

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

THAÍS ALBACH

**MODELO DE INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS WISTAR SOB
ANTIBIOTICOTERAPIA**

PONTA GROSSA
2020

THAÍS ALBACH

**MODELO DE INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS WISTAR SOB
ANTIBIOTICOTERAPIA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de Concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban
Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Thaís Pochapski

PONTA GROSSA

2020

A325 Albach, Thaís
Modelo de indução de estomatite protética em ratos Wistar sob
antibioticoterapia / Thaís Albach. Ponta Grossa, 2020.
131 f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban.
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Thaís Pochapski.

1. Estomatite sob prótese. 2. Candida albicans. 3. Ratos Wistar. 4. Tetraciclina. 5. Combinação amoxicilina e clavulanato de potássio. I. Urban, Vanessa Migliorini. II. Pochapski, Márcia Thaís. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Clínica Integrada. IV.T.

CDD: 617.6

THAÍS ALBACH

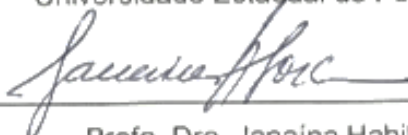
**“Modelo de indução de estomatite protética em ratos Wistar sob
antibioticoterapia”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Ponta Grossa, 14 de fevereiro de 2020.



Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Janaina Habib Jorge
Universidade Estadual Paulista



Profa. Dra. Marcela Claudino da Silva
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS CURRICULARES

Thaís Albach

NASCIMENTO 04.09.1995	Ponta Grossa – Paraná
FILIAÇÃO	Lucy Terezinha Albach Carlos Albach
2013-2017	Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa – Paraná
2018-2020	Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) Nível de Mestrado, Área de Concentração em Clínica Integrada. Linha de Pesquisa em Propriedades Físico- Químicas e Biológicas dos Materiais

Dedicatória

Aos meus pais **Carlos** e **Lucy**, por acreditarem que a única herança deixada aos filhos é a educação. Isso os senhores cumpriram brilhantemente. Obrigada por todo o tempo e amor investido ao longo desses anos. Obrigada pelo apoio e por sempre me impulsionarem mais longe para que hoje eu estivesse realizando mais esse sonho. Essa vitória também é de vocês.

Aos meus irmãos **Carlos Augusto** e **Patrícia**, que mesmo de longe, sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade. Tê-los como irmãos me faz ter orgulho da nossa família. Carrego vocês em pensamento, no meu coração e em minhas orações.

“Quem ama extremamente, deixa de viver em si e vive no que ama.”

Platão

Agradecimentos especiais

À minha orientadora **Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban**. Quando digo que não poderia ter escolhido uma orientadora melhor, espero que entenda o real sentido dessa expressão. E mesmo que eu agradeça diversas vezes, nunca conseguirei demonstrar minha eterna gratidão em tê-la conhecido e podido conviver com um ser verdadeiramente iluminado. Muito obrigada por ser um exemplo de pessoa, profissional, mãe e orientadora que é para mim e para todas as pessoas que te cercam. Como já dito outra vez: *“Só eu sei o quão grato sou pelos acasos que te tornaram minha orientadora”*.

Ao meu amigo **Gustavo Simão Moraes**. Não importa o quanto te agradeça por todos os conhecimentos que com muita paciência soube me ensinar. Saiba que é um exemplo de determinação e força de vontade para mim. Obrigada por todas as horas compartilhadas no laboratório, mas também compartilhadas entre reclamações e risadas. Tenho plena certeza de que encontrei um amigo em meio à minha pesquisa.

As minhas amigas, **Victoria e Falyne**. “...há um amigo mais chegado que um irmão”. Acredito que essa frase cabe perfeitamente em meu agradecimento. Muito obrigada pela ajuda na pesquisa, mas muito além disso, obrigada por muitas vezes serem a calma em meio a um turbilhão de acontecimentos. Obrigada por sempre me escutarem e por compartilharem um pouco da vida de vocês comigo.

“Tu te tornas extremamente responsável por aquilo que cativas”.

Saint-Exupéry

Agradecimentos

A **Deus**, por ter me carregado no colo nesses dois anos. Tenho plena convicção que foi somente por Ele que consegui chegar onde estou.

