Isso pode explicar o motivo pelo qual os protocolos de higiene das próteses não devem ser empregados como método único de tratamento da estomatite protética, mas sim participarem de forma preventiva ou coadjuvante à terapia antifúngica.

Outra forma de atuar sobre o biofilme protético e contribuir com o tratamento para estomatite protética é suprimir o contato da base acrílica contaminada com os tecidos infectados, rompendo o ciclo da reinfecção via prótese. Isso é possível com os procedimentos de reembasamento das bases protéticas, sobretudo com materiais macios à base de acrílico, como os condicionadores de tecido e reembasadores macios de curta duração (DAVENPORT, 1972; MARÍN ZULUAGA *et al.*, 2011; OHSHIMA *et al.*, 2018). Esses materiais eliminam o trauma causado pelo biofilme protético e, por sua maciez, são capazes de promover a recuperação dos tecidos injuriados, proporcionando maior conforto ao paciente (MCCABE; CARRICK; KAMOHARA, 2002). No entanto, são considerados temporários, pois perdem

---

rapidamente suas propriedades viscoelásticas a partir da liberação de álcool e de plastificantes para o meio bucal e soluções de imersão (HONG *et al.*, 2012). Dessa forma, tornam-se facilmente porosos e suscetíveis à degradação superficial (SINGH *et al.*, 2010), favorecendo a aderência de *Candida*, o que pode acarretar no desenvolvimento da estomatite protética ou dificuldade no tratamento de infecções presentes (NEVZATOĞLU *et al.*, 2007). Ainda, os materiais macios para reembasamento de próteses removíveis são de difícil higienização por sua baixa resistência à escovação em relação às resinas acrílicas convencionais (MAINIERI *et al.*, 2011), além da incompatibilidade com soluções de limpeza, mesmo em curtos períodos de imersão (SUDHAPALLI; SUDHAPALLI, 2016).

A incorporação de agentes antimicrobianos/antifúngicos nos materiais macios temporários para base de prótese tem sido sugerida para prevenir o acúmulo de biofilme protético (SCHNEID, 1992; MATSUURA *et al.*, 1997) e inibir a colonização por *C. albicans* (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008, IQBAL *et al.*, 2016). É considerada como uma terapia em potencial para a estomatite protética, uma vez que os fármacos são liberados a partir da matriz polimérica modificada diretamente para os sítios infectados, mantendo-se em concentração efetiva por um período semelhante àquele do tratamento convencional com medicação antifúngica tópica (TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008; CHOPDE *et al.*, 2012, IQBAL *et al.*, 2016). Neste protocolo, além do efeito benéfico do reembasamento das próteses por meio da supressão do contato do biofilme protético com os tecidos injuriados, ocorre a ação terapêutica dos fármacos incorporados, com consequente prevenção de aderência microbiana (MATSUURA *et al.*, 1997; IQBAL *et al.*, 2016; OHSHIMA *et al.*, 2018). A aderência do paciente ao tratamento consiste apenas no uso da prótese reembasada, o que é especialmente vantajoso àqueles usuários idosos, institucionalizados e portadores de deficiências físicas e/ou mentais (TRUHLAR, SHAY, SOHNLE, 1994).

Ainda que apresentem as vantagens terapêuticas supracitadas, a adição de fármacos aos materiais macios temporários em concentrações comercialmente disponíveis pode afetar suas propriedades morfológicas, físicas e mecânicas (ADDY; HANDLEY, 1981; SCHNEID, 1992; URBAN *et al.*, 2006; URBAN *et al.*, 2009; ALCÂNTARA *et al.*, 2012; URBAN *et al.*, 2015). Na busca por concentrações antifúngicas compatíveis com as propriedades desses materiais, Bueno *et al.* (2015)

---

determinaram as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de cinco antifúngicos capazes de inativar a formação de biofilme de *C. albicans* em um condicionador de tecido (Softone) e um reembasador macio temporário (Trusoft) ao longo de sua vida útil. Foi observado que a adição de nistatina (Nis) e clorexidina (Clx) aos dois materiais foi efetiva em até duas semanas na inibição do crescimento de biofilme de *C. albicans*, exibindo os menores valores de CIMs em relação aos demais fármacos avaliados (BUENO *et al.*, 2017). Estudos sequenciais demonstraram que diversas propriedades físicas e mecânicas de ambos os materiais macios temporários não foram alteradas significativamente com a adição dos fármacos em suas CIMs para biofilme de *C. albicans* (LIMA *et al.*, 2016a; LIMA *et al.*, 2016b; SÁNCHEZ-ALIAGA *et al.*, 2016; BUENO *et al.*, 2017; NEPPELENBROEK *et al.*, 2018). Uma pesquisa anterior objetivou comparar a liberação de Nis e Clx em suas CIMs, quando incorporadas ao Softone e Trusoft durante 14 dias. Os resultados demonstraram que o condicionador de tecido Softone exibiu maior lixiviação para ambos os fármacos que o reembasador macio temporário Trusoft, sendo a Clx liberada em maior concentração em relação à Nis (SÁNCHEZ-ALIAGA, 2014). Apesar de todos resultados preliminares favoráveis, foi considerado que a liberação obtida a partir das matrizes poliméricas modificadas ainda era reduzida e poderia ser otimizada.

A Nis é um antifúngico poliênico ativo por membrana produzida pelas cepas de *Streptomyces noursei* e apresenta propriedades fungicidas e fungistáticas (SCHEIBLER *et al.*, 2018). Desde a sua descoberta, tem sido amplamente utilizada para candidoses orais em diversas apresentações como suspensões, cremes e pastilhas (AKPAN; MORGAN, 2002; WONG *et al.*, 2014), sendo considerado um medicamento de baixo custo. Por ser um polieno, a Nis se liga a um componente da membrana citoplasmática fúngica conhecido como ergosterol, levando a alterações em sua permeabilidade celular (AKPAN; MORGAN, 2002). Quando administrada via oral, a Nis é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, o que lhe confere baixa hepatotoxicidade e pouca interação medicamentosa (AKPAN; MORGAN, 2002; LYU *et al.*, 2016; SCHEIBLER *et al.*, 2018).

A Clx é um composto catiônico que forma sais de baixa solubilidade. Além de ser um conhecido antiséptico (AKPAN; MORGAN, 2002), também é agente antibacteriano de amplo espectro, que atua contra bactérias e fungos, incluindo *C. albicans* (PUSATERI; MONACO; EDGERTON, 2009; SCHEIBLER *et al.*, 2018).

---

Entretanto, sua capacidade de inibir o biofilme bucal foi descoberta somente em 1969 (SCHEIBLER *et al.*, 2018) e, atualmente, a Clx é também conhecida como alternativa no tratamento de candidose oral (SALIM *et al.*, 2012). Clinicamente, diferente do que ocorre com vários outros antifúngicos, não têm sido observadas cepas fúngicas resistentes à Clx (SALIM *et al.*, 2012). Tem a vantagem de ser pobremente absorvida pelo trato gastrointestinal, além de apresentar alta substantividade, ou seja, capacidade de permanecer em contato com os tecidos bucais, o que confere, sobretudo, um efeito duradouro após sua administração (SCHEIBLER *et al.*, 2018). Possui ainda a capacidade de se aderir às glicoproteínas salivares que compõem o biofilme, sendo liberada de maneira lenta e contínua (PUSATERI; MONACO; EDGERTON, 2009). Em relação ao seu mecanismo de ação, a Clx acarreta perda da integridade estrutural, seguida da fragmentação da parede das células de *Candida*. Também atua resultando em menor capacidade de adesão de bactérias e fungos nas superfícies (MACNEILL *et al.*, 1997; PUSATERI; MONACO; EDGERTON, 2009). No entanto, a Clx tem um custo menos acessível em relação à Nis, por exemplo, além de apresentar potencial efeito de manchamento de superfícies (AKPAN; MORGAN, 2002) e alteração no paladar (LALLA *et al.*, 2010)

Apesar dos benefícios da Nis, eficaz na inibição de *Candida* spp. e associada à rara detecção de cepas fúngicas resistentes (GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008) bem como das vantagens da Clx, antimicrobiano de largo espectro de ação e indicado nos casos de falha de terapia antifúngica convencional (RYALAT; DARWISH; AMIN, 2011), esses fármacos podem causar efeitos adversos como náusea, vômito, diarreia e dor estomacal nos tratamentos de candidoses bucais (AKPAN; MORGAN, 2002; SALIM *et al.*, 2012). Adicionalmente, apresentam baixa solubilidade em água e, mesmo que sua liberação ocorra diretamente para o local da infecção, é possível que resultem em certo grau de toxicidade e/ou interações fármaco-fármaco (SALIM *et al.*, 2012).

A toxicidade de um fármaco não está apenas associada à sua molécula, mas também à velocidade e extensão de sua absorção, que podem ser alteradas devido à sua lipofilia e, principalmente, pelo estado de ionização e/ou tamanho de sua partícula (AMIDON *et al.*, 1995). Nesse sentido, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas tem sido sugerida como uma estratégia para aumentar a solubilidade do fármaco, principal motivo dos problemas relacionados à sua reduzida

---



biodisponibilidade. Trata-se de uma nanoestrutura formada por uma molécula hospedeira, que agrupa internamente em sua cavidade outras moléculas químicas formando, assim, os chamados complexos de inclusão. Isso é possível pelo fato das ciclodextrinas apresentarem o formato de um cone truncado com característica interna hidrofóbica, permitindo que abriguem fármacos pouco solúveis (SHELLEY; BABU, 2018). Já sua cavidade externa é hidrofílica e, assim, o fármaco hospedeiro lipossolúvel é absorvido pela membrana apenas quando dissociado da ciclodextrina, o que confere ao complexo de inclusão a característica de baixa toxicidade (LACHOWICZ; STAŃCZAK; KOŁODZIEJCZYK, 2020).

A nanoestrutura do complexo de inclusão tem a capacidade de proteger e regular a taxa de liberação de moléculas de seu interior, além de controlar as interações celulares (LACHOWICZ; STAŃCZAK; KOŁODZIEJCZYK, 2020). Como consequência, a formulação possibilita a estabilidade e otimização da atividade antimicrobiana dos fármacos em um sistema de liberação controlada (RIBEIRO *et al.*, 2010; TONGLAIROUM *et al.*, 2014; MURA *et al.*, 2015; TONGLAIROUM *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2018; ALEXANDRINO *et al.*, 2019; TRAJANO *et al.*, 2020), o que é sobretudo vantajoso aos agentes pouco solúveis como a Nis e Clx, além da redução de efeitos farmacológicos adversos. Ainda como vantagem desse sistema, é relatado que os complexos de inclusão podem reduzir o odor e o sabor desagradáveis do fármaco, pois criam uma estrutura encapsulada em nível molecular (TONGLAIROUM *et al.*, 2014). Dentre as ciclodextrinas naturais, a  $\beta$ -ciclodextrina é a mais utilizada, uma vez que possui aproximadamente 6 Å de diâmetro em sua cavidade interna, acomodando, portanto, grupos aromáticos encontrados na maioria dos fármacos. Além disso, a  $\beta$ -ciclodextrina apresenta maior rigidez, facilidade de obtenção de cristais e se encontra em maior abundância no mercado (BALTE; GOYAL; GEJJI, 2012).

A liberação de fármacos complexados à  $\beta$ -ciclodextrina possibilita um efeito *burst*, de rápida liberação inicial (TONGLAIROUM *et al.*, 2014; TONGLAIROUM *et al.*, 2016; CONCEIÇÃO *et al.*, 2019) para atingir níveis terapêuticos desejáveis e, na sequência, uma liberação lenta, contínua e do tipo controlada até o final do tratamento, mantendo sua biodisponibilidade local (LACHOWICZ; STAŃCZAK; KOŁODZIEJCZYK, 2020). Por tais motivos, essa estratégia pode ser uma alternativa promissora para otimizar a ação dos fármacos pouco solúveis, mais ainda se

---

incorporados em matrizes poliméricas permeáveis como os materiais macios temporários, possibilitando a utilização de menores doses dos medicamentos.

Há poucos estudos na literatura com a proposta de associação dos complexos de inclusão a substâncias antifúngicas para tratamento ou prevenção da candidose bucal. Ribeiro *et al.* (2010) estudaram uma formulação em gel contendo miconazol e ciclodextrina. Segundo os autores, trata-se de uma estratégia que otimiza a ação antifúngica, pois exibiu aumento da solubilidade do miconazol, resultando em perfis adequados de liberação do fármaco *in vitro*. Tonglairoum *et al.* (2014) estudaram a eficiência do clotrimazol complexado à hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e observaram uma liberação rápida e eficiente contra as cepas de *Candida*, com baixa toxicidade da formulação. Em 2015, Mura *et al.* propuseram *in vitro* um tratamento para candidose bucal utilizando-se de um complexo de nitrato de econazol e éter sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina. Tal formulação resultou em sistema de liberação constante do fármaco, sendo eficiente contra *Candida*. Já em 2016, Tonglairoum *et al.* associaram ciclodextrina com óleo de ervas e concluíram que nessa nanoestrutura o extrato era liberado de maneira muito rápida, inibindo o crescimento de *Candida* em apenas alguns minutos após o contato. Nesse sentido, os autores sugeriram a proposta como uma forma benéfica para a prevenção e tratamento de estomatite protética. Até mesmo trióis com amplo espectro de ação utilizados como primeira escolha contra infecções fúngicas sistêmicas, como o voriconazol, têm sido estudados para otimizar sua atividade contra *C. albicans*. O principal objetivo desses estudos é melhorar a solubilidade em água desse fármaco, considerada moderada, que ainda apresenta um perfil farmacocinético não linear (VELOSO *et al.*, 2018).

Estudos prévios foram desenvolvidos para caracterizar a formação de complexos de inclusão entre a  $\beta$ -ciclodextrina e os antifúngicos Nis e Clx por meio de diversas técnicas (URBAN, 2016; SCHOEFFEL, 2016). Em tais investigações, complexos obtidos por liofilização nas proporções molares de 1:1 Nis: $\beta$ -ciclodextrina e 1:2 Clx: $\beta$ -ciclodextrina mostraram liberação rápida e melhor eficiência de dissolução em relação aos fármacos não complexados, exibindo cinética biexponencial de liberação (URBAN, 2016; SCHOEFFEL, 2016). Além disso, Morikava (2020) demonstrou que esses fármacos complexados, quando incorporados ao condicionador de tecido Softone, apresentaram menores valores de CIM para biofilme de *C. albicans* durante 14 dias de avaliação. Os resultados dessa pesquisa mostraram

---

que, quando complexados em suas CIMs para biofilme de *C. albicans* determinadas previamente por Bueno *et al.* (2015), as doses dos fármacos Nis e Clx foram reduzidas em 50% e 92,5%, respectivamente, em relação aos mesmos medicamentos em sua forma pura.

Os possíveis efeitos citotóxicos causados por metil metacrilato, dibutil ftalato e outras substâncias liberadas por materiais reembasadores macios de base acrílica, como os temporários, têm sido avaliados *in vitro* pelo método de cultura de fibroblastos de camundongos (OZDEMIR; YILMAZ; YILMAZ, 2009; CHAVES *et al.*, 2010; TAY *et al.*, 2012). Por apresentarem menor custo e maior facilidade de reprodução, tais pesquisas *in vitro*, previamente aos ensaios *in vivo*, são fundamentais. Entretanto, são consideradas restritas clinicamente, pois demonstram efeitos diretos sobre as células e não sobre os complexos tecidos bucais, além de não reproduzirem as condições dinâmicas do ambiente oral (CHAVES *et al.*, 2010). Ainda há pouca informação sobre as alterações histopatológicas em tecidos bucais causadas por materiais macios para base de prótese utilizando modelos animais (BARCLAY; MACDONALD, WATSON; 1997; BAIL *et al.*, 2014), sendo encontrado até o momento apenas um estudo relacionado utilizando reembasador modificado por fármacos (HOTTA *et al.*, 2019). Nesse estudo, os autores avaliaram histopatologicamente a mucosa palatina de ratos após a utilização de dispositivos intraorais (DIOs) acrílicos padronizados previamente (HOTTA *et al.*, 2017) e reembasados com material macio temporário modificado ou não pelas CIMs de três fármacos (Nis, Clx e cetoconazol) ao longo de sua vida útil. A análise histopatológica quantitativa por meio de planimetria computadorizada mostrou redução estatisticamente significativa da espessura e área de queratina na mucosa palatina dos animais tratados com DIOs reembasados com cetoconazol em relação às demais condições avaliadas (HOTTA *et al.*, 2019). Apesar da avaliação favorável obtida com os fármacos Nis e Clx, foi sugerido que tais resultados deveriam ser interpretados com cautela uma vez que os animais utilizados na avaliação histopatológica apresentavam os tecidos palatinos saudáveis, diferentemente do que ocorre clinicamente na indicação desse protocolo.

Os tecidos de suporte das bases acrílicas de próteses removíveis são alterados durante o processo infeccioso da estomatite protética. A adesão das células de *Candida* às camadas epiteliais é uma condição determinante para a colonização e infecção das superfícies mucosas. Esses fungos promovem degradação da superfície

---

epitelial pelo desenvolvimento de resposta hipersensitiva tardia e pela ação de exoenzimas hidrolíticas, as quais facilitam a aderência e a posterior invasão dos tecidos do hospedeiro (MCMULLAN-VOGEL *et al.*, 1999). Além disso, durante o processo infeccioso, as espécies de *Candida* promovem a liberação de toxinas (toxicoglicoproteínas e candidoxina), agravando as lesões decorrentes da estomatite protética (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990). A hidrofobicidade da superfície celular de *Candida* em suas formas miceliais favorece a invasão tecidual e dificulta a ação imunológica fagocitária (SALERNO *et al.*, 2011). O processo infeccioso desencadeado pelas interações específicas das espécies de *Candida* com as células epiteliais do hospedeiro pode ser marcadamente exacerbado por *C. albicans*, considerada como a mais virulenta e patogênica entre elas, o que deve ser especialmente considerado na estomatite protética, dada a alta elevada prevalência desse fungo (SALERNO *et al.*, 2011). Todas essas considerações reforçam que as alterações histopatológicas em tecidos de suporte acometidos com tal condição frente às diferentes terapias não serão as mesmas observadas naqueles saudáveis. Dessa forma, ainda permanecem desconhecidos os efeitos resultantes dos materiais reembasadores macios temporários modificados ou não por fármacos (na forma pura ou em complexo de inclusão) sobre os tecidos de suporte de DIOs acrílicos após a indução de estomatite protética. Assim, também seria relevante conhecer a resposta tecidual inflamatória do hospedeiro.