Aos professores da **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, por todo o apoio, palavras de ajuda e de amizade. Em especial:

À **Profa. Dra. Márcia Thaís Pochapski**, primeiramente obrigada por ter aceito ser minha co-orientadora, pela disposição em sempre sanar minhas dúvidas e principalmente pelos ensinamentos repassados.

Ao **Prof. Dr. Fabio André dos Santos**, por sempre esclarecer qualquer tipo de dúvida que pudéssemos ter, por estar sempre disposto em ajudar e pelo auxílio nas análises dos dados do meu trabalho.

Ao **Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, Prof. Dr. Marcelo Ferro e Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski**, por todos os ensinamentos relacionados à manipulação de animais de laboratório. Obrigada pela paciência e disponibilidade.

À **Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek**, por todo o auxílio prestado, pela vontade em nos ajudar sempre que necessário e por ter aceito analisar as fotografias dos animais. Sem sua ajuda, este trabalho não seria possível.

À **Carolina Yoshi Campos Sugio**, pela parceria realizada em nossa linha de pesquisa, pelas vindas a Ponta Grossa para nos ajudar, e por todas as análises realizadas para que hoje meu trabalho estivesse completo.

Às minhas amigas de Pós-Graduação **Amanda, Jéssica e Cristiane**. Vocês tornaram a caminhada nesses dois anos mais leve. Agradeço pelo ombro amigo, pelos momentos juntas e pela amizade construída. Espero que dure muitos anos.

A todos os funcionários da UEPG. Em especial, às funcionárias do Núcleo Avançado de Estudos da Vida, **Marilene e Josiana**, que sempre me atenderam com muito carinho e disposição. **Jana, Maurício e Brenda**, do laboratório de Microbiologia, que sempre me auxiliaram no decorrer da pesquisa e a **Bianca**, secretária da Pós-Graduação, que sempre esclareceu minhas dúvidas e se tornou uma amiga para mim.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, e à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPG, **Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda**, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo suporte financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado durante o transcorrer do Curso.

Obrigada!

"O segredo de um grande sucesso está no trabalho de uma grande equipe. Se quiser ir rápido, vá sozinho. Se quiser ir longe, vá em grupo."

Murillo Cintra de Oliveira Margarida

Albach, T. **Modelo de indução de estomatite protética em ratos Wistar sob antibioticoterapia** [Dissertação] Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

RESUMO

Objetivo: Esta Dissertação foi dividida em duas etapas. A primeira avaliou a efetividade da indução e duração da estomatite protética utilizando diferentes protocolos em ratos Wistar imunocompetentes sob antibioticoterapia e a segunda objetivou definir o protocolo mais adequado para a indução da estomatite protética em ratos imunocompetentes sob antibioticoterapia. **Material e métodos:** Dispositivos acrílicos foram confeccionados a partir de moldagens dos palatos dos animais utilizando moldeiras individuais e poliéster. Após esterilização, foram contaminados com inóculo de *Candida albicans* ($\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL). Na Etapa I, os animais foram submetidos à terapia antibiótica com tetraciclina (TTC; N=28) ou amoxicilina com ácido clavulânico (AAC; N=28) na água de beber antes de serem submetidos aos protocolos até o final do experimento. Então, foram divididos em 3 grupos: CN (n=2)= controle negativo; Di (n=6)= utilização de dispositivo estéril por 4 dias; In+DC (n=6)= inoculação de suspensão de *C. albicans* no palato e utilização de dispositivo contaminado por 4 dias; em 2 períodos: T0 ou T6 (N=14)= eutanásia após a remoção do dispositivo ou após acompanhamento por 6 dias de sua remoção, respectivamente. A presença de estomatite protética foi verificada por análise visual do palato e língua e por contagem de colônias (UFC/mL) a partir de coletas no palato utilizando swabs. Os palatos e línguas foram removidos para análise histopatológica descritiva. Na Etapa II, dois grupos foram avaliados: In+DC TTC e In+DC AAC (n=7)= inoculação de suspensão de *C. albicans* no palato e utilização de dispositivo contaminado por 4 dias sob administração de TTC ou AAC na água de beber por 4 dias, respectivamente. Os animais foram monitorados por mais 4 dias após a remoção dos dispositivos (T4) para verificação de sinais de estomatite protética por análise visual dos palatos e línguas e contagem de UFC/mL de *C. albicans* e *Candida* spp. a partir de coletas nos palatos e dos dispositivos. Após eutanásia, os palatos e línguas foram removidos para análises histopatológica descritiva, histométrica por planimetria digital, expressão de proliferação celular (PCNA) e dosagens de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG). Os dados foram analisados por: ANOVA 3-fatores de

medidas repetidas/Bonferroni (peso dos animais e UFC/mL – Etapa I), ANOVA 2-fatores de medidas repetidas/Bonferroni (peso dos animais – Etapa II, UFC/mL de *C. albicans* e *Candida* spp. no palato), ANOVA 1-fator (UFC/mL de *C. albicans* e *Candida* spp. dos dispositivos contaminados), teste t-Student (MPO e NAG nos palatos e línguas, planimetria digital e PCNA). Foram estabelecidas concordâncias intra e interexaminadores (n=2; coeficiente de Kappa k) e avaliados na Etapa I, escores de Edema e Eritema no palato e Despapilação na língua (Kruskal Wallis/Dunn e Mann-Whitney) e Erosão no palato (Fisher) e na Etapa II, escores de Edema e Eritema (Friedman/Dunn e Mann-Whitney) e Erosão no palato (Q-Cochran e Fisher) e Despapilação na língua (Friedman/Dunn e Wilcoxon). Todas as análises foram feitas a um nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Na Etapa I, foram observadas alterações clínicas nos palatos e línguas no grupo In+DC para todos os períodos e antibióticos utilizados. Houve redução progressiva na contagem de UFC/mL ao longo do tempo para ambos os antibióticos ($p<0,05$). Histologicamente, foram observados microabscessos, alterações da camada basal, edema intracelular e infiltrado inflamatório nos tecidos palatal e lingual em ambos os períodos e antibióticos administrados. Na Etapa II, foram obtidos achados semelhantes à Etapa I para a condição clínica dos palatos e línguas dos animais. Não houve diferença entre os antibióticos na contagem de UFC/mL de *C. albicans* no palato e do dispositivo contaminado. Para a contagem de *Candida* spp. nos palatos (T0) e dos dispositivos e dosagem de MPO no palato e na língua, foram obtidos maiores valores ($p<0,05$) para a administração de TCC. Foi obtida maior dosagem de NAG nas línguas dos animais submetidos à AAC ($p<0,05$). Não houve diferença ($p>0,05$) entre os antibióticos para as análises histométricas e PCNA. **Conclusão:** O modelo animal utilizando durante 4 dias dispositivo contaminado com *C. albicans* sob antibioticoterapia com tetraciclina resultou em alterações clínicas, enzimáticas e histológicas significantes compatíveis com estomatite protética, condição que perdurou por 4 dias após a remoção do dispositivo.

Palavras-chave*: Estomatite sob Prótese. *Candida albicans*. Ratos Wistar. Tetraciclina. Combinação Amoxicilina e Clavulanato de Potássio

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

Albach, T. **Denture stomatitis model in Wistar rats under antibiotic therapy** [Dissertação] Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

ABSTRACT

Objective: This Dissertation was divided into two stages. The first one evaluated the effectiveness of induction and duration of denture stomatitis using different protocols in immunocompetent Wistar rats under antibiotic therapy and the second one aimed to define the most appropriate protocol for the induction of denture stomatitis in immunocompetent rats under antibiotic therapy. **Material and methods:** Acrylic devices were made from impression of the animals' palates using individual trays and polyether. After sterilization, they were contaminated with *Candida albicans* inoculum ($\sim 2 \times 10^8$ CFU/mL). In Step I, the animals were submitted to antibiotic therapy with tetracycline (TTC; N=28) or amoxicillin with clavulanic acid (AAC; N=28) in drinking water before being submitted to the protocols until the end of the experiment. Then, they were divided into 3 groups: NC (n=2) = negative control; De (n=6) = use of a sterile device for 4 days; In+CD (n=6) = inoculation of *C. albicans* suspension on the palate and use of contaminated device for 4 days; in 2 periods: T0 or T6 (N=14) = euthanasia after removal of the device or after 6 days of removal, respectively. The presence of denture stomatitis was verified by visual analysis of the palate and tongue and by colony count (CFU/mL) from collections on the palate using swabs. The palates and tongues were removed for descriptive histopathological analysis. In Stage II, two groups were evaluated: In+CD TTC and In+CD AAC (n=7) = inoculation of *C. albicans* suspension on the palate and use of a contaminated device for 4 days under TTC or AAC administration in drinking water for 4 days, respectively. The animals were monitored for another 4 days after the removal of the devices (T4) for signs of denture stomatitis by visual analysis of the palates and tongues and CFU/mL count of *C. albicans* and *Candida* spp. from collections on the palates and devices. After euthanasia, the palates and tongues were removed for descriptive histopathological analysis, histometric analysis by digital planimetry, analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) measurements. The data were analyzed by: three-ways repeated measures ANOVA/Bonferroni (weight of animals and CFU/mL - Stage I), two-ways repeated