Frente aos problemas relacionados ao tratamento convencional, há necessidade de testar as novas alternativas de tratamento. Apesar de sua importância, estudos *in vitro* não são capazes de reproduzir a complexa formação do biofilme e a posterior infecção dos tecidos. Também são limitados por não reproduzirem os mecanismos de defesa do hospedeiro, a interferência dos componentes salivares e outros fatores que contribuem ou afetam o crescimento fúngico (NETT *et al.*, 2010; SUGIO *et al.*, 2020). Nesse sentido, a avaliação *in vivo* de novos protocolos de tratamento é necessária, entretanto seu desenvolvimento é prejudicado pela falta de um modelo animal apropriado para induzir a estomatite protética em animais (SUGIO *et al.*, 2020).

É relatado que os ratos são os animais de primeira escolha para indução da estomatite protética, pois possuem cavidade oral compatível com o uso de DIOs que simulam próteses totais (OLSEN; BONDEVIK, 1978; NETT *et al.*, 2010; JOHNSON *et*

---

*al.*, 2012; TOBOUTI *et al.*, 2016; SUGIO *et al.*, 2020), facilidade na reprodução e menor custo de manutenção (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001). Além disso, uma relevante justificativa para utilização dos ratos na indução da estomatite protética é a de que tais animais apresentam achados clínicos e histopatológicos da doença semelhantes àqueles dos humanos (OLSEN; BONDEVIK, 1978). Apesar disso, há grande divergência de metodologias para indução da estomatite protética em modelo murino. Um fator que prejudica a avaliação do método se refere à eficiente e rápida resposta imunológica dos animais diante de alterações diversas (VERMA *et al.*, 2018). A fim de contornar essa característica dos ratos, alguns estudos têm proposto associar a terapia de imunossupressão e/ou antibiótica para reduzir a resposta imune dos animais, favorecendo a infecção por *Candida* (OLSEN; BONDEVIK, 1978; JOHNSON *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2014; TOBOUTI *et al.*, 2016; YANO *et al.*, 2016).

O método de imunossupressão somado ao uso de DIOs foi associado à prostração nos animais, perda de peso ou morte (SUGIO *et al.*, 2020). Já a administração de antibióticos tem sido considerada uma alternativa viável para facilitar a colonização fúngica na medida que diminui as bactérias orais (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; WONG *et al.*, 2014; YANO *et al.*, 2016). Em especial, a administração de tetraciclina tem sido relacionada à manifestação de candidose oral em humanos (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001) e, por esse motivo, recomendada para auxiliar na indução de estomatite protética em modelo murino (TAKAKURA *et al.*, 2003).

O estudo de Albach (2020) testou a efetividade da indução e longevidade da estomatite protética comparando diferentes protocolos em ratos Wistar imunocompetentes sob antibioticoterapia, visando definir o protocolo nessas condições. O estudo concluiu que o modelo sob antibioticoterapia com tetraciclina, que utilizou DIO contaminado por 4 dias com *C. albicans*, obteve resultados com alterações clínicas (comparação por fotografias), enzimáticas (dosagem de neutrófilos e macrófagos) e hispatológicas significantes. Essas alterações foram consideradas compatíveis com o quadro da estomatite protética, sendo mantidas por 4 dias após a indução da doença (ALBACH, 2020).

---

Haja vista a alta prevalência da estomatite protética, os desafios de seu tratamento e a frequente recorrência, é relevante o desenvolvimento dessa lesão em modelo animal com o objetivo de avaliar novas alternativas de tratamento, previamente aos estudos em humanos. Entre as terapias promissoras para a doença, como relatado previamente, destaca-se o reembasamento das bases protéticas com condicionador de tecido modificado pelas CIMs ao biofilme de *C. albicans* de fármacos testados em suas formas puras ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina. Considerando a falta de estudos relacionados aos temas, torna-se necessário avaliar a resposta tecidual em modelo animal após a indução da estomatite protética e frente à terapia inovadora.

## **2 PROPOSIÇÃO**

---

---





## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi investigar em modelo animal a resposta tecidual após indução de estomatite protética sob DIOs reembasados com condicionador tecidual modificado por antifúngicos em suas formas livres ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina.

O objetivo específico desta investigação in vivo foi avaliar a resposta tecidual na mucosa palatina de ratos Wistar após a indução de estomatite protética e utilização de DIOs reembasados com fármacos antifúngicos testados em suas formas puras ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina, em função de:

- a) um condicionador tecidual para base de prótese (Softone);
- b) dois agentes antifúngicos comumente utilizados para a terapia dessa doença (Nis e Clx) em suas CIMs para biofilme de *C. albicans*;
- c) dois métodos de análises:
  - morfohistopatológica qualitativa descritiva e qualitativa ordinal com atribuição de escores ao nível de inflamação epitelial no palato dos animais;
  - histométrica por planimetria computadorizada.



# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

---



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais de experimentação

Um total de 59 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade entre 60 e 90 dias e peso entre 250 g e 300 g (HOTTA *et al.*, 2019), foi obtido do Núcleo Avançado de Estudos da Vida da Universidade Estadual de Ponta Grossa (NAEVI/UEPG) (CEUA – Proc. N° 048/2016 e N° 038/2018 – Anexo A), em três momentos diferentes (N=15; N=15; N= 29).

Toda a experimentação deste estudo está de acordo com o *The Guiding Principles for the Care and Use of Animals* (Neufeld, 1963). Os pesquisadores receberam o devido treinamento para uso do biotério e manuseio de animais, bem como fizeram uso de equipamentos de proteção individual, materiais desinfetados e instrumentais previamente esterilizados ao longo do experimento.

Os animais foram avaliados de acordo com os grupos de estudo apresentados abaixo, os quais se encontram resumidos na Tabela 1:

1. Controle negativo (Cn): animais saudáveis que não foram submetidos à indução de estomatite protética, nem à utilização de DIO;
  2. Dispositivo estéril (De): animais saudáveis que utilizaram DIO estéril, sem qualquer tipo de tratamento;
  3. Estomatite protética (EP): animais submetidos apenas à indução de estomatite protética (ALBACH, 2020);
  4. Softone (Soft): após a indução de estomatite protética (ALBACH, 2020), os animais foram tratados com DIOS reembasados com o condicionador de tecido Softone;
  5. Clorexidina (Clx): idem ao Grupo Soft, entretanto com o Softone modificado pela adição de Clx em sua CIM ao biofilme de *C. albicans* (BUENO *et al.*, 2015);
-

6. Nistatina (Nis): idem ao Grupo Soft, mas com DIOs reembasados com o Softone modificado pela adição da CIM de Nis ao biofilme de *C. albicans* (BUENO *et al.*, 2015);
7. Complexo de inclusão Clx:β-ciclodextrina (Clx:βCD): idem ao Grupo Soft, mas com o Softone modificado pela adição de Clx:βCD (SCHOEFFEL, 2016) em sua CIM ao biofilme de *C. albicans* (MORIKAVA, 2020);
8. Complexo de inclusão Nis:β-ciclodextrina (Nis:βCD): idem ao Grupo Soft, entretanto com Softone modificado pela adição de Nis:βCD (URBAN, 2016) em sua CIM ao biofilme de *C. albicans* (MORIKAVA, 2020).

Tabela 1. Grupos de estudo avaliados neste estudo

Grupo	Sigla	DIO	<i>C. albicans</i>	Reembasador	Antifúngico	Complexo de inclusão
Controle negativo	Cn	-	-	-	-	-
Dispositivo estéril	De	+	-	-	-	-
Estomatite Protética	EP	+	+	-	-	-
Softone	Soft	+	+	+	-	-
Nistatina	Nis	+	+	+	+	-
Clorexidina	Clx	+	+	+	+	-
Nistatina:β-ciclodextrina	Nis:βCD	+	+	+	+	+
Clorexidina:β-ciclodextrina	Clx:βCD	+	+	+	+	+

Inicialmente, os animais foram divididos em grupos e mantidos em quantidade reduzida (dois ou três ratos) nas gaiolas, sem que houvesse mistura dos diferentes grupos a serem testados. O ambiente era climatizado com temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade controladas (45-55%), com ciclo de 12 h de luz por dia e ventilação renovada de 15 a 20 vezes por hora.

Nas primeiras fases do experimento, os animais receberam dieta sólida com ração convencional e água *ad libitum*. Sete dias antes da indução de estomatite protética e até o fim do experimento, os ratos passaram a receber cloridrato de tetraciclina (Fleming Manipulação Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR, Brasil) na água de beber *ad libitum* na concentração de 0,83 mg/mL (TAKAKURA *et al.*, 2003;

TAKAKURA *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2014). Diariamente, o consumo de água era verificado e repostado.

Três dias antes da indução da doença, os animais também passaram a receber dieta pastosa obtida por meio da mistura do pó da ração (Presença, Socil Evisalis Nutrição Animal Ind. Com., Descalvado, SP, Brasil) com água (HOTTA *et al.*, 2019), sendo 30 g a quantidade diária recebida por animal. Para evitar contaminação cruzada, os animais contaminados foram mantidos em ambientes diferentes dos não contaminados.

Para a execução de todos procedimentos intraorais, os animais foram submetidos à anestesia geral com aplicação via intraperitoneal de cloridrato de quetamina 10% (Ketalex; Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin; Syntatec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil) nas doses de 0,08 mL e 0,04 mL para cada 100 g de peso do animal, respectivamente (HOTTA *et al.*, 2019).

A saúde dos animais foi monitorada durante todo o experimento com o acompanhamento diário da massa corporal, observação de possíveis dificuldades respiratórias, isolamento, prostração, escurecimento da cor do pelo ou indiferença. Todos os procedimentos foram realizados de forma a evitar ou reduzir o sofrimento dos animais (ALBACH, 2020).

Como critério de inclusão, os ratos eram *C. albicans*-negativos no início do estudo (TOBOUTI *et al.*, 2016). Para isso, amostras da saliva dos ratos foram coletadas esfregando um *swab* estéril embebido em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi Imp. e Dist., Curitiba, PR, Brasil) no palato dos animais durante 30 s. Em seguida, o conteúdo foi armazenado em tubos de Falcon contendo 1 mL de caldo BHI, homogeneizado em vórtex (QL-901; Biomixer, Curitiba, PR, Brasil) e, então, semeado em placas de Petri contendo o meio de isolamento e identificação de fungos (*Candida* CHROMagar®, *Candida* Cromogênico; LB Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e a interpretação dos resultados foi realizada pela análise da morfologia e da pigmentação das colônias. Nesta técnica, as colônias de *C. albicans* aparecem com coloração verde-claro a verde-médio (NEPPELENBROEK *et al.*, 2014).

---

---

### **3.2 Materiais**

O condicionador de tecido Softone (Bosworth Company, Skokie, IL, EUA) foi o material macio temporário selecionado para este estudo. Fornecido na forma de pó e líquido, o pó é composto por polietil metacrilato, peróxido de benzoila e partículas de dióxido de titânio, enquanto o líquido, por plastificante ftalato de alquilo e álcool etílico. Segundo as recomendações do fabricante, é utilizado na proporção de 1 g/1 mL, o tempo de manipulação é de 1 min e, de plastificação, cerca de 7 min à temperatura ambiente.

Em relação aos antifúngicos, foram selecionados os fármacos Nis (Teor 6.800,99 UI/mg; Fagron, Embu, SP, Brasil) e Clx (99,9%; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para formar os complexos de inclusão, a ciclodextrina utilizada foi a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD; >97%; Sigma Aldrich).

Para obtenção dos complexos, as suspensões de Nis: $\beta$ CD e Clx: $\beta$ CD nas proporções molares de 1:1 e 1:2, respectivamente, foram dissolvidas em solução de etanol (P.A. ACS; Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água destilada 50:50 (v/v), as quais foram agitadas (25°C por 24 h), congeladas a -82°C e liofilizadas (mod. LD1500A; Terroni, São Carlos, SP, Brasil) por 72 h (SCHOEFFEL, 2016; URBAN, 2016).

### **3.3 Obtenção dos dispositivos intraorais (DIOs)**

Para obtenção dos modelos de estudo, a maxila de um crânio seco de rato com tamanho compatível aos dos animais utilizados nesta pesquisa foi moldado com silicona por condensação de consistência pesada (Zetaplus; Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália). O molde foi vazado com gesso pedra especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (HOTTA *et al.*, 2017; ALBACH, 2020).

Sobre os modelos de estudo aliviados com 2 mm de cera nº 7 (Lysanda Prod. Odontol., São Paulo, SP, Brasil), moldeiras individuais foram confeccionadas com resina acrílica autopolimerizável incolor (Vipi Flash; Vipi® Ltda., Pirassununga, SP, Brasil). Finalizada a polimerização da resina acrílica, procedeu-se ao acabamento e

---



polimento das moldeiras utilizando brocas de tungstênio maxicut e minicut (Dhpro, Rhadartrade, Paranguá, PR, Brasil) (MORAES, 2018).

A partir dessas moldeiras individuais, os animais foram moldados com poliéster (Impregum F; 3M do Brasil, Campinas, SP, Brasil) (Figura 1A) e os moldes (Figura 1B) vazados para a obtenção dos modelos de trabalho (Durone; Dentsply Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 1C). Sobre esses, os DIOs foram encerados com 3 mm de espessura na região do palato e na superfície oclusal dos molares e 2 mm nas suas faces vestibulares (MORAES, 2018) (Figuras 1D e 1E).

O conjunto foi incluído em mufla metálica nº 6 (OGP Prod. Odontol. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 2A) com gesso pedra tipo III (Herodent; Vigodent S.A. Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e, sobre o modelo encerado, foi construída uma muralha de silicóna por condensação de consistência densa (Zetalabor; Zhermack., Badia Polesine, RO, Itália) (Figura 2B). A cera foi eliminada (Figura 2C) para possibilitar a inserção da resina acrílica termopolimerizável incolor Vipi Cril® (Vipi® Ltda., Pirassununga, SP, Brasil) em fase plástica. Em seguida, as muflas foram prensadas (Essence Dental VH, Araraquara, SP, Brasil) a 1,25 t por 30 min para, então, a resina ser polimerizada em banho de água (SL-155/22; Solab Equipam. Laborat. Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) pelo ciclo recomendado pelo fabricante, procedendo-se ao resfriamento em bancada e água (ALBACH, 2020).

Depois da demuflagem, os excessos de resina dos DIOs foram removidos, sendo o acabamento realizado com minicut (Figura 3A). Então, foi realizada a planificação da superfície externa dos DIOs com lixas d'água de granulação 100 e 200 (3M do Brasil) (Figura 3B) para padronização da rugosidade. Os DIOs finalizados (Figura 3C e 3D) foram submetidos à armanezagem em água destilada a 37°C por 48 h (ISO, 1998). Então, foram individualmente imersos em 200 mL de água destilada estéril e esterilizados por micro-ondas (MEF 41; Electrolux, Manaus, AM, Brasil) a 650 W por 3 min (MIMA *et al.*, 2008; MORAES, 2018).

---

---

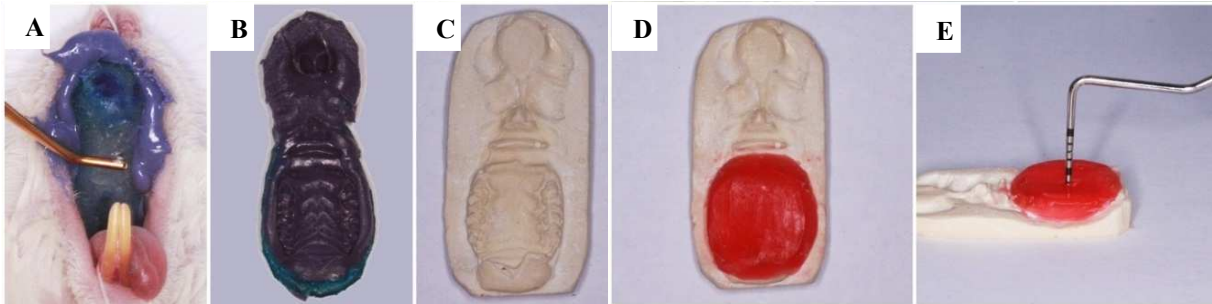


FIGURA 1 - Moldagem, vazamento e enceramento dos modelos de trabalho. A: Moldagem de trabalho; B: Molde e C: Modelo de trabalho; D: Enceramento; E: Conferência da espessura da cera.

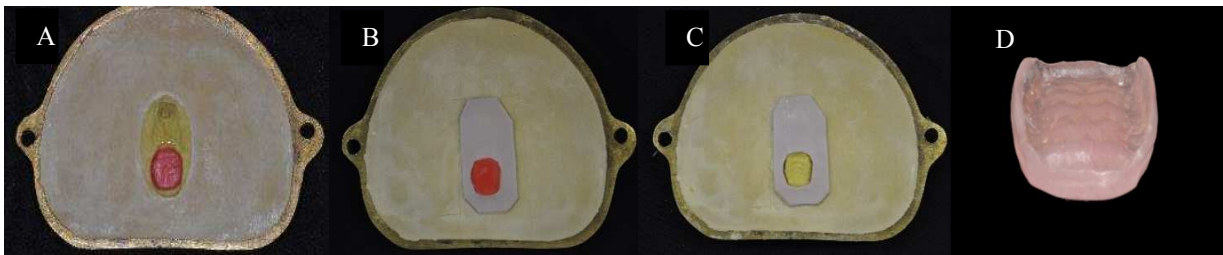


FIGURA 2 – Inclusão em mufla e polimerização dos dispositivos acrílicos. A: Modelo de trabalho encerado incluído em mufla; B: Muralha de silicone; C: Modelo de trabalho em mufla após a eliminação da cera; D: DIO removido da mufla.