measures ANOVA/Bonferroni (weight of animals - Stage II, CFU/mL of *C. albicans* and *Candida* spp. on the palate), one-way ANOVA (CFU/mL of *C. albicans* and *Candida* spp. from contaminated devices), Student's t-test (MPO and NAG on the palates and tongues, digital planimetry, and PCNA). Intra and inter-examiner agreements (n=2; Kappa coefficient k) were established and evaluated in Stage I, scores of Edema and Erythema on the palate and Depapillation of the tongue (Kruskal Wallis/Dunn and Mann-Whitney) and Erosion on the palate (Fisher) and in Stage II, Edema and Erythema scores (Friedman/Dunn and Mann-Whitney) and Erosion on the palate (Q-Cochran and Fisher) and Depapillation of the tongue (Friedman/Dunn and Wilcoxon). All analyzes were performed at a 95% significance level ($\alpha=0.05$). **Results:** In Stage I, clinical changes were observed on the palates and tongues in the In+CD group for all periods and antibiotics used. There was a progressive reduction in the CFU/mL count over time for both antibiotics ($p<0.05$). Histologically, microabscesses, changes in the basal layer, intracellular edema, and inflammatory infiltrate in the palate and tongue were observed in both periods evaluated and antibiotics administered. In Stage II, similar findings to Stage I were obtained for clinical condition of palates and tongues of animals. There was no difference between antibiotics in the CFU/mL count of *C. albicans* on the palate and in the contaminated device. For the count of *Candida* spp. on the palates (T0) and devices and MPO dosage in the palate and tongue, higher values ($p<0.05$) were obtained for the administration of TTC. Higher levels of NAG were obtained in the tongue of animals submitted to AAC ($p<0.05$). There was no difference ($p>0.05$) between antibiotics for histometric and PCNA analyses. **Conclusion:** The animal model using a device contaminated with *C. albicans* for 4 days under antibiotic therapy with tetracycline resulted in significant clinical, enzymatic, and histological changes compatible with prosthetic stomatitis, a condition that lasted for 4 days after removal of the device.

Keywords*: Denture Stomatitis. *Candida albicans*. Wistar Rats. Tetracycline. Amoxicillin-Potassium Clavulanate Combination

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Fluxograma da Etapa I.....	33
FIGURA 2 -	Linha do Tempo Etapa I.....	34
FIGURA 3 -	Moldagem, vazamento e enceramento dos modelos de trabalho.....	38
FIGURA 4 -	Inclusão em mufla e polimerização dos dispositivos acrílicos..	39
FIGURA 5 -	Acabamento e polimento dos dispositivos.....	40
FIGURA 6 -	Preparo do inóculo.....	41
FIGURA 7 -	Dispositivos imersos no meio de cultura após período de formação de biofilme.....	42
FIGURA 8 -	Dispositivo cimentado nos molares superiores do rato.....	43
FIGURA 9 -	Dispositivo após remoção.....	44
FIGURA 10 -	Posicionamento dos animais em maca estabilizadora e utilização de mesa estativa para obtenção de fotografias padronizadas.....	45
FIGURA 11 -	Coleta de biofilme na mucosa palatal do animal.....	46
FIGURA 12 -	Resultados das pesagens (g) dos animais.....	50
FIGURA 13 -	Imagens representativas dos palatos dos animais sob antibioticoterapia com tetraciclina.....	52
FIGURA 14 -	Imagens representativas dos palatos dos animais sob antibioticoterapia com amoxicilina associada a ácido clavulânico.....	53
FIGURA 15 -	Imagens representativas das línguas dos animais sob antibioticoterapia com tetraciclina.....	54
FIGURA 16 -	Imagens representativas das línguas dos animais sob antibioticoterapia com amoxicilina associada a ácido clavulânico.....	55
FIGURA 17 -	Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Edema.....	57
FIGURA 18 -	Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Eritema.....	59
FIGURA 19 -	Distribuição percentual da presença e ausência da Erosão....	61