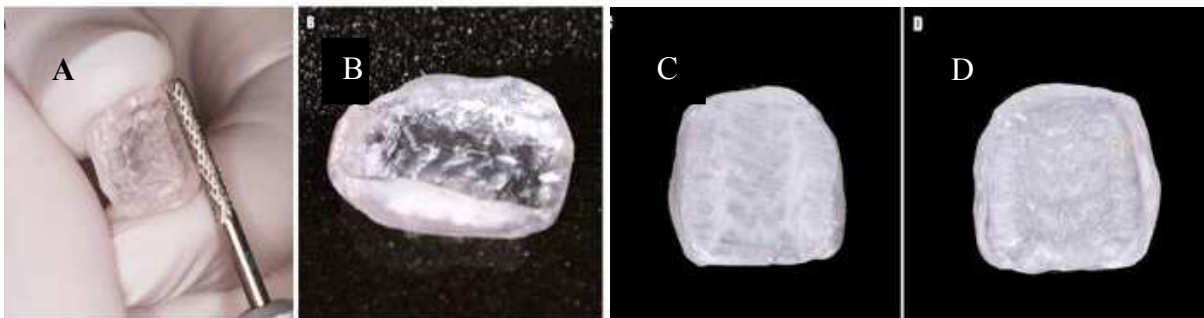


FIGURA 3 – Acabamento e planificação dos dispositivos. A: Acabamento do dispositivo com broca minicut; B: Planificação e padronização da rugosidade da superfície externa com lixas d'água; C: Superfície externa do DIO; D: Superfície interna do DIO.

### 3.4 Obtenção do inóculo de *C. albicans*

Uma alçada da cepa geneticamente modificada de *C. albicans* SC5314 (BUENO *et al.*, 2015) mantida em caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD; Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, EUA) contendo 20% de glicerol (Kasvi Imp. e Dist.) (CATALÁN *et al.*, 2008) foi descongelada (-80°C) (Figura 4A) e semeada em placa de Petri contendo YEPD Agar (Clontech laboratories Inc, Mountain View, CA, EUA). Após a incubação a 37°C por 48 h (ZAMPERINI *et al.*, 2011) (Figura 4B), uma colônia foi removida da placa, ressuspensa em 20 mL de YEPD (Figura 4C) e

---

mantida *overnight* ( $\pm 16$  h) em incubadora (Shaker- Mod. 430/RDBP, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 30°C, sob agitação de 180 rpm, resultando em uma pré-cultura (MORAES, 2018).

Para a purificação das células, os tubos Falcon (TPP®; Techno Plastic Prod, Trasadingen, SH, Suíça) contendo a pré-cultura foram submetidos à centrifugação (mod. 5804 R; Eppendorf do Brazil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 4000 rpm a 4°C por 15 min, sendo o sobrenadante desprezado. A purificação das células foi realizada por lavagem do *pellet* com 5 mL de PBS (Phosphate Buffer Solution; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) (Figura 4D) e homogeneização em vórtex (QL-901 Biomixer; Curitiba, PR, Brasil), seguido por nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, com descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por duas vezes (BUENO *et al.*, 2015).

O *pellet* final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspenso em 20 mL de PBS para obtenção do inóculo (Figura 4E) a uma concentração de  $2,6 \times 10^8$  UFC/mL (ALBACH, 2018). Durante todo o estudo, foram obtidas diluições seriadas em PBS da suspensão fúngica para a determinação da concentração utilizada para o inóculo. Assim, alíquotas de 25  $\mu$ L das diluições a  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram plaqueadas em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco®, Detroit, Michigan, EUA) (Figura 5). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e, então, foi realizada a contagem das colônias de *C. albicans* para a determinação dos valores de UFC/mL, calculados pela seguinte equação:

$$\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n / q$$
, na qual,  $n$  equivale ao valor absoluto da diluição (4), e  $q$  equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição durante a semeadura das placas.

---

---

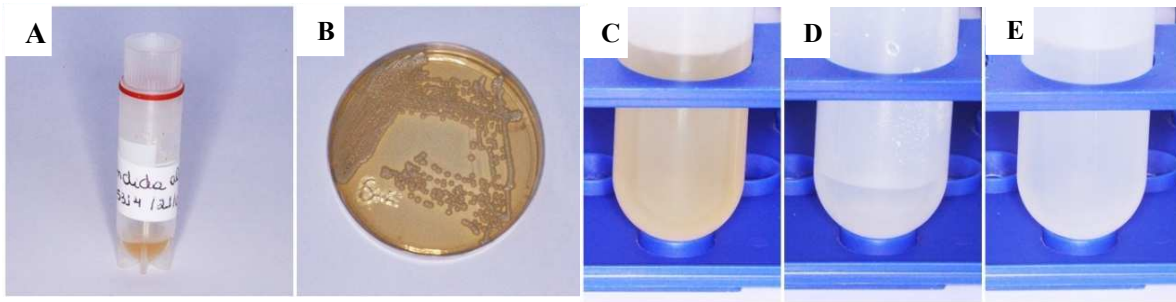


FIGURA 4 – Preparo do inóculo. A: Cepa descongelada; B: Crescimento fúngico em ágar YEPD; C: Transferência de uma colônia de *C. albicans* para 20 mL de caldo YEPD; D: Lavagem do pellet em PBS estéril; E: Inóculo.

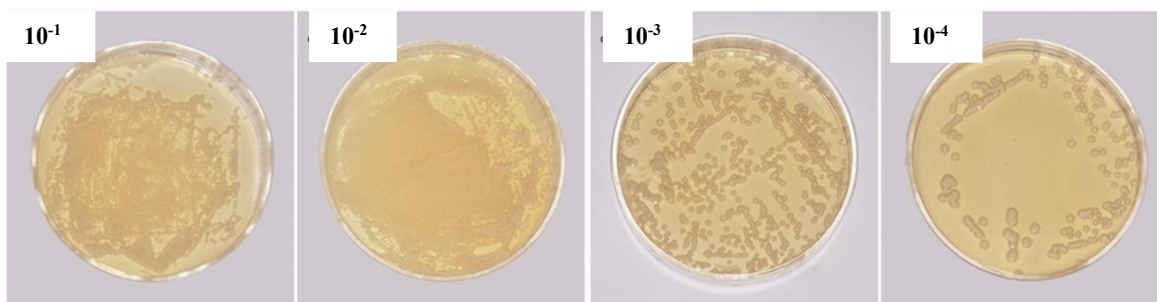


FIGURA 5 – Placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose e o crescimento fúngico resultante das diluições seriadas.

### 3.5 Contaminação dos DIOs

Os DIOs foram contaminados com o inóculo de *C. albicans* a uma concentração de  $2,6 \times 10^8$  UFC/mL visando reproduzir a condição clínica das próteses dos pacientes com estomatite protética (MORAES, 2018). Então, os DIOs foram individualmente colocados em poços de placa de cultura de 24 poços (TPP®), com a superfície interna voltada para cima (MORAES, 2018).

Para a adesão celular, cada DIO foi imerso em 2 mL do inóculo em placa de cultura de 24 poços (TPP®), incubado (75 rpm, 90 min e 37°C) (BUENO *et al.*, 2015) e lavado em duplicata com 2 mL. Então, os DIOs foram imersos em 2 mL de RPMI-1640 com 2% de glicose (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e incubados novamente (75 rpm, 24 h e 37°C). Após esse período, o RPMI-1640 foi trocado e incubado por 24 h nas mesmas condições (DELBEN *et al.*, 2016). Decorridas as 48 h de incubação, foi observado um biofilme maduro, que foi gentilmente lavado com PBS em duplicata (Figura 6) (DELBEN *et al.*, 2016).



FIGURA 6 – Dispositivos imersos no meio de cultura após período de formação de biofilme.

### 3.6 Inoculação oral de *C. albicans* e cimentação dos DIOs nos molares superiores dos animais

Sete dias antes da cimentação dos dispositivos e no decorrer de todo o experimento, os ratos receberam hidrocloreto de tetraciclina na água de beber na concentração de 0,83 mg/mL para reduzir as bactérias orais (TAKAKURA *et al.*, 2003; TAKAKURA *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2014; ALBACH, 2020).

Para realizar os procedimentos a seguir, a anestesia dos ratos foi complementada com a administração de 0,01 mL/100 g do animal via intraperitoneal de maleato de acepromazina 1% (Apromazin 1%; Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) (ALBACH, 2020). Isso foi necessário para que os ratos permanecessem anestesiados por mais tempo a fim de evitar a deglutição de *Candida*, melhorando colonização e invasão tecidual dos fungos no tecido epitelial.

Inicialmente, o palato dos animais foi inoculado com uma suspensão padronizada de *C. albicans* ( $2,6 \times 10^8$  UFC/mL), utilizando swabs estéreis embebidos na suspensão com o inóculo e esfregados com pressão moderada sobre o palato dos animais por 30 s (ALBACH, 2020) (Figura 7A). Em seguida, os DIOs previamente contaminados foram cimentados nos molares superiores utilizando cimento resinoso autoadesivo RelyX™ U200 (3M ESPE; St. Paul, EUA) (Figura 7E), precedido do condicionamento com ácido fosfórico Condac 37% (FGM; Joinville, Brasil) (Figura 7B,

7C e 7D). Os ratos permaneceram com o DIO em boca por 4 dias para indução da estomatite protética (TOBOUTI *et al.*, 2016; ALBACH, 2020).

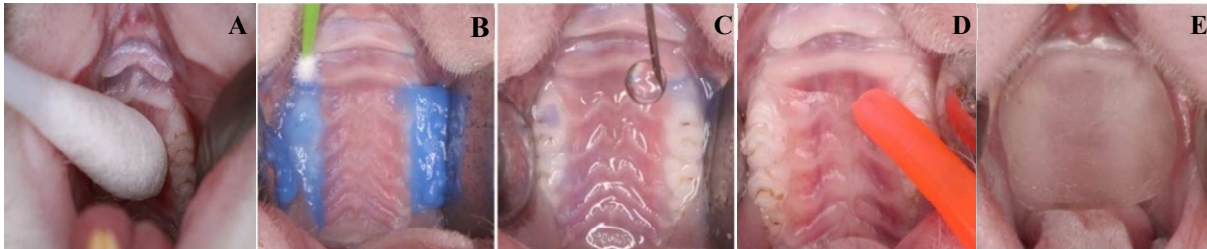


FIGURA 7 – Inoculação oral com *C. albicans* e cimentação dos DIOs nos palatos dos animais. A: Inoculação do palato dos animais; B: Condicionamento ácido dos molares superiores; C: Lavagem com jato de água; D: Secagem; D: Cimentação do DIO.

Antes da recuperação anestésica, os animais tiveram suas unhas cortadas, a fim de evitar que se machucassem ao tentar remover os DIOs (HOTTA *et al.*, 2017; ALBACH, 2020). A partir dessa fase do experimento, todos os animais foram mantidos em gaiolas separadas, de forma isolada, para evitar contaminação cruzada ou possível interferência nos tratamentos, os quais os ratos foram submetidos posteriormente.

### 3.7 Reembasamento dos DIOs nos palatos dos animais

Após o período de indução da infecção, os DIOs foram removidos e desgastados uniformemente em sua superfície interna, deixando espaço de 1 mm (HOTTA *et al.*, 2019). Esse desgaste foi obtido com o auxílio de uma broca carbide nº 702, fazendo-se três sulcos longitudinais que foram unidos com broca minicut (HOTTA *et al.*, 2019). Então, os dispositivos foram reembasados com o condicionador de tecidos Softone com ou sem a adição dos fármacos em suas CIMs ao biofilme de *C. albicans* nas formas puras (BUENO *et al.*, 2015) ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina (MORIKAVA, 2020). Assim, foram levados à boca do animal com pressão digital até a plastificação completa do material. Os excessos do material foram cuidadosamente removidos com tesoura estéril e novamente cimentados na região de molares (Figura 8), permanecendo na cavidade bucal dos animais por 2 dias.



### 3.8 Obtenção e processamento das amostras histológicas

Após o término do período experimental (2 dias), os ratos foram eutanasiados por administração de uma dose excessiva de anestésico seguida de deslocamento cervical (HOTTA *et al.*, 2017).

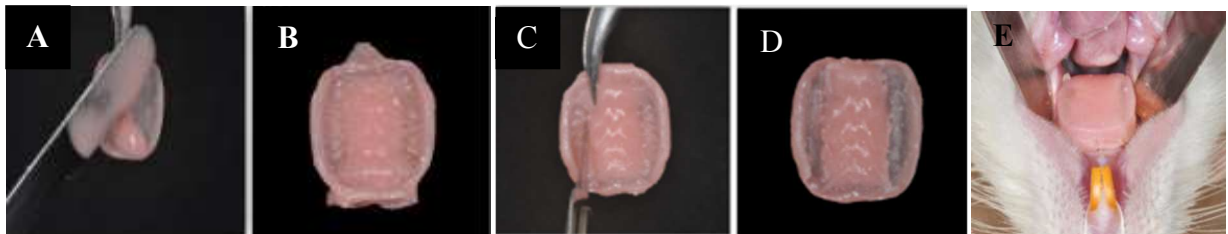


FIGURA 8 – A: Softone manipulado acrescentado na região palatina desgastada dos DIOs; B: DIO reembasado; C: Remoção dos excessos do material reembasador e alívio na região dos molares; D: Aspecto final do DIO após reembasamento e alívio para cimentação; E: DIO cimentado.

A região da maxila contendo o palato e os molares foi divulsionada, fixada em formol neutro a 10% em tampão fosfato por 48 h e desmineralizada em solução de EDTA (4,13% de Tritriplex III- Merck® Darmstadt, HL, Alemanha e 0,44% de hidróxido de sódio) à temperatura ambiente por aproximadamente 20 dias. Após esse processo, as amostras foram reduzidas apenas à área de interesse -AI (recoberta pelos DIOs - Figuras 9 e 10), correspondente à secção transversal do palato duro de mesial dos primeiros molares até a distal dos terceiros molares, com descarte das demais estruturas da maxila (HOTTA *et al.*, 2017, HOTTA *et al.*, 2019). Em seguida, as peças foram incluídas em parafina e cortes seriados foram obtidos de toda a AI (4 µm de espessura).

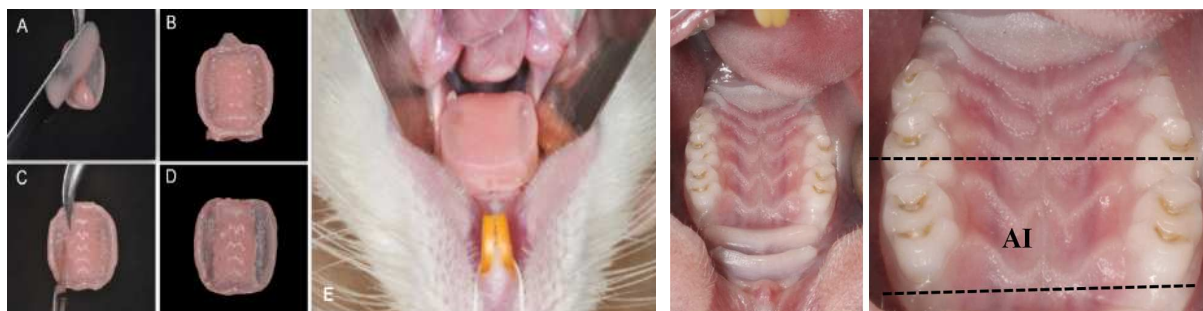


FIGURA 9 – A: Softone manipulado acrescentado na região palatina desgastada dos DIOs; B: DIO reembasado; C: Remoção dos excessos do material reembasador e alívio na região dos molares; D: Aspecto final do DIO após reembasamento e alívio para cimentação; E: DIO cimentado.

FIGURA 10 – Delimitação esquemática da área de interesse (AI)- palato duro de mesial dos primeiros molares até a distal dos terceiros molares

Em seguida, as peças passaram por processamento histológico para inclusão em parafina com adição de polímeros (Histosec®, Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) à temperatura de 60°C. Após a solidificação, 12 cortes seriados de 4 µm de espessura foram obtidos de duas regiões da AI no sentido transversal e coletados em lâminas silanizadas, para serem submetidos à coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE).

### **3.9 Monitoramento da saúde dos animais**

Diariamente os animais foram individualmente monitorados em relação ao consumo de água (mL). Também foram pesados (massa corporal) em diferentes etapas do estudo: inicial (início do experimento); T0: período correspondente ao dia da instalação dos DIOs para indução de estomatite protética; T1: período correspondente ao dia de reembasamento dos DIOs para tratamento; T2: período correspondente ao final do tratamento.

### **3.10 Avaliação da resposta tecidual**

Para a avaliação histopatológica da resposta tecidual em cada grupo experimental em comparação ao Grupo Cn, os cortes teciduais corados pela HE foram digitalizados pelo *scanner* de lâminas Aperio Scanscope CS (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA) em magnificação de 40×. Todas as imagens digitais foram armazenadas em formato “svs” e, posteriormente, visualizadas no programa ImageScope (Aperio Technologies Inc.).

#### **3.10.1 Análise morfohistopatológica**

A análise qualitativa foi realizada tanto de forma descritiva quanto de forma ordinal, com atribuição de escores ao nível de inflamação epitelial no palato dos animais. Para isso, foram avaliados os aspectos relacionados à espessura da camada córnea (ortoqueratina), variações no epitélio, tecido conjuntivo e presença de infiltrado

---



e células inflamatórias (HOTTA *et al.*, 2017; HOTTA *et al.*, 2019). Na análise ordinal, foram atribuídos escores de 1-5, conforme abaixo:

- 1 = Epitélio normal;
- 2 = Redução da camada queratinizada e processo inflamatório leve;
- 3 = Hiperplasia leve com presença de células inflamatórias;
- 4 = Hiperplasia severa com fibrose e ausência da camada queratinizada;
- 5 = Intenso processo inflamatório e lesão epitelial.

### **3.10.2 Análise histométrica por planimetria computadorizada**

A fim de quantificar as alterações em relação às medidas do epitélio, foi realizada uma análise de planimetria computadorizada. Para isso, foram obtidas imagens da mucosa palatina localizadas entre os feixes vículo-nervosos compostos pela artéria palatina maior e nervo palatino maior no aumento de 6,5×, utilizando o *software* ImageScope (Aperio Technologies Inc.). As imagens armazenadas em formato "TIFF foram avaliadas por um *software* de análise digital (AxioVision 4.8., Carl Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) em relação a nove variáveis: 1) comprimento da superfície córnea (CSL), 2) comprimento da superfície basal (BSL), 3) comprimento da superfície basal em relação ao comprimento da superfície córnea (BSL/CSL), 4) espessura de queratina (KT), 5) espessura do compartimento celular (CCT), 6) espessura do compartimento celular em relação à espessura de queratina (CCT/KT), 7) área de queratina (KA), 8) área do compartimento celular (CCA) e 9) proporção da área do compartimento celular em relação à área da queratina (CCA/KA). Para obter a média da espessura da queratina e do compartimento celular de cada campo, foram realizadas 15 mensurações equidistantes. Isso foi realizado para alcançar maior fidelidade de mensurações, uma vez que as camadas de queratina e epitélio variam em espessura dependendo da região avaliada (HOTTA *et al.*, 2017; HOTTA *et al.*, 2019).

---

---

### **3.11 Forma de análise dos resultados**

Para as análises de monitoramento dos animais, os dados relativos ao consumo médio diário de água por grupo foram submetidos à análise de variância de fator único (ANOVA 1-fator) ( $\alpha=0,05$ ). O acompanhamento da massa corpórea dos ratos ao longo do período experimental foi analisado estatisticamente utilizando a ANOVA 2-fatores de medidas repetidas (fatores "grupo" e "tempo";  $\alpha=0,05$ ).

Para a análise histométrica por planimetria computadorizada, foi realizada uma calibração intraexaminador previamente. Para isso, após 20 dias das mensurações iniciais, 30 lâminas selecionadas aleatoriamente foram avaliadas e a análise intraexaminador foi realizada (HOTTA *et al.*, 2017). Teste t pareado foi utilizado para a determinação do erro sistemático ( $\alpha=0,05$ ) e a fórmula de Dahlberg foi utilizada para estimar o erro casual. Confirmada a calibração intraexaminador (0,835-1,000), procedeu-se às análises. As imagens das lâminas foram descritas qualitativamente, sendo atribuídos escores ao nível de inflamação epitelial no palato dos animais, os quais foram relacionados pelo teste de Correlação de Pearson às medidas de comprimento, espessura e área do epitélio obtidas por planimetria computadorizada.

# 4 RESULTADOS

---

---



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Triagem dos Animais

De 59 animais triados, todos eram *C. albicans*-negativos no início do estudo, não apresentando nenhuma colônia presuntiva de *C. albicans* na cavidade oral.

### 4.2 Monitoramento dos Animais

Dos 59 ratos triados, 22 foram excluídos da amostra por morte durante o procedimento anestésico ou por perda do DIO durante o experimento. Assim, 37 ratos foram incluídos neste estudo, conforme mostra a Figura 11.

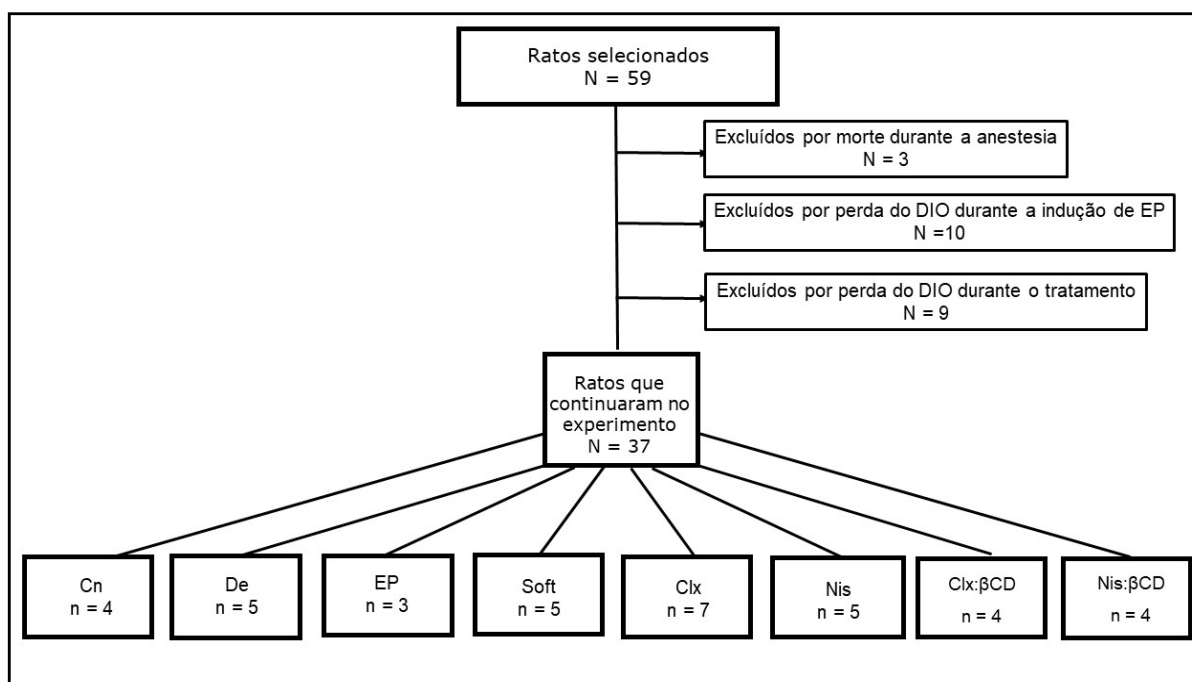


FIGURA 11 – Fluxograma dos grupos estudados.

Em quase todos os animais, independente do grupo, foi comum observar pequena quantidade de detritos alimentares entre o palato e os DIOs, durante sua remoção. Nos ratos que foram submetidos à indução de estomatite protética, também foi possível visualizar a formação de um biofilme espesso.

O consumo médio diário de água pelos animais dos diferentes grupos pode ser visualizado na Figura 12.

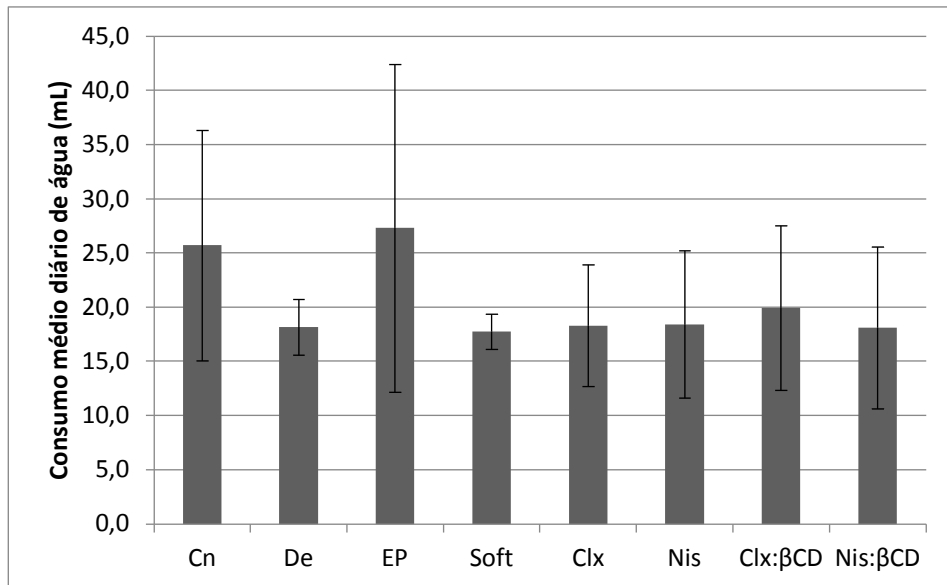


FIGURA 12 – Consumo médio diário de água (mL) pelos animais dos diferentes grupos avaliados.

Foi possível observar que a média diária do consumo de água pelos animais foi semelhante entre os grupos ( $p=0,69$ ). Com tais informações, foi possível assegurar que, neste estudo, os animais ingeriram quantidade semelhante da tetraciclina ao longo do experimento. Não foi observada a redução da ingestão da mistura líquida do antibiótico na água de beber pelos ratos ao longo da pesquisa.

Os resultados de acompanhamento dos pesos dos animais podem ser observados na Figura 13.

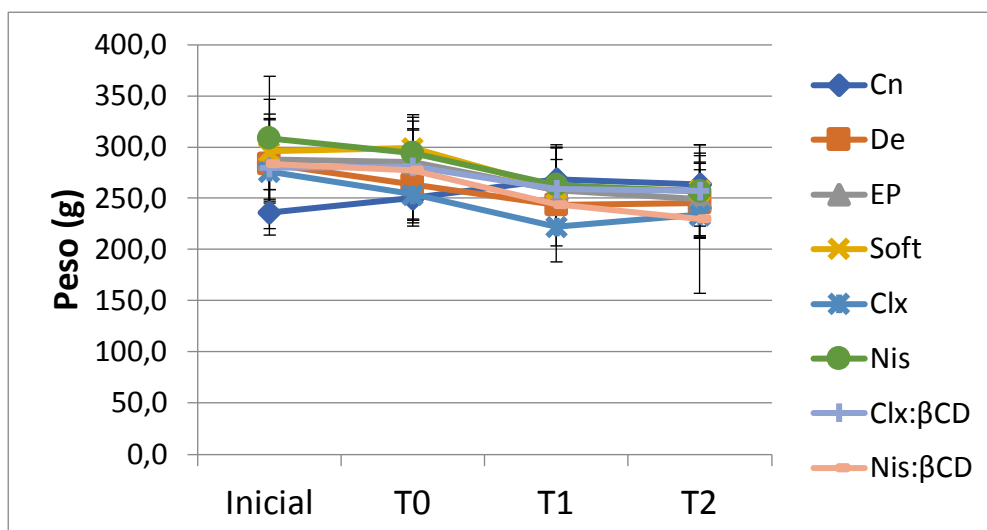


FIGURA 13 – Acompanhamento do peso (g) dos animais ao longo do experimento.

*Inicial*: período correspondente ao início do experimento; *T0*: período correspondente ao dia da instalação dos DIOs para indução de estomatite protética; *T1*: período correspondente ao dia de reembasamento dos DIOs para tratamento; *T2*: período correspondente ao final do tratamento.

Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,84$ ) na comparação dos pesos dos animais entre os grupos experimentais avaliados. Entretanto, foi verificada interação entre os fatores "grupo" e "tempo" ( $p=0,043$ ) para avaliação do peso dos animais ao longo do experimento. As variações de peso detectadas foram pequenas e observadas principalmente entre os períodos T1 (após o tratamento) e T2 (antes da eutanásia) ( $p<0,05$ ). Apesar disso, nenhum animal mostrou-se debilitado no decorrer do experimento.

### 4.3 Avaliação da Resposta Tecidual

#### 4.3.1 Análise morfohistopatológica

A análise morfohistopatológica descritiva foi realizada avaliando fotomicrografias como ilustrado na Figura 14, sendo os principais achados descritos a seguir:

##### a. Grupos Controles

Grupo Cn: Todos os cortes mostraram o palato revestido por epitélio estratificado pavimentoso (Figura 14A), contendo uma espessa e contínua camada queratinizada (Figura 14A1) logo acima da camada granulosa composta por células achatadas ricas em grânulos de querato-hialina (Figura 14A1). O epitélio apresentava papilas epiteliais rasas e camada basal intacta (Figura 14A2). Adjacente à camada basal, a lâmina própria era formada por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, fibroblastos, pequenos capilares e raras células inflamatórias (Figura 14A2). Essa organização homogênea de células, vasos e componentes da matriz extracelular era indicativa de um tecido conjuntivo normal. Para todas as imagens representativas desse grupo, atribuiu-se o escore 1.

Grupo De: Todas as amostras (Figura 14B) apresentaram quadro histopatológico similar ao do Grupo Cn (Figura 14A), exceto uma que apresentou redução da camada córnea queratinizada (Figura 14C). Como não foram observadas alterações nas demais estruturas epiteliais nem se notou aumento das células inflamatórias na lâmina própria, todas as amostras desse grupo também receberam o escore 1.

Grupo EP: Em uma amostra (Figura 14D), observou-se redução da camada córnea (Figura 14D1) e aumento das células inflamatórias no tecido conjuntivo adjacente à camada basal (Figura 14D2), sendo atribuído o escore 2 (n=1). Em outra (Figura 14E), foi possível visualizar paraqueratose (Figura 14E1), isto é, persistência de núcleos na camada córnea, além de hiperplasia leve com projeções epiteliais longas, mas com espessura regular em direção à lâmina própria (Figura 14E). A epiderme suprapapilar, que recobre a extremidade das papilas dérmicas em algumas regiões, mostrava-se muito adelgada, com algumas pontas das papilas expostas (Figura 14E1). A lâmina própria e o interior do tecido epitelial apresentavam células inflamatórias, principalmente neutrófilos adentrando no epitélio (Figura 14E2). Nesta amostra, atribuiu-se o escore 4. Acentuado espessamento da epiderme por aumento das células da camada espinhosa (acantose) e grande alongamento desorganizado das projeções epiteliais entre as papilas dérmicas (Figura 14F) caracterizaram a amostra que recebeu o escore 5. Essa também apresentou paraqueratose (Figura 14F1), ausência da camada granulosa, além de uma lâmina própria caracterizada por um tecido conjuntivo denso contendo fibroblastos e células inflamatórias mononucleadas (Figura 14F2).

---



## **b. Grupos Tratados**

Grupo Soft: Duas amostras receberam o escore 2 pelo pequeno aumento das papilas epiteliais rasas e de células inflamatórias na lâmina própria e no tecido epitelial (Figura 14G). Nas outras duas amostras, foi atribuído o escore 5 pela presença de paraquetose, acantose e grande alongamento desorganizado das projeções epiteliais entre as papilas dérmicas contendo células inflamatórias (Figura 14H). Adjacente às papilas dérmicas, a lâmina própria era constituída por um tecido conjuntivo rico em células inflamatórias (Figura 14H).

Grupo Nis: Duas amostras receberam o escore 1 por apresentarem características de um tecido epitelial normal (Figura 14I), semelhante ao observado nos Grupos Cn e De. Em uma amostra, foi atribuído o escore 2 devido ao aumento da camada queratinizada acima da camada granulosa, alongamento desorganizado das projeções epiteliais, além de espessamento das papilas dérmicas e da lâmina própria, com presença de grande quantidade de células inflamatórias (Figura 14J). Para a amostra na qual as camadas córnea e granulosa estavam presentes, porém as projeções epiteliais se mostravam alongadas e desorganizadas, contendo várias células inflamatórias advindas da lâmina própria adjacente, foi atribuído o escore 3 (Figura 14K). Uma das amostras recebeu o escore 4 pela ausência da camada granulosa, início da formação de uma camada paraqueratinizada e pela presença de projeções epiteliais associadas alongadas com células inflamatórias advindas das longas papilas dérmicas (Figura 14L).

Grupo Clx: Em duas amostras, o epitélio palatino se apresentava similar ao observado no Grupo Cn, sendo atribuído o escore 1 (Figura 14M). Perda parcial da camada córnea queratinizada com presença da camada granulosa, pequeno aumento das projeções epiteliais e raras células inflamatórias no tecido conjuntivo adjacente à camada basal foram características de duas amostras (Figura 14N) que receberam o escore 2. A presença de paraqueratose e hiperplasia leve, com projeções epiteliais longas e desorganizadas contendo algumas células inflamatórias advindas da lâmina própria adjacente, foi observada em duas amostras, para as quais o escore 3 foi atribuído (Figura 14O).

---

---

Grupo Nis:βCD: Duas amostras (Figura 14P) receberam o escore 1 por apresentarem estruturas epiteliais similares àquelas observadas no Grupo Cn, embora algumas células inflamatórias na papila dérmica tenham sido observadas. O escore 3 foi atribuído às outras duas amostras que apresentavam paraqueratose com ausência da camada granulosa e hiperplasia leve com projeções epiteliais longas e células inflamatórias provenientes das papilas dérmicas (Figura 14Q).

Grupo Clx:βCD: Em duas amostras, o epitélio palatino se apresentava semelhante ao observado no Grupo Cn, recebendo o escore 1 (Figura 14R). Em uma amostra, houve aumento da camada córnea com núcleos em seu interior e grande redução da camada granulosa (Figura 14S) e, na outra, presença de paraqueratose (Figura 14T). Foi ainda visualizado em ambas as amostras, que receberam o escore 2, um aumento das projeções epiteliais em comparação ao Grupo Cn, com presença de raras células inflamatórias oriundas do tecido conjuntivo adjacente à camada basal.