FIGURA 20 - Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Despapilação.....	63
FIGURA 21 - Resultados da contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i> ao longo do tempo com diferentes regimes antibióticos.....	65
FIGURA 22 - Fotomicrografias representativas dos palatos dos animais dos grupos CN e Di em T0 e T6 com administração de diferentes regimes antibióticos.....	66
FIGURA 23 - Fotomicrografias representativas das línguas dos animais dos grupos CN e Di em T0 e T6 com administração de diferentes regimes antibióticos.....	67
FIGURA 24 - Fotomicrografias representativas dos palatos dos animais do grupo In+DC em T0 com administração de diferentes regimes antibióticos (aumento de 200x).....	68
FIGURA 25 - Fotomicrografias representativas dos palatos dos animais do grupo In+DC em T6 com administração de diferentes regimes antibióticos (aumento de 200x).....	69
FIGURA 26 - Fotomicrografias representativas das línguas dos animais do grupo In+DC em T0 com administração de diferentes regimes antibióticos (aumento de 200x).....	70
FIGURA 27 - Fotomicrografias representativas das línguas dos animais do grupo In+DC em T6 com administração de diferentes regimes antibióticos (aumento de 200x).....	71
FIGURA 28 - Fluxograma da Etapa II.....	72
FIGURA 29 - Linha do Tempo Etapa II.....	73
FIGURA 30 - Fotomicrografia representativa da análise quantitativa do comprimento da superfície córnea e da superfície basal.....	77
FIGURA 31 - Fotomicrografia representativa da análise quantitativa da espessura de queratina e do compartimento celular.....	78
FIGURA 32 - Fotomicrografia representativa da análise quantitativa da área de queratina e de compartimento celular.....	78
FIGURA 33 - Resultados das pesagens (g) dos animais.....	82

FIGURA 34 -	Imagens representativas dos palatos dos animais ao longo do período experimental com diferentes regimes antibióticos.....	83
FIGURA 35 -	Imagens representativas das línguas dos animais ao longo do período experimental com diferentes regimes antibióticos.....	84
FIGURA 36 -	Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Edema.....	85
FIGURA 37 -	Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Eritema.....	86
FIGURA 38 -	Distribuição percentual da presença e ausência da Erosão....	87
FIGURA 39 -	Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Despapilação.....	88
FIGURA 40 -	Resultados da contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i> das coletas nos palatos dos animais.....	89
FIGURA 41 -	Resultados da contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i> das coletas nos dispositivos intra-orais dos animais.....	90
FIGURA 42 -	Resultados da contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> ssp. nos palatos dos animais.....	91
FIGURA 43 -	Resultados da contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> ssp. nos dispositivos intra-orais dos animais.....	92
FIGURA 44 -	Resultado da dosagem de mieloperoxidase nos palatos.....	93
FIGURA 45 -	Resultado da dosagem de mieloperoxidase nas línguas.....	93
FIGURA 46 -	Resultado da dosagem de N-acetilglucosaminidase nos palatos.....	94
FIGURA 47 -	Resultado da dosagem de N-acetilglucosaminidase nas línguas.....	95
FIGURA 48 -	Fotomicrografias representativas dos palatos dos animais em T4 com administração de diferentes regimes antibióticos.....	96
FIGURA 49 -	Fotomicrografias representativas das línguas dos animais em T4 com administração de diferentes regimes antibióticos (aumento de 200x).....	98