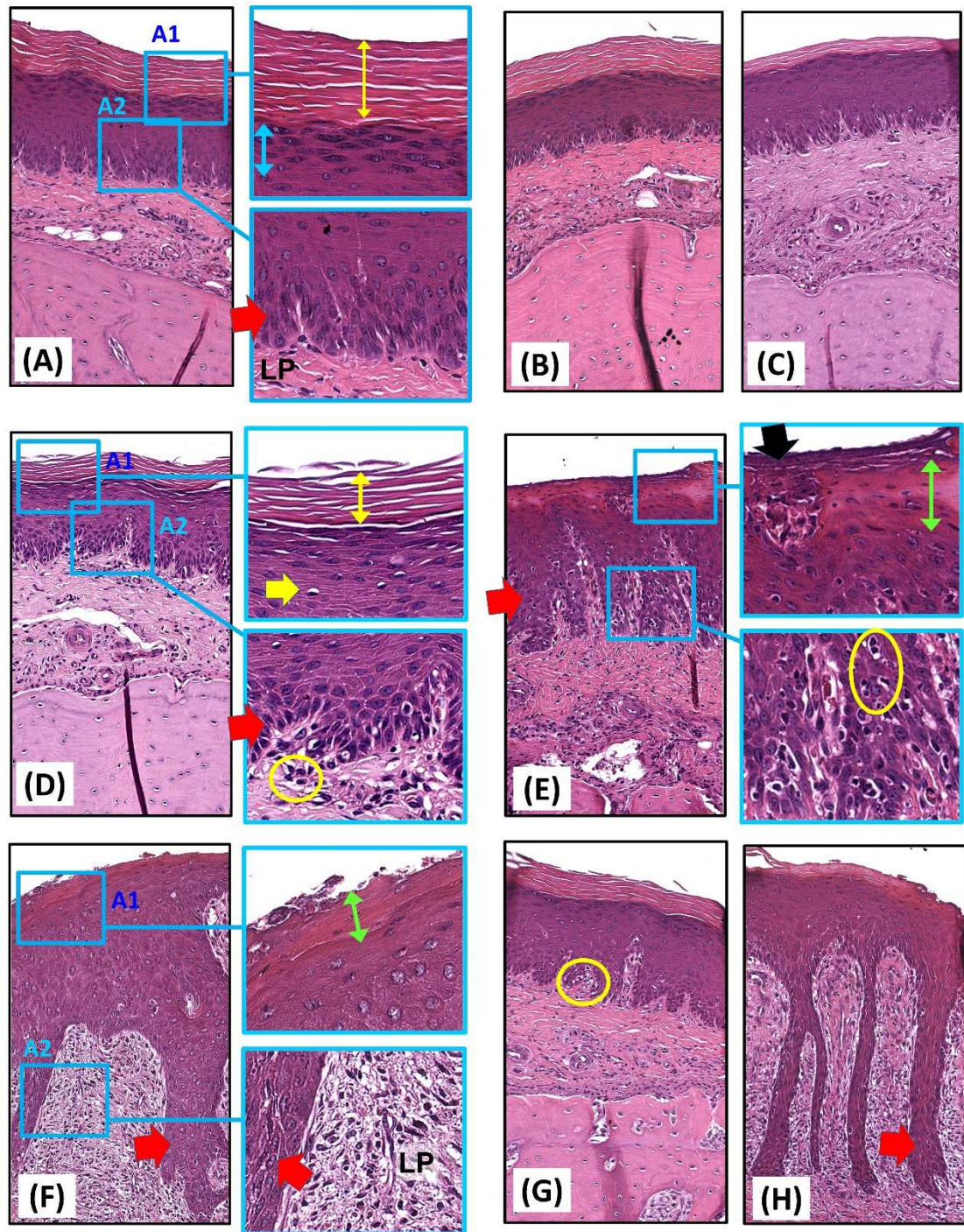


FIGURA 14 – Quadro histopatológico das amostras dos grupos testados. **Grupo Cn (A) e De (B e C)- Escore 1:** epitélio estratificado pavimentoso com espessa e contínua camada queratinizada (seta amarela) acima da camada granulosa (seta azul), exceto na amostra da imagem C (camada córnea reduzida); camada basal com papilas epiteliais rasas e camada basal intacta (seta vermelha) adjacente à lâmina própria (LP). **Grupo EP (D, E e F)- Escore 2 (D):** redução da camada córnea (seta amarela) e aumento das células inflamatórias (área circundada em amarelo) na LP; **Escore 4 (E):** paraqueratose (seta verde), hiperplasia com projeções epiteliais longas (seta vermelha), pontas de papilas expostas na superfície (seta preta) e células inflamatórias (área circundada em amarelo); **Escore 5 (F):** Acanthose, alongamento desorganizado das projeções epiteliais (seta vermelha) entre as papilas dérmicas, paraqueratose (seta verde), ausência da camada granulosa e densa LP. **Grupo Soft (G,H)- Escore 2 (G):** papilas epiteliais rasas com células inflamatórias na LP e no tecido epitelial (área circundada em amarelo); **Escore 5 (H):** Paraqueratose, acantose e alongamento desorganizado das projeções das epiteliais (seta vermelha) entre as papilas dérmicas. HE, 10× e 40×



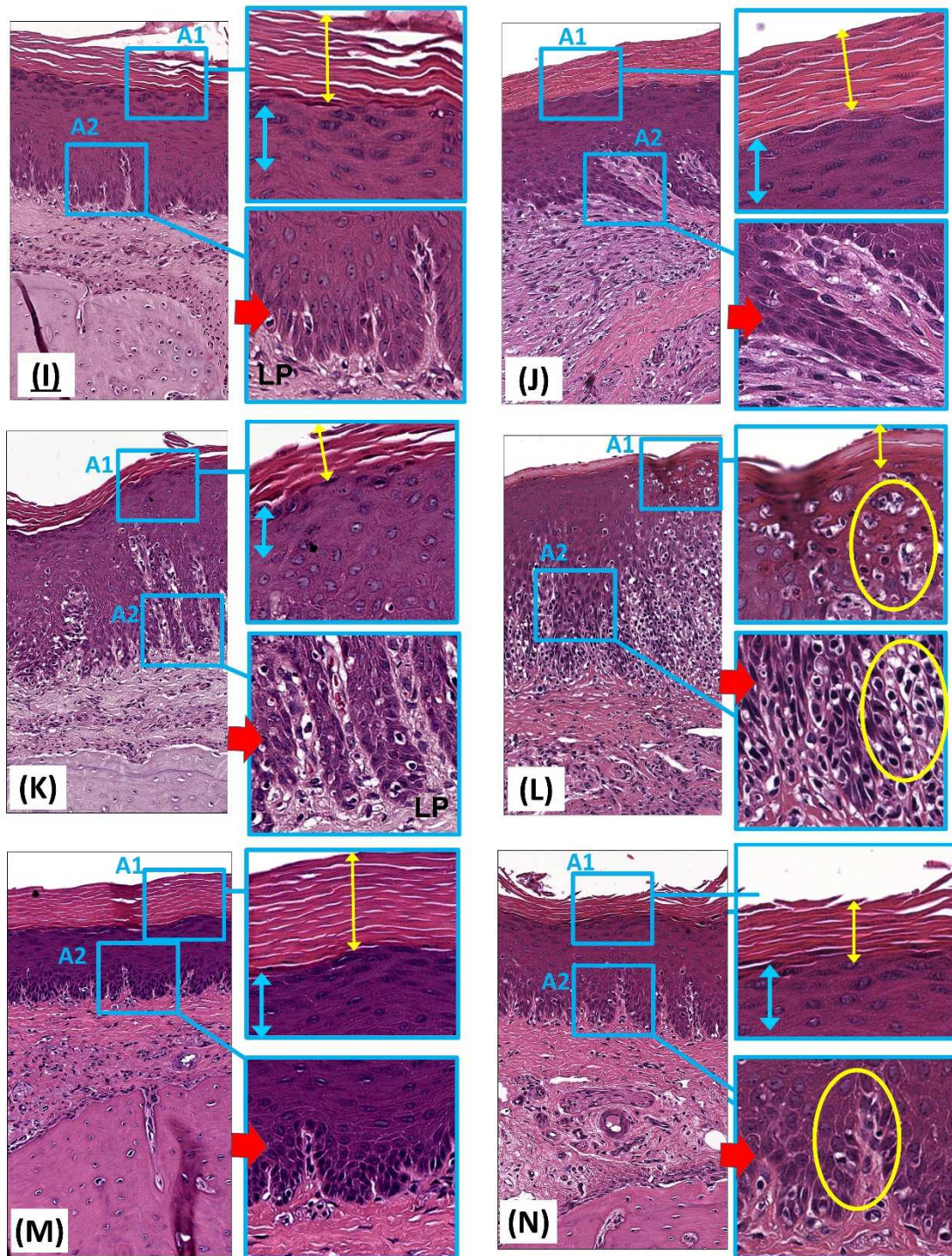


FIGURA 14 – Quadro histopatológico das amostras dos grupos testados. **Grupo Nis (I, J, K, L)-** **Escore 1 (I):** camada queratinizada espessa e contínua (seta amarela) acima da camada granulosa (seta azul) e camada basal com papilas epiteliais rasas (seta vermelha); **Escore 2 (J):** aumento desorganizado das projeções epiteliais (seta vermelha), espessamento das papilas dérmicas e da lâmina própria (LP); **Escore 3 (K):** fina camada córnea (seta amarela) adjacente a granulosa (seta azul) e projeções epiteliais alongadas e desorganizadas (seta vermelha) com células inflamatórias (área circundada em amarelo); **Escore 4 (L):** fina camada córnea paraqueratinizada (seta amarela), ausência da camada granulosa, desorganização e destruição das projeções epiteliais (seta vermelha) invadidas por células inflamatórias (área circundada em amarelo) advindas das papilas dérmicas. **Grupo Cix (M e N)-** **Escore 1 (M):** camada queratinizada espessa e contínua (seta amarela) adjacente a camada granulosa (seta azul), projeções epiteliais (seta vermelha) e papilas dérmicas rasas; **Escore 2 (N):** perda parcial da camada queratinizada (seta amarela) adjacente à camada granulosa (seta azul) e leve aumento das projeções epiteliais (seta vermelha) com presença de células inflamatórias (área circundada em amarelo). HE, 10 $\times$  e 40 $\times$



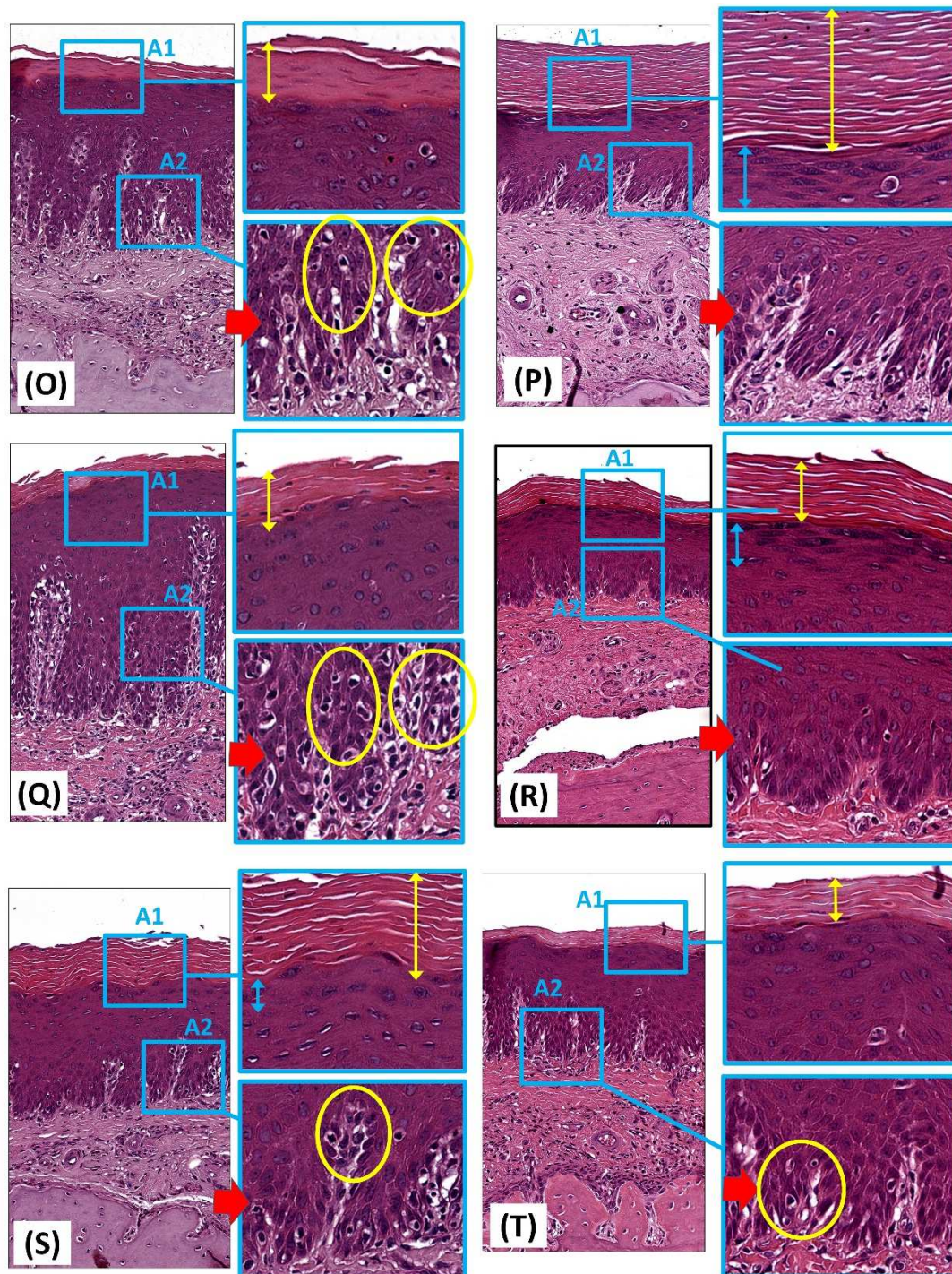


FIGURA 14 – Quadro histopatológico das amostras dos grupos testados. **Grupo Cix- Score 3 (O):** paraqueratose (seta amarela), hiperplasia epitelial com projeções longas e desorganizadas (seta vermelha) invadidas por células inflamatórias provenientes das papilas dérmicas (área circundada em amarelo). **Grupo Nis:βCD (P e Q)- Score 1 (P):** camada córnea espessa (seta amarela) e raras células inflamatórias (área circundada em amarelo); **Score 3 (Q):** paraqueratose (seta amarela), hiperplasia com projeções epiteliais longas e desorganizadas e células inflamatórias nas papilas dérmicas (área circundada em amarelo). **Grupo Cix:βCD (R, S e T)- Score 1 (R):** camada queratinizada espessa (seta amarela) acima da camada granulosa (seta azul); camada basal com papilas epiteliais rasas (seta vermelha) adjacente à lamina própria (LP) formada por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas; **Score 2 (S e T):** camada córnea espessa paraqueratinizada (seta amarela, camada granulosa reduzida (seta azul) e projeções epiteliais (setas vermelhas) com raras células inflamatórias (área circundada em amarelo). HE, 10× e 40×



Embora não tenha sido um dos objetivos do trabalho, fotografias representativas do palato dos grupos de animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento foram obtidas ao final do experimento, a fim de compará-las com os achados morfohistopatológicos. Para isso, os animais foram posicionados em uma maca estabilizadora com distância focal e iluminação padronizadas utilizando câmera digital (Canon EOS 500D; Canon Inc., NY, EUA) acoplada a uma mesa estativa. As fotografias obtidas podem ser visualizadas na Figura 15.

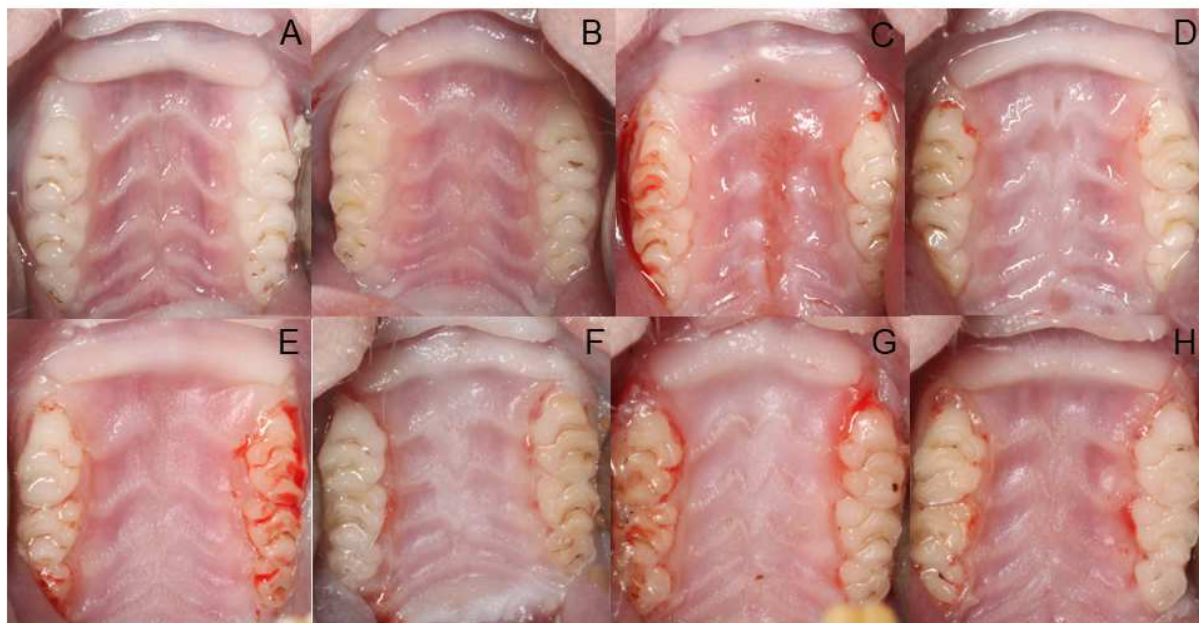


FIGURA 15 - Imagens representativas do palato dos animais ao final do experimento nos diferentes grupos testados: A: Cn; B: De, C: EP; D: Soft; E: Clx; F: Nis; G: Clx:βCD; H: Nis:βCD.

Assim como no Grupo Cn, os animais que utilizaram apenas o DIO estéril (Grupo De), não evidenciaram sinais clínicos de inflamação (Figuras 15A-B), o que corrobora com os achados morfohistopatológicos compatíveis com um tecido epitelial normal apresentado por suas amostras (Figuras 14A-C). Para o Grupo EP, as fotografias da mucosa palatina de suporte de todos os ratos mostraram sinais clínicos sugestivos do quadro da doença, com a presença de eritema e edema tecidual evidenciados, respectivamente, por petéquias e/ou áreas difusas avermelhadas e perda de nitidez das rugosidades palatinas (Figura 15C). Esses sinais foram compatíveis com os achados histopatológicos indicativos de inflamação e destruição epitelial previamente descritos para o grupo (Figuras 14D-F).

Em relação aos grupos de animais tratados, foi possível observar que, clinicamente, os animais que tiveram seus DIOs reembasados apenas com o material Softone (Grupo Soft) não tiveram seus tecidos de suporte totalmente recuperados, apresentando sinais de edema e, na maioria das vezes, erosão (Figura 14D). Tais achados clínicos foram condizentes com os escores da análise morfohistopatológica, que variaram para as amostras desse grupo entre graus de inflamação leve a intenso (2 e 5) (Figuras 14 G e F).

As mucosas palatinas sob os DIOs de ratos tratados dos Grupos Clx, Nis, Clx:βCD e Nis:βCD apresentaram-se clinicamente semelhantes entre si, sem sinais evidentes de inflamação. Nessas fotografias representativas, foi possível observar que o tratamento com a incorporação de fármacos complexados ou não em material macio temporário resultou em um aspecto esbranquiçado da mucosa palatina de suporte, sugestivo de queratinização e provável recuperação tecidual. Esse achado em específico corrobora com o espessamento da camada córnea encontrado nas amostras histopatológicas dos grupos tratados.

Alguns animais apresentaram sangramento na margem gengival dos molares decorrente de trauma gerado durante a remoção dos DIOs como ilustram as Figuras 15 C a 15 H, o que não pode ser considerado sinal clínico de estomatite protética.

---

---

### 4.3.2 Análise histométrica por planimetria computadorizada

Os resultados da análise histométrica por planimetria computadorizada podem ser visualizados nos gráficos da Figura 16.

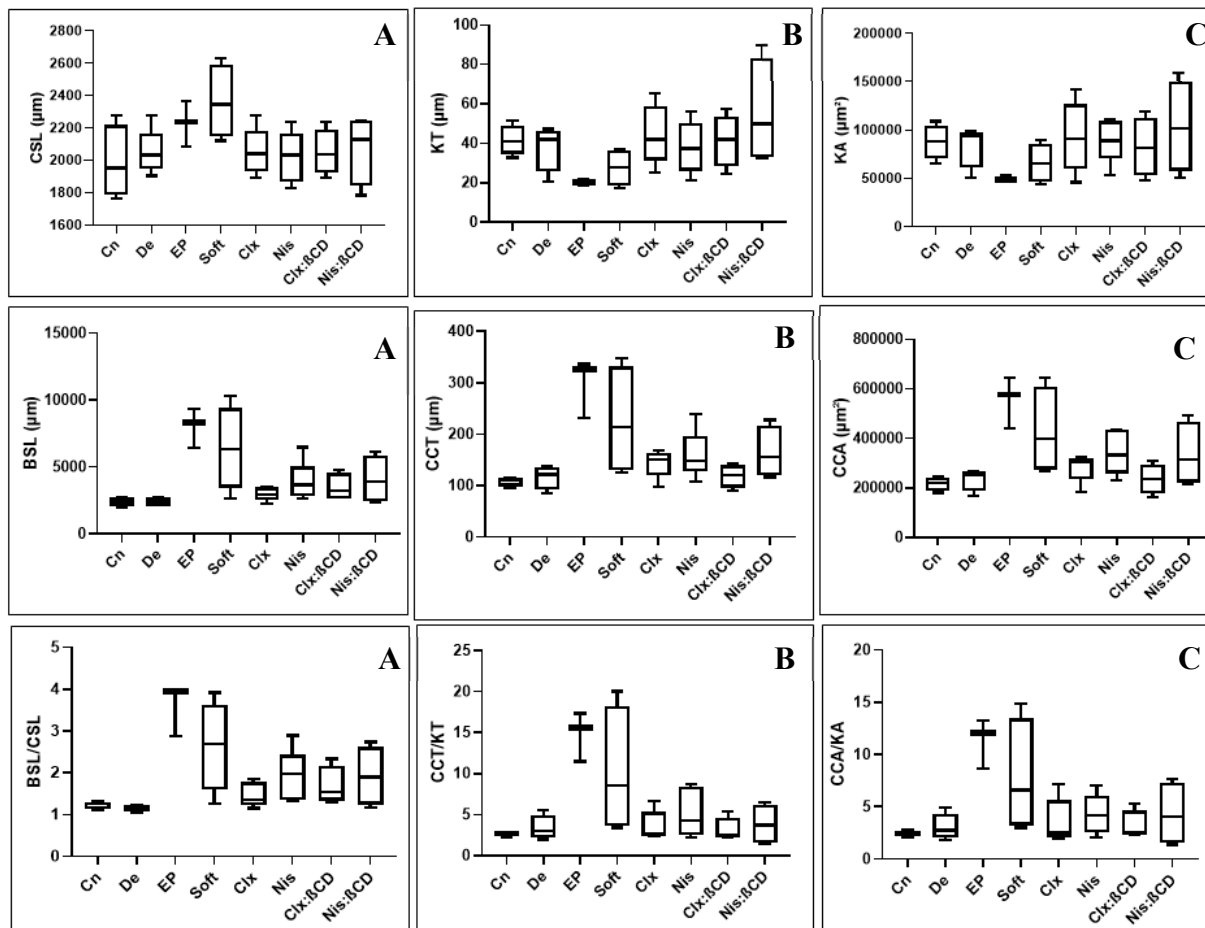


FIGURA 16 – Gráficos representativos das análises histopatológicas quantitativas a partir das imagens do epitélio do palato dos Grupos estudados. A: Comprimento; B: Espessura; C: Área.

Quanto ao comprimento da camada queratinizada (CSL), os Grupos EP e Soft apresentaram os maiores valores dentre todos os avaliados neste estudo. Para o compartimento celular (BSL), o Grupo EP exibiu medidas mais elevadas comparado aos demais, o que resultou também em maior relação BSL/CSL. No Grupo EP, a camada queratinizada e o compartimento celular apresentaram, respectivamente, os menores e os maiores valores quanto à espessura (KT e CCT) e área (KA e CCA). Esses resultados também foram observados de uma maneira menos evidente no Grupo Soft. Para as mesmas medidas, os Grupos Cn e De apresentaram uma tendência oposta, com maiores espessuras e áreas para a camada queratinizada e



menores para o compartimento celular. Os Grupos tratados seja com Clx, Nis ou fármacos complexados, Clx: $\beta$ CD e Nis: $\beta$ CD, mostraram resultados semelhantes em todos os parâmetros avaliados na planimetria computadorizada, com valores mais próximos aos Grupos Cn e De, e bem distintos daqueles apresentados pelos Grupos EP e Soft na maioria das condições avaliadas.

### 4.3.3 Correlação entre as análises morfohistopatológica e histométrica por planimetria computadorizada

Os gráficos da Figura 17 apresentam as possíveis correlações estabelecidas entre os escores da análise morfohistopatológica atribuídos às amostras do palato dos animais e os dados obtidos pela análise por planimetria computadorizada.

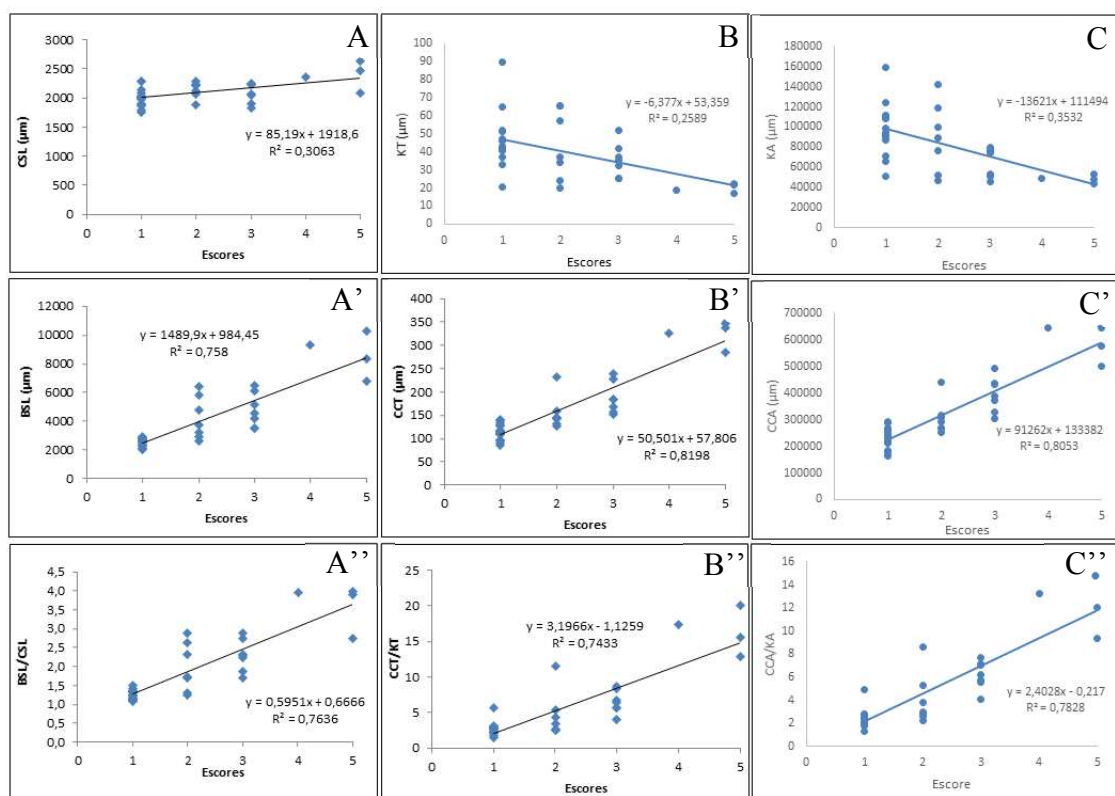


FIGURA 17 – Gráficos da correlação de Pearson entre os escores da análise morfohistológica e as mensurações da planimetria computadorizada na camada queratinizada (A, B e C), compartimento da camada celular (A', B' e C') e relação entre ambos (A'', B'' e C'') referentes às variáveis comprimento (A, A' e A''), espessura (B, B' e B'') e área (C, C' e C'').

As mensurações na camada queratinizada (A, B e C) apresentaram uma relação linear fraca com os escores atribuídos ( $R^2= 0,26$  a  $0,35$ ). Para as medidas obtidas no compartimento celular (A', B' e C'), uma relação linear forte foi observada com os escores da análise morfohistopatológica ( $R^2= 0,76$  a  $0,82$ ). O mesmo foi encontrado na relação entre as mensurações da camada queratinizada com aquelas do compartimento celular ( $R^2= 0,74$  a  $0,78$ ).

# 5 DISCUSSÃO

---

---



## 5 DISCUSSÃO

Um dos grandes desafios desse estudo foi a divergente informação na literatura sobre a indução de estomatite protética em modelo animal, o que dificulta sua padronização e reprodutibilidade (OLSEN, BONDEVIK, 1978; JOHNSON *et al.*, 2012, YANO *et al.*, 2016). A maioria dos estudos envolvendo modelo experimental murino de candidose oral não envolve a utilização de DIOs simuladores de próteses totais, sendo a doença desenvolvida no dorso da língua dos animais (MARTINS *et al.*, 2011; DOVIGO *et al.*, 2013; VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2015; WHIBLEY *et al.*, 2016; BASSIRI-JAHROMI *et al.*, 2018; BORGES *et al.*, 2018; RAHAYU *et al.*, 2018, SAKIMA *et al.*, 2018; SELEEM *et al.*, 2018), o que resulta em lesões bem distintas daquelas atróficas presentes nas mucosas de suporte de próteses acrílicas. Alguns estudos utilizaram DIOs como reservatório de *C. albicans*, pois o fungo foi inoculado diretamente no palato sob os dispositivos e/ou simplesmente colocado em sua superfície interna (OLSEN; BONDEVIK, 1978; NETT *et al.*, 2010; YANO *et al.*, 2016). Diferentemente, Tobouti *et al.* (2016) haviam sido os únicos autores que induziram estomatite protética com o auxílio de DIO previamente contaminado, o que é considerado mais próximo da condição clínica de pacientes com a doença.

Outro desafio metodológico referente aos modelos murinos de candidose oral refere-se à eficiente e à rápida resposta imunológica dos animais frente à exposição fúngica experimental (VERMA *et al.*, 2018), capacitando-os a eliminar tais microrganismos em poucos dias (CONTI *et al.*, 2014), o que dificulta a obtenção de um modelo animal confiável para o tratamento da doença induzida. Como a maioria das linhagens de ratos e camundongos não possui *C. albicans* como um fungo comensal, a resistência à infecção é atribuída à resposta imune inata induzida na cavidade bucal (HERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2013). Por isso, para a relevância científica e clínica do presente estudo, a indução de estomatite protética deveria ser adequada para um modelo no qual: a) os animais desenvolvessem a doença na mucosa sob um DIO previamente contaminado (TOBOUTI *et al.*, 2016), simulando o que acontece clinicamente com o usuário de próteses acrílicas parciais ou totais; b) a lesão induzida permanecesse na mucosa de suporte por um período suficiente para

---

permitir a avaliação da eficiência do tratamento proposto, dentro do qual os animais não tivessem apresentado resposta imunológica de forma a resolver por si a infecção.

A adequação metodológica para o modelo murino na investigação de Albach (2020) mostrou que o modelo de rato Wistar que utilizou DIO previamente contaminado com *C. albicans* por 4 dias sob antibioticoterapia com tetraciclina permitiu visualizar achados clínicos compatíveis com a doença, aumento enzimático das células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, além de alterações histopatológicas também condizentes com o quadro de estomatite protética (ALBACH, 2020). Ainda, o estudo revelou que os sinais da infecção reduzem significativamente a partir do quarto dia da remoção dos DIOs, mantendo-se por até 6 dias, quando as características inflamatórias regridem drasticamente. Apesar da permanência evidente dos sinais clínicos, histopatológicos e enzimáticos de inflamação por 4 dias no tecido palatal dos animais testados por Albach (2020), observou-se manutenção da recuperação fúngica após 2 dias da indução da estomatite protética, mas redução da contagem nos valores de UFC/mL após 4 dias. Frente a esses resultados, foram selecionados para o presente estudo os períodos de 4 dias para a indução da infecção na mucosa de suporte sob os DIOs e de 2 dias para a aplicação do tratamento. Assim, foi possível testar as terapias propostas, em acordo com o pico da doença no modelo animal, evitando resultados falso-positivos da resposta tecidual, que é o objetivo deste estudo. Segundo Samaranayake e Samaranayake (2001), normalmente os ratos são animais de escolha para a indução de candidose bucal, porém devem ser utilizados para estudos a curto prazo, corroborando com a adequação metodológica necessária a este estudo.

A triagem prévia dos animais foi uma importante fase para o desenvolvimento deste estudo a fim de selecionar aqueles *C. albicans*-negativos, uma vez que os ratos podem apresentar essa espécie na cavidade oral, mesmo não sendo um microrganismo comensal de sua cavidade bucal (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001). Essa etapa coloca a metodologia em vantagem, pois leva o primeiro contato do animal com o fungo ocorrer durante o experimento, diminuindo a contribuição da resposta imune inata do hospedeiro no processo de reparo da doença. O único estudo disponível na literatura a incluir tal condição na triagem dos animais foi o desenvolvido por Tobouti *et al.* (2016). Tais autores utilizaram o meio

---

cromogênico para identificação presuntiva de espécies de *Candida* (CHROMagar *Candida*), técnica também adotada na presente investigação.

Além da triagem dos animais, também foram tomados os devidos cuidados com a esterilização prévia dos DIOs em micro-ondas (MORAES, 2018; ALBACH, 2020). Tanto no presente trabalho, quanto no de Albach (2020), todos os animais triados eram *C. albicans*-negativos. Porém, no estudo prévio de Moraes (2018), foi identificada a presença de *C. albicans* na cavidade oral em 18,75% da amostra inicial de animais, os quais foram substituídos.

Os cuidados referentes ao bem-estar dos animais durante o experimento foram reproduzidos do estudo de Hotta *et al.* (2017), no qual a proposta foi padronizar a confecção e uso dos DIOs em ratos, com o intuito de simular próteses totais e possibilitar estudos *in vivo* relacionados à estomatite protética. Portanto, todos os 37 animais selecionados para essa pesquisa receberam a dieta pastosa e foram submetidos a técnicas de moldagem padronizadas para confecção dos DIOs (HOTTA *et al.*, 2017). Em relação ao consumo diário da tetraciclina na água de beber, não houve diferença entre os grupos, o que assegura o auxílio na indução da estomatite protética semelhante em todos os animais testados (Figura 12).

Os animais foram monitorados para assegurar a saúde durante todo o experimento. Foi observado que os ratos se mantiveram saudáveis, sem perda de peso (Figura 14), escurecimento dos pelos ou prostração. Apenas três animais foram excluídos da pesquisa por morte durante o complemento anestésico. Tal procedimento foi necessário, pois a ausência dessa etapa poderia levar à deglutição de *Candida* pelos animais durante a inoculação da mucosa palatina, prejudicando a colonização e infecção tecidual local (COSTA *et al.*, 2013). Nesse sentido, o efeito prolongado do anestésico pela injeção intraperitoneal de maleato de acepromazina 1% tem sua importância metodológica. Por outro lado, 22 animais foram excluídos do experimento por perda do DIO, seja durante a indução da estomatite protética ou na fase de tratamento. Nesta pesquisa, foram utilizados animais com 3 meses de idade, conforme os estudos prévios (HOTTA *et al.*, 2017; MORAES, 2018; HOTTA *et al.*, 2019; ALBACH, 2020). No entanto, o estudo atual propôs não somente a indução da doença, como Moraes (2018) e Albach (2020), ou apenas resposta histopatológica frente ao tratamento, como Hotta e colaboradores (2019), mas sim ambos, em uma

---

sequência experimental. Assim, durante a análise das imagens histopatológicas, foi possível observar frequente fratura óssea na região de sutura palatina. Tal achado, apesar de não ter comprometido a avaliação da doença no tecido epitelial dos animais, pode sugerir que o crescimento do palato dos animais foi impedido pela utilização dos DIOs, resultando em fraturas ósseas e consequente perda precoce dos dispositivos. Portanto, é possível recomendar em estudos futuros relacionados a utilização de animais que já tenham cessado a fase de crescimento (BARCLAY; MACDONALD; WATSON, 1997).

Apesar da homogeneidade e semelhança verificadas em uma dada amostra de ratos de mesmo sexo e idade, existem variações bem caracterizadas que podem resultar em anormalidades imunológicas e genéticas. Esses fatores podem refletir em síndromes de imunodeficiência anatômicas ou adquiridas nos modelos murinos (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001). Van Wyk, Basson e Gibson (1987) propuseram que diferenças genéticas dos ratos dentro de um estudo podem contribuir para resultados variados em relação às lesões bucais. Para minimizar esses efeitos, há grande importância em utilizar animais consanguíneos geneticamente homogêneos a fim de reproduzir lesões semelhantes. No presente estudo, 3 ninhadas de ratos diferentes foram utilizadas, pois a metodologia laboriosa levou à necessidade de trabalhar com grupos menores de animais. Portanto, é esperado que haja variação na resposta inflamatória entre os ratos avaliados, ainda que pertencentes a um mesmo grupo de estudo, como foi observado nesta investigação.

Por outro lado, a maioria dos dados da correlação entre as variáveis “escore” e mensurações da planimetria computadorizada mostraram forte relação linear. Assim, foi possível observar que, quanto maior o grau de inflamação e maior o escore atribuído, maiores foram as medidas para a camada do compartimento celular epitelial e menores foram aquelas referentes à camada queratinizada. Isso resultou também em forte correlação dos escores entre as camadas constituintes do epitélio (Figura 16). Assim, o tratamento da estomatite protética tem a tendência a uma recuperação tecidual, diminuindo o compartimento celular e suas atividades inflamatórias que levam ao aumento do epitélio, bem como a reestabilização da camada queratinizada perdida durante o processo da doença.