FIGURA 50 -	Resultado do comprimento da superfície basal.....	100
FIGURA 51 -	Resultado do comprimento da superfície córnea.....	100
FIGURA 52 -	Resultado da relação do comprimento da superfície basal e comprimento da superfície córnea.....	101
FIGURA 53 -	Resultado da área de compartimento celular.....	101
FIGURA 54 -	Resultado da área de queratina.....	102
FIGURA 55 -	Resultado da relação da área de compartimento celular com a área de queratina.....	102
FIGURA 56 -	Resultado da espessura de compartimento celular.....	103
FIGURA 57 -	Resultado da espessura de queratina.....	103
FIGURA 58 -	Resultado da relação da espessura de compartimento celular e espessura de queratina.....	104
FIGURA 59 -	Resultado da expressão de proliferação celular.....	105
FIGURA 60 -	Fotomicrografia representativa de PCNA controle negativo.....	106
FIGURA 61 -	Fotomicrografia representativa de PCNA controle positivo.....	106
FIGURA 62 -	Fotomicrografia representativa de PCNA do palato com regime antibiótico tetraciclina.....	107
FIGURA 63 -	Fotomicrografia representativa de PCNA do palato com regime antibiótico amoxicilina com ácido clavulânico.....	107

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	DISPOSITIVOS PALATAIS PARA RATOS.....	21
2.2	INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS.....	24
2.2.1	Em Animais Imunocompetentes.....	24
2.2.2	Em Animais Imunocompetentes Sob Antibioticoterapia.....	28
2.2.3	Em Animais Imunossuprimidos.....	28
2.3	MÉTODOS PARA ANÁLISE DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM MODELOS ANIMAIS.....	29
2.3.1	<i>Contagem De UFC/mL.....</i>	29
2.3.2	<i>Análise Visual.....</i>	29
2.3.3	<i>Análise Histopatológica Descritiva.....</i>	30
2.3.4	<i>Análise Histométrica Por Planimetria Digital.....</i>	30
2.3.5	<i>Expressão De Proliferação Celular (PCNA).....</i>	31
2.3.6	<i>Dosagem De Mieloperoxidase (MPO) E N-acetilglucosaminidase (NAG).....</i>	31
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	ETAPA I- MODELO DE INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA: AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DA INFECÇÃO.....	33
4.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1.1	Delineamento Experimental.....	33
4.1.2	Animais E Grupos De Experimentação.....	34
4.1.3	Confecção Dos Dispositivos Intra-Orais.....	37
4.1.4	Obtenção Do Inóculo De <i>C. Albicans</i>	40
4.1.5	Contaminação Dos Dispositivos Intra-Orais.....	42
4.1.6	Inoculação E Fixação Dos Dispositivos Intra-Orais.....	42
4.1.7	Avaliação Da Indução E Duração Da Estomatite Protética Em Ratos Imunocompetentes Sob Antibioticoterapia.....	44

4.1.7.1	Análise visual.....	44
4.1.7.2	Contagem de UFC/mL.....	45
4.1.7.3	Análises histopatológicas.....	46
4.1.7.3.1	<i>Processamento das amostras histológicas.....</i>	47
4.1.7.3.2	<i>Obtenção das fotomicrografias e análise histopatológica descritiva.....</i>	47
4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS.....	49
5.1	AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DA ESTOMATITE PROTÉTICA INDUZIDA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA.....	49
5.1.1	Triagem Dos Animais.....	49
5.1.2	Monitoramento Dos Animais.....	49
5.1.3	Análise Visual.....	51
5.2	CONTAGEM DE UFC/mL.....	64
5.3.	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	65
6	ETAPA II- DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA.....	72
6.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	72
6.1.1	Delineamento Experimental.....	72
6.1.2	Animais E Grupos De Experimentação.....	73
6.1.3	Análise Visual.....	73
6.1.4	Contagem De UFC/mL.....	74
6.1.4.1	Contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i> e <i>Candida</i> spp. dos palatos	74
6.1.4.2	Contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i> e <i>Candida</i> spp. dos dispositivos intra-orais.....	74
6.2	DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO) E N-ACETILGLUCOSAMINIDASE (NAG).....	74
6.3	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	78
6.3.1	<i>Processamento Das Amostras Histopatológicas.....</i>	78
6.3.2	<i>Obtenção Das Fotomicrografias