---



A estomatite protética induzida em ratos tem mostrado que se desenvolve de forma semelhante àquela observada em humanos, tanto nos parâmetros microscópicos, quanto histológicos (OLSEN; BONDEVIK, 1978, SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001, SUGIO *et al.*, 2020). Nos humanos, a lesão de estomatite protética pode variar em graus de inflamação, a depender de uma série de fatores, entre eles, o próprio hospedeiro. Um recente estudo clínico apresentou como diagnóstico em sua amostra clínica 50% de estomatite protética do Tipo I de Newton, 33% do Tipo II e 17% do Tipo III (GAUCH *et al.*, 2018). No presente estudo, todos os animais pertencentes ao Grupo EP desenvolveram evidentes sinais de inflamação nos aspectos histopatológicos e clínicos representativos. No entanto, de forma semelhante aos humanos, também foi observada variação de graus de inflamação nos animais do mesmo grupo. Esses achados já foram descritos em estudos anteriores, sendo encontradas variações da infecção no modelo animal, mesmo dentro do próprio modelo, o que se justifica pelas diferenças de incidência da contaminação no tecido, bem como aos atributos virulentos relacionados a *C. albicans* (ALLEN; BECK, 1983; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001).

As imagens histopatológicas aliadas aos achados das clínicas ilustrativas evidenciaram que somente o uso de um DIO não foi suficiente para mostrar alterações no palato dos animais. Os resultados do grupo De não se diferenciaram do grupo Cn em nenhum parâmetro avaliado, o que sugere a necessidade de contaminação prévia dos tecidos do palato e do DIO por *C. albicans*. Clinicamente, esses dados reforçam a importância dos hábitos de higiene e desinfecção das próteses (NEPPELENBROEK *et al.*, 2008; PROCÓPIO *et al.*, 2018; RAMAGE *et al.*, 2019) como meio de prevenção da infecção. Em relação ao grupo EP, foi possível visualizar em algumas regiões destruição total da camada queratinizada, com prolongamentos e projeções da camada basal do epitélio (Figuras 15E e 15F). As características histopatológicas encontradas neste estudo estão relacionadas à forma atrófica da infecção, observada nos Tipos I e II de Newton da estomatite protética associada à *Candida* spp. (MORIMOTO; KIHARA; SUETSUGU, 1987), onde não há a hiperplasia do tecido geralmente observada nos processos inflamatórios (KIRALY *et al.*, 2015; JALBERT; PIETRAS, 2018), como ocorre no Tipo III.

No Grupo Soft, foi observada a persistência dos sinais histopatológicos de inflamação, bem como dos aspectos clínicos observados nas fotografias

---

complementares desse estudo. A planimetria computadorizada mostrou que o epitélio dos animais que tiveram seus DIOS reembasados apenas com Softone, sem a incorporação de fármacos, apresentaram suas estruturas com medidas mais semelhantes aos animais do Grupo EP, ou seja, não tratados. Tais resultados sugerem que, apesar da importância da barreira física entre a prótese contaminada e a mucosa de suporte acometida pela estomatite protética (DAVENPORT, 1972; OHSHIMA *et al.*, 2018), o material macio por si não foi suficiente para recuperar os tecidos infectados durante o tratamento. Nesse sentido, é possível pressupor que reembasamento das próteses com materiais macios como única terapia para a doença não é resolutivo para a infecção, podendo ser recomendado como método de tratamento adjunto por impedir a reinfecção via prótese (DAVENPORT, 1972; MARÍN ZULUAGA *et al.*, 2011; OHSHIMA *et al.*, 2018).

Tem sido relatado que a infecção por *Candida* spp. é capaz de diminuir drasticamente a capacidade da atividade metabólica das células epiteliais da mucosa oral (HAVERMAN *et al.*, 2020), com consequente redução da defesa do epitélio contra a invasão fúngica (CASAROTO *et al.*, 2019). Apesar desses mecanismos da atuação fúngica no tecido epitelial não serem conhecidos, os estudos indicam que a presença de formas fúngicas patogênicas (pseudohifas e hifas) atrasa o reparo tecidual frente ao estímulo inflamatório. Jin *et al.* (2008) observaram que a infecção por *C. albicans* prejudica a cicatrização e recuperação tecidual em casos de úlceras duodenais, o que foi atribuído a menor capacidade proliferativa das células epiteliais nos grupos contaminados em relação àquele não contaminado. Tais dados reforçam a necessidade da terapia antifúngica no tratamento da estomatite protética, além das orientações de uso e higiene das próteses. Nesse contexto, as formas de terapia propostas no presente estudo se tornam promissoras (IQBAL *et al.*, 2016), uma vez que o material reembasador macio favorece a recuperação do tecido injuriado, atua como uma barreira física entre a base protética contaminada e o palato (DAVENPORT, 1972; OHSHIMA *et al.*, 2018) e, ao mesmo tempo, possibilita a liberação gradual do fármaco antifúngico (RIBEIRO *et al.*, 2010; TONGLAIROUM *et al.*, 2014; MURA *et al.*, 2015; TONGLAIROUM *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2018; ALEXANDRINO *et al.*, 2019; TRAJANO *et al.*, 2020) no local infectado por *Candida* spp.

---

Em relação à terapia antifúngica convencional, a incorporação de fármacos nos materiais macios temporários apresentam algumas vantagens, entre as quais (SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994; MATSUURA *et al.*, 1997; BUENO *et al.*, 2015): 1) o medicamento é liberado no local da infecção de forma gradual, podendo se manter em dose terapêutica satisfatória ao longo do tratamento; 2) a liberação lenta e contínua, em dose ajustada para o sistema de liberação do fármaco através do material reembasador, representa potencial redução dos efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos, que podem levar a sintomas secundários indesejados (MATSUURA *et al.*, 1997); 3) há uma redução da participação do paciente, que apenas deverá utilizar a prótese reembasada, eliminando a desvantagem da posologia rigorosa da terapia antifúngica convencional (SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994); 4) o reembasamento permite a readaptação da prótese à mucosa de suporte, promovendo o conforto ao paciente durante a vida útil desses materiais (MARÍN ZULUAGA; GOMEZ VELANDIA; RUEDA CLAUJIO, 2011), que é correspondente ao período de tratamento da doença com antifúngico tópico (14 dias) (SCHNEID, 1992; TRUHLAR; SHAY; SOHNLE, 1994); 4) a adição do fármaco nos materiais macios de curta duração ainda favorece a recuperação da mucosa injuriada pelo prevenção do acúmulo de biofilme, a qual é associada ao efeito de condicionamento tecidual até que a prótese seja substituída ou reembasada com materiais de longo prazo (SCHNEID, 1992).

Os grupos experimentais testados neste estudo tiveram como objetivo propor um tratamento efetivo que fosse biocompatível aos tecidos bucais, utilizando a menor dose de fármaco possível, a fim de evitar toxicidade e contribuir na prevenção de recidiva. As formas de tratamento abordadas neste estudo não alteraram a estrutura epitelial dos animais, atuaram contra a infecção fúngica e favoreceram a recuperação tecidual. Os resultados apresentados por todos os tratamentos propostos que utilizaram a incorporação de fármacos sugeriam sua efetividade para o modelo animal testado, independentemente do grau de inflamação apresentado frente à indução da doença. Com isso, é possível pressupor que tais protocolos podem ser considerados como promissores para os diferentes graus de inflamação por estomatite protética do tipo atrófica, desde pontos eritematosos (Tipo I) até eritema difuso (Tipo II). Como mencionado anteriormente, o modelo da doença desenvolvido por Albach (2020) e utilizado neste estudo foi caracterizado com a apresentação atrófica da estomatite

---

protética, não sendo observada hiperplasia papilar do palato, característica do Tipo III de Newton.

É importante ressaltar que a grande vantagem do uso de um complexo de inclusão, como as ciclodextrinas, no sistema de liberação gradual do fármaco, é a diminuição da dose administrada em comparação ao uso do fármaco em sua forma pura (VELOSO *et al.*, 2018). Isso é possível porque a complexação possibilita o aumento da solubilidade dos fármacos, em uma liberação mais controlada, melhorando sua biodisponibilidade e performance clínica. Neste estudo, embora tenham sido observados achados histopatológicos similares entre os grupos de tratamento que utilizaram a incorporação de antifúngico no condicionador tecidual, foram utilizadas concentrações de fármacos muito inferiores nas formulações complexadas em relação às puras (LACHOWICZ; STAŃCZAK; KOŁODZIEJCZYK, 2020). Essa redução é promovida pela maior solubilidade do fármaco e a consequente otimização da atividade antifúngica, o que pode clinicamente representar menor risco de toxicidade e menores efeitos adversos.

Apesar dos resultados satisfatórios em relação à atividade antifúngica do fármaco complexado, o estudo clínico de Cross *et al.* (2000a) observou efeitos gastrointestinais indesejáveis, como diarreia e cólicas estomacais em pacientes diagnosticados com estomatite protética e tratados com itraconazol associado à ciclodextrina na formulação líquida por via oral. Entretanto, tais resultados devem ser analisados com cautela, pois os autores utilizaram a mesma dose do itraconazol não complexado na formulação complexada (CROSS *et al.*, 2000a). A investigação de Veloso *et al.* (2018) demonstrou que a CIM do antifúngico complexado em uma formulação lipossômica foi 2,5 x menor comparada à fórmula pura, o que proporcionou, além de uma atividade sistêmica antifúngica favorável em camundongos, também menor acúmulo do medicamento nos rins e no fígado dos animais, indicando menor toxicidade sistêmica. Como mencionado previamente, no presente estudo, também foi utilizada menor dose do fármaco complexado para atingir a mesma efetividade antifúngica da forma pura (MORIKAVA, 2020). Para a Nis, a quantidade foi 50% menor e, para a Clx, apenas 7,5% da concentração foi utilizada, comparada à formulação não complexada.

---

São poucos estudos disponíveis na literatura que avaliaram o uso de fármacos complexados às ciclodextrinas na prevenção ou tratamento da candidose oral (CARTLEDGE *et al.*, 1994; CARTLEDGE *et al.*, 1997; CROSS *et al.*, 2000a; CROSS *et al.*, 2000b; RIBEITO *et al.*, 2010; TONGLAIROUM *et al.*, 2014; MURA *et al.*, 2015; TONGLAIROUM *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2018). Foi demonstrado que o antifúngico complexado é liberado de maneira muito rápida e constante, sendo capaz de inibir o crescimento fúngico de forma eficaz (RIBEITO *et al.*, 2010; TONGLAIROUM *et al.*, 2014; MURA *et al.*, 2015; TONGLAIROUM *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2018). Com base na premissa que a presença de formas patogênicas de fungos atrasa o reparo tecidual (JIN *et al.*, 2008), é possível, no presente estudo, que tenha ocorrido essa ação efetiva dos fármacos complexados nos grupos que o incorporaram nessa forma ao condicionador tecidual. Isso porque foi observada uma recuperação tecidual nos aspectos histopatológicos do palato dos animais, que se tornou compatível com a mucosa sadia.

A avaliação em modelo animal do uso de fármacos complexados com a dose ajustada a sua CIM no tratamento de estomatite protética são características inovadoras da presente investigação. Os achados foram promissores, no entanto há falta de estudos padronizados que utilizem antifúngicos complexados para a prevenção e o tratamento da estomatite protética em modelos murinos para afirmar sua efetividade e biocompatibilidade em nível local e sistêmico. Portanto, apurar a correlação clínica ainda é precipitado. São necessárias avaliações mais específicas em nível celular e molecular para atestar a biocompatibilidade tecidual local, bem como análises em nível sistêmico dos animais com a doença tratados nesta proposta de fármacos complexados.

---

---



## **6 CONCLUSÃO**

---

---





## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo e considerando as limitações de um modelo animal, foi possível concluir que:

- a) A indução de estomatite protética levou a alterações histopatológicas compatíveis com sinais de inflamação da doença e permitiu avaliar as alternativas terapêuticas subsequentes;
  - b) O tratamento com o material reembasador macio apenas não levou a recuperação total do tecido, havendo persistência de quadro histopatológico compatível com estomatite protética;
  - c) O tratamento com o material reembasador macio modificado com incorporação das concentrações inibitórias mínimas de nistatina e clorexidina em suas formas puras ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina levou a recuperação histopatológica tecidual da maioria dos animais com estomatite protética; no entanto, concentrações muito inferiores de antifúngicos complexados foram necessárias para se obter o mesmo grau de resposta tecidual em relação aos fármacos puros.
- 
-



# REFERÊNCIAS

---

---



## REFERÊNCIAS

Addy M, Handley R. The effects of the incorporation of chlorhexidine acetate on some physical properties of polymerized and plasticized acrylics. *J Oral Rehabil.* 1981 Mar;8(2):155-63.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;78(922):455-459.

Albach, T. Modelo de indução de estomatite protética em ratos Wistar sob antibioticoterapia. Ponta Grossa. Dissertação [Mestrado em Odontologia - área de concentração Clínica Integrada] – Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

Alcântara CS, Macêdo AF, Gurgel BC, Jorge JH, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of resilient liner modified by the addition of antimicrobial agentes to denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 2012 Nov-Dec;20(6):607-12.

Alexandrino FJR, Bezerra EM, Da Costa RF, Cavalcante LRL, Sales FAM, Francisco TS, et al. Rose Bengal incorporated to  $\alpha$ -cyclodextrin microparticles for photodynamic therapy against the cariogenic microorganism *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Mar;25:111-118.

Allen C M, Beck F M. Strain-related differences in pathogenicity of *C. albicans* for oral mucosa. *J Infect Dis.* 1983;147:1036–1040.

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995 Mar;12(3):413-20.

Aoun G, Berberi A. Prevalence of Chronic Erythematous Candidiasis in Lebanese Denture Wearers: a Clinico-microbiological Study. *Mater Socio Medica.* 2017; 29(1):26-29.

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 1;10 Suppl 1:E27-39.

Bail M, Meister LM, Campagnoli EB, Jorge JH, Ban Mde C, Sanchez-Ayala A, et al. Histopathological changes by the use of soft reline materials: a rat model study. *PLoS One.* 2014 Jun 25;9(6):e100293.

---

Balte AS, Goyal PK, Gejji SP. Theoretical studies on the encapsulation of paracetamol in the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrins. *J Chem Pharm Res.* 2012 Jun; 4(5):2391-9.

Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dent.* 2001;21(1):4-8

Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, De Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(1):51-9.

Barclay SC, MacDonald DG, Watson IB. The effect of chairside relining materials on rat palatal mucosa. *J Dent.* 1997 May-Jul;25(3-4):251-5.

Barnabé W, De Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(5):453-9.

Bassiri-Jahromi S, Pourshafie MR, Mirabzade Ardakani E, Hooshang Ehsani A, Doostkam A, Katirae F, et al. In Vivo Comparative Evaluation of the Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract as an Alternative Agent to Nystatin against Oral Candidiasis. *Iran J Med Sci.* 2018;43(3):296-304.

Bilhan H, Sulun T, Erköse G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O, et al. The role of *Candida albicans hyphae* and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clin Oral Investig.* 2009;13(4):363-8.

Borges AC, Lima GMG, Nishime TMC, Gontijo AVL, Kostov KG, Koga-Ito CY. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: In vivo study. *PLoS One.* 2018 Jun 27;13(6):e0199832.

Budtz-jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990;48(1):61-9.

Bueno MG, De Sousa EJB, Hotta J, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Surface properties of temporary soft liners modified by minimum inhibitory concentrations of antifungal s. *Braz Dent J.* 2017;28(2):158-164.

Bueno MG, Urban VM, Barbério GS, da Silva WJ, Porto VC, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Dis.* 2015;21(1):57-65.

---

Campanha NH, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE, MacHado AL, Giampaolo ET. The effect of long-term disinfection procedures on hardness property of resin denture teeth. *Gerodontology*. 2012;29(2):e571-6.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis?. *J Dent Res*. 1995;74(5):1152-1161.

Cartledge JD, Midgely J, Gazzard BG. Itraconazole solution: higher serum drug concentrations and better clinical response rates than the capsule formulation in acquired immunodeficiency syndrome patients with candidosis. *J Clin Pathol*. 1997;50(6):477-480.

Cartledge JD, Midgley J, Youle M, Gazzard BG. Itraconazole cyclodextrin solution--effective treatment for HIV-related candidosis unresponsive to other azole therapy. *J Antimicrob Chemother*. 1994;33(5):1071-1073.

Casaroto AR, da Silva RA, Salmeron S, de Rezende MLR, Dionísio TJ, dos Santos CF, et al. *Candida albicans*-Cell Interactions Activate Innate Immune Defense in Human Palate Epithelial Primary Cells via Nitric Oxide (NO) and  $\beta$ -Defensin 2 (hBD-2). *Cells*. 2019;8(7):707.

Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(3):327-332.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001;80(3):903-8.

Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995;74(3):309-13.

Chaves CA, Machado AL, Carlos IZ, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. *Dent Mater*. 2010 Oct;26(10):1017-23.

Chopde N, Pharande A, Khade MN, Khadtare YR, Shah SS, Apratim A. In vitro antifungal activity of two tissue conditioners combined with nystatin, miconazole and fluconazole against *Candida albicans*. *J Contemp Dent Pract*. 2012 Sep 1;13(5):695-8.

Conceição J, Farto-Vaamonde X, Goyanes A, Adeoye O, Concheiro A, Cabral-Marques H, et al. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-based fast dissolving carbamazepine

---

printlets prepared by semisolid extrusion 3D printing. *Carbohydr Polym.* 2019 Oct 1;221:55-62.

Conti HR, Huppler AR, Whibley N, Gaffen SL. Animal models for candidiasis. *Curr Protoc Immunol.* 2014 Apr 2;105:19.6.1-19.6.17.

Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence.* 2013;4(5):391-399.

Cross LJ, Bagg J, Aitchison TC. Efficacy of the cyclodextrin liquid preparation of itraconazole in treatment of denture stomatitis: comparison with itraconazole capsules. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Feb;44(2):425-7.

Cross LJ, Bagg J, Oliver D, Warnock D. Serum itraconazole concentrations and clinical responses in *Candida-associated* denture stomatitis patients treated with itraconazole solution and itraconazole capsules. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Jan;45(1):95-9.

Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MAO, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(3):351-8.

Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J.* 1972;1;133(3):101-5.

Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani CE. Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium. *PLoS One.* 2016 May 25;11(5):e0155427.

Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, Pavarina AC. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013 Apr;51(3):243-51.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: Identification of aetiological and predisposing factors - A large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(6):448-55.

Figueiral MH, Fonseca P, Lopes MM, Pinto E, Pereira-Leite T, Sampaio-Maia B. Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. *Open Dent J.* 2015;30;9:46-51.

---



Gauch LMR, Pedrosa SS, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Marques-da-Silva SH. Isolation of *Candida* spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2018;49(1):148-151.

Geerts GA, Stuhlinger ME, Basson NJ. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. *J Oral Rehabil.* 2008 Sep;35(9):664-9.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4):251-60.

González-Serrano J, Serrano J, López-Pintor RM, Paredes VM, Casañas E, Hernández G. Prevalence of Oral Mucosal Disorders in Diabetes Mellitus Patients Compared with a Control Group. *J Diabetes Res.* 2016;2016:5048967.

Haverman TM, Laheij AMGA, Nie M, Deng DM, Raber-Durlacher JE, de Soet JJ, et al. Exploring the role of oral microorganisms in the pathogenesis of mucositis by assessing their impact on metabolic activity and reproductive capacity of epithelial cells in vitro. *Support Care Cancer.* 2020 Jan 22.

Hernández-Santos N, Huppler AR, Peterson AC, Khader SA, McKenna KC, Gaffen SL. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunol.* 2013 Sep;6(5):900-10.

Hong G, Maeda T, Murata H, Sasaki K. The dynamic viscoelasticity and plasticizer leachability of tissue conditioners. *Gerodontology.* 2012 Dec;29(4):284-91.

Hotta J, Cral WG, Sakima VT, Lara VS, Urban VM, Neppelenbroek KH. Intraoral device for optimal antifungal delivery in a rat model. *Curr Drug Deliv.* 2017;14(5):658-667.

Hotta J, Garlet GP, Cestari TM, Lima JFM, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. In vivo biocompatibility of an interim denture resilient liner containing antifungal drugs. *J Prosthet Dent.* 2019 Jan;121(1):135-142.

Iqbal Z, Zafar MS. Role of antifungal medicaments added to tissue conditioners: A systematic review. *Journal of Prosthodontic Research.* 2016.

Jalbert E, Pietras EM. Analysis of Murine Hematopoietic Stem Cell Proliferation During Inflammation. *Methods Mol Biol.* 2018;1686:183–200.

Jin L, Yoshida M, Nakamura T, Ishikawa H, Wakabayashi G, Tanabe M, et al.

---

*Candida albicans* infection delays duodenal ulcer healing in cysteamine-induced duodenal ulcers in rats. *Dig Dis Sci*. 2008 Nov;53(11):2878-85.

Johnson CC, Yu A, Lee H, Fidel PL Jr, Noverr MC. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. *Infect Immun*. 2012;80(5):1736-1743.

Kansky AA, Didanovic V, Dovsak T, Brzak BL, Pelivan I, Terlevic D. Epidemiology of oral mucosal lesions in Slovenia. *Radiol Oncol*. 2018;11;52(3):263-266.

Kiraly O, Gong G, Olipitz W, Muthupalani S, Engelward BP. Inflammation-induced cell proliferation potentiates DNA damage-induced mutations in vivo. *PLoS Genet*. 2015;11(2):e1004901.

Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994;72(3):283-8.

Lachowicz M, Stańczak A, Kołodziejczyk M. Characteristic of Cyclodextrins: their role and use in the pharmaceutical technology [published online ahead of print, 2020 Jun 15]. *Curr Drug Targets*. 2020;10.2174/1389450121666200615150039.

Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, Ariyawardana A, D'Amato-Palumbo S, Fischer DJ, et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Supportive Care in Cancer*. 2010;18(8):985-92.

Lima JFM, Maciel JG, Arrais CAG, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Effect of incorporating antifungals on the water sorption and solubility of interim resilient liners for denture base relining. *J Prosthet Dent*. 2016;15(5):611-6.

Lima JFM, Maciel JG, Hotta J, Vizoto ACP, Honório HM, Urban VM, et al. Porosity of temporary denture soft liners containing antifungal agents. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(5):453-461.

Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Mar 16;10:1161-71.

MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *J Clin Periodontol*. 1997 Oct;24(10):753-60.

Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.

---

Trends in Microbiology. 2001;9(1):34-9.

Mainieri VC, Beck J, Oshima HM, Hirakata LM, Shinkai RS. Surface changes in denture soft liners with and without sealer coating following abrasion with mechanical brushing. Gerodontology. 2011 Jun;28(2):146-51.

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

Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Jan;111(1):71-7.

Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. J Med Microbiol. 1995;42(5):372-9.

Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. J Dent. 1997; 25(5):373-7.

McCabe JF, Carrick TE, Kamohara H. Adhesive bond strength and compliance for denture soft lining materials. Biomaterials. 2002 Mar;23(5):1347-52.

McMullan-Vogel CW, Jüde HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 1999; 14(3):183-9.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. J Prosthodont. 2008;17(4):312-317.

Moosazadeh M, Akbari M, Tabrizi R, Ghorbani A, Golkari A, Banakar M, et al. Denture Stomatitis and *Candida Albicans* in Iranian Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Dent (Shiraz, Iran). 2016;17(3 Suppl):283-292.

Moraes GS. Estudos de validação de indução de candidose bucal e de toxicidade sistêmica aguda em ratos wistar. Ponta Grossa. Dissertação [Mestrado em Odontologia - na área de concentração Clínica Integrada] – Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.

---

Morikava FS. Incorporação de complexos de inclusão nistatina: e clorexidina:β-ciclodextrina em material condicionador de tecido: efetividade antifúngica, caracterização físico-mecânica e liberação in vitro. Ponta Grossa. Tese [Doutorado em Odontologia - área de concentração Clínica Integrada] – Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

Morimoto K, Kihara A, Suetsugu T. Clinico-pathological study on denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 1987;14(6):513-522.

Mura P, Mennini N, Kosalec I, Furlanetto S, Orlandini S, Jug M. Amidated pectin-based wafers for econazole buccal delivery: formulation optimization and antimicrobial efficacy estimation. *Carbohydr Polym.* 2015;121:231–240.

Neppelenbroek KH, Lima JFM, Hotta J, Galitesi LL, Almeida ALPF, Urban VM. Effect of Incorporation of Antifungal Agents on the Ultimate Tensile Strength of Temporary Soft Denture Liners. *J Prosthodont.* 2018; 27(2):177-181.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35(11):836-46.

Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun.* 2010;78(9):3650-3659.

Neufeld AH. Canadian Federation of Biological Societies: Guiding Principles for the Care for Laboratory Animals. *Can Med Assoc J.* 1963;88(8):431.

Nevzatoğlu EU, Ozcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Investig.* 2007 Sep;11(3):231-6.

Ohshima T, Ikawa S, Kitano K, Maeda N. A proposal of remedies for oral diseases caused by *Candida*: A mini review. *Frontiers in Microbiology.* 2018; 9:9:1522.

Olsen I, Bondevik O. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand J Dent Res.* 1978;86(5):392-398.

Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Jul;90(1):82-6.

---

Paranhos H de FO, Bezzon OL, Davi LR, Felipucci DNB, Silva CHL da, Pagnano VO. Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. *Braz Oral Res.* 2014;28.pii:S1806-83242014000100234.

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

Pisani MX, Macedo AP, Oliveira Paranhos HDF, da Silva CHL. Effect of experimental *Ricinus communis* solution for denture cleaning on the properties of acrylic resin teeth. *Braz Dent J.* 2012;23(1):15-21.

Procópio ALF, da Silva RA, Maciel JG, Sugio CYC, Soares S, Urban VM, et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of denture base acrylic resin impregnated with cleaning agents after long-term immersion. *Toxicol In Vitro.* 2018;52:8-13.

Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Arch Oral Biol.* 2009;54(6):588-594.

Rahayu RP, Prasetyo RA, Purwanto DA, Kresnodi U, Iskandar RPD, Rubianto M. The immunomodulatory effect of green tea (*Camellia sinensis*) leaves extract on immunocompromised Wistar rats infected by *Candida albicans*. *Vet World.* 2018;11(6):765-770.

Ramage G, O'Donnell L, Sherry L, Culshaw S, Bagg J, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. Impact of frequency of denture cleaning on microbial and clinical parameters—a bench to chairside approach. *J Oral Microbiol.* 2019;11(1):1538437.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2004; 174(1):11-19.

Ribeiro AM, Figueiras A, Freire C, Santos D, Veiga F. Combining strategies to optimize a gel formulation containing miconazole: the influence of modified cyclodextrin on textural properties and drug release. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010;36(6):705–714.

Rivera C, Droguett D, Arenas-Márquez MJ. Oral mucosal lesions in a Chilean elderly population: A retrospective study with a systematic review from thirteen countries. *J Clin Exp Dent.* 2017;1;9(2):e276-e283.

---

Ryalat S, Darwish R, Amin W. New form of administering chlorhexidine for treatment of denture-induced stomatitis. *Ther Clin Risk Manag.* 2011;7:219-25.

Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. *Molecules.* 2018 Aug 19;23(8).

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

Salim N, Satterthwaite J, Rautemaa R, Silikas N. Impregnation with antimicrobials has an impact on degree of conversion and colour stability of acrylic liner. *Dent Mater J.* 2012b 31(6):1008-13.

Salonen MA, Raustia AM, Oikarinen KS. Effect of treatment of palatal inflammatory papillary hyperplasia with local and systemic antifungal agents accompanied by renewal of complete dentures. *Acta Odontol Scand.* 1996;54(2):87-91.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):398-429.

Sánchez-aliaga A, Pellissari CVG, Arrais CAG, Michél MD, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of soft lining materials with antifungal to a denture base acrylic resin. *Dent Mater J.* 2016;35(2):194-203.

Sánchez-Aliaga, A. Efeito da incorporação de fármacos antifúngicos sobre a morfologia de superfície e a liberação in vitro de materiais macios temporários para base de prótese. Ponta Grossa. Dissertação [Mestrado em Odontologia - na área de concentração Clínica Integrada] – Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2014.

Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust Dent J.* 1997; 42(5):343-6.

Scheibler E, da Silva RM, Leite CE, Campos MM, Figueiredo MA, Salum FG, et al. Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 2018 May;89:70-76.

Schneid TR. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. *Spec Care Dentist.* 1992;12(6):245-50.

---

Schoeffel AC. Desenvolvimento, caracterização e liberação in vitro de complexos de inclusão clorexidina: $\beta$ -ciclodextrina obtidos por diferentes métodos. Ponta Grossa. Dissertação [Mestrado em Odontologia - na área de concentração Clínica Integrada] – Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

Seleem D, Freitas-Blanco VS, Noguti J, Zancope BR, Pardi V, Murata RM. In Vivo Antifungal Activity of Monolaurin against *Candida albicans* Biofilms. Biol Pharm Bull. 2018;41(8):1299-1302.

Shelley H, Babu RJ. Role of Cyclodextrins in Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. J Pharm Sci. 2018;107(7):1741-1753.

Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. Journal of the American Geriatrics Society. 2002;50(3):535-43.

Silva MM, Mima EGDO, Colombo AL, Sanitá PV, Jorge JH, Massucato EMS, et al. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: A randomized clinical study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012; 114(4):469-79.

Singh K, Chand P, Singh BP, Patel CB. Study of the effect of surface treatment on the long term effectiveness of tissue conditioner. J Oral Sci. 2010 Jun;52(2):261-5.

Srinivasan M, Gulabani M. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. Indian J Dent Res. 2010;21(3):353-6.

Sudhapalli S, Sudhapalli S. Time Dependent Effect of a Denture Cleanser on the Sorption and Solubility of Four Soft Liners-An Invitro Study. J Clin Diagn Res. 2016 Apr;10(4):ZC100-3.

Sugio CYC, Garcia AAMN, Albach T, Moraes GS, Bonfante EA, Urban VM, et al. *Candida*-Associated Denture Stomatitis and Murine Models: What Is the Importance and Scientific Evidence? J Fungi (Basel). 2020 May 23;6(2):E70.

Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, Abe S. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. Microbiol Immunol. 2003;47(5):321-6.

Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. J Med Microbiol. 2004 Jun;53(Pt 6):495-500.

---

Tay LY, Herrera DR, Quishida CC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology*. 2012 Jun;29(2):e275-80.

Tobouti PL, Casaroto AR, de Almeida RS, de Paula Ramos S, Dionísio TJ, Porto VC, et al. Expression of Secreted Aspartyl Proteinases in an Experimental Model of *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2016 Feb;25(2):127-34.

Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fast-acting clotrimazole composited PVP/HP $\beta$ CD nanofibers for oral candidiasis application. *Pharm Res*. 2014;31(8):1893–1906.

Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication and Evaluation of Nanostructured Herbal Oil/Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin/Polyvinylpyrrolidone Mats for Denture Stomatitis Prevention and Treatment. *AAPS PharmSciTech*. 2016 Dec;17(6):1441-1449.

Trajano VCDC, Brasileiro CB, Henriques JAS, Cota LM, Lanza CR, Cortés ME. Doxycycline encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin for periodontitis: a clinical trial. *Braz Oral Res*. 2020 Jan 10;33:e112.

Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J Prosthet Dent*. 1994; 71(5):517-24.

Tumbarello M, Fiori B, Treccarichi EM, Posteraro P, Losito AR, de Luca A, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS One*. 2012;7(3):e33705.

Urban AM. Desenvolvimento, caracterização e liberação in vitro de complexos de inclusão nistatina: $\beta$ -ciclodextrina obtidos por diferentes métodos. Ponta Grossa. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

Urban VM, de Souza RF, Arrais CA, Borsato KT, Vaz LG. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. *J Prosthodont*. 2006 Sep-Oct;15(5):295-9.

Urban VM, Lima TF, Bueno MG, Giannini M, Arioli Filho JN, de Almeida ALPF, et al. Effect of the addition of antimicrobial agents on shore a hardness and roughness of soft lining materials. *J Prosthodont*. 2015;24(3):207-14.

---



Urban VM, Seó RS, Giannini M, Arrais CA. Superficial distribution and identification of antifungal/antimicrobial agents on a modified tissue conditioner by SEM-EDS microanalysis: a preliminary study. *J Prosthodont*. 2009 Oct;18(7):603-10.

Van Wyk C W, Basson N J, Gibson B M. Noninbred Sprague-Dawley germfree rats as a model for oral candidiasis. *J Dent Assoc South Afr*. 1987;42:683–687.

Velliyagounder K, Alsaedi W, Alabdulmohsen W, Markowitz K, Fine DH. Oral lactoferrin protects against experimental candidiasis in mice. *J Appl Microbiol*. 2015 Jan;118(1):212-21.

Veloso DFMC, Benedetti NIGM, Ávila RI, Bastos TSA, Silva TC, Silva MRR, et al. Intravenous delivery of a liposomal formulation of voriconazole improves drug pharmacokinetics, tissue distribution, and enhances antifungal activity. *Drug Deliv*. 2018 Nov;25(1):1585-1594.

Verma AH, Zafar H, Ponde NO, Hepworth OW, Sihra D, Aggor FEY, et al. IL-36 and IL-1/IL-17 Drive Immunity to Oral Candidiasis via Parallel Mechanisms. *J Immunol*. 2018 Jul 15;201(2):627-634.

Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology*. 2005; 22(3):168-76.

Whibley N, Tritto E, Traggiai E, Kolbinger F, Moulin P, Brees D, et al. Antibody blockade of IL-17 family cytokines in immunity to acute murine oral mucosal candidiasis. *J Leukoc Biol*. 2016 Jun;99(6):1153-64.

Wong SS, Kao RY, Yuen KY, Wang Y, Yang D, Samaranayake LP, et al. In vitro and in vivo activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. *PLoS One*. 2014 Jan 22;9(1):e85836.

Yano J, Yu A, Fidel PL, Jr., Noverr MC. Transcription Factors Efg1 and Bcr1 Regulate Biofilm Formation and Virulence during *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. *PLoS One*. 2016 11(7):e0159692.

Yarborough, A.; Cooper, L.; Duqum, I.; Mendonça, G.; McGraw, K.; Stoner, L. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. *J Prosthodont* 2016 (25):288-301.

Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses*. 2011;54(5):e344-e351.

---

Zhang LW, Fu JY, Hua H, Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: A systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases*. 2016;22(3):185-95.

# **ANEXOS**

---

---



Anexo a



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 048/2016**

Protocolo UEPG – 15589/2016

**Título** – *“Avaliação toxicológica em modelo animal de dispositivo palatal acrílico reembasado com condicionador de tecido modificado por antifúngicos”.*

Interessado: Gustavo Simão Moraes (mestrando) e Professora Vanessa Migliorini Urban PPG em Odontologia ([vanurban@yahoo.com](mailto:vanurban@yahoo.com))

**Data de Entrada** – 12/09/2016

**Resultado:** Aprovado

**Data/Prazo** – 17/11/2016 a 17/11/2018

**Considerações**

Prezados Gustavo Simão Moraes e Vanessa Migliorini Urban:

Em relação á utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de cem ratos Wistar, heterogênicos machos de 60 a 90 dias com peso 250-300 g.

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2016.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin  
**COORDENADORA**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo/ Process CEUA – 038/2018**

Protocolo UEPG – 12828/2018

**Título –** Projeto de pesquisa "Solicita 85 ratus norvegicus albinus para desenvolvimento do projeto de pesquisa "Modelo de indução de estomatite protética em ratos sob antibioticoterapia associada ou não à imunossupressão" (Mestrado da discente Thaís albach). Decisão: autorizada a utilização de 85 (oitenta e cinco) rattus norvegicus albinus)"

*Interessado: Vanessa Migliorini Urban (PPG Odontologia/UEPG)*

**e-mail:** [vanurban@yahoo.com](mailto:vanurban@yahoo.com)

**Data de Entrada – 20/08/2018**

**Resultado:** Aprovado

Prezada Professora Dra. Vanessa Migliorini Urban e Mestranda Thaís Albach:

**Considerações**

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 85 rattus norvegicus albinus para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 26 de outubro de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
CEUA/ Comissão de Ética no Uso de Animais

*Dra. Dionizia Xavier Scomparin*  
Prof. Dra. Dionizia Xavier Scomparin

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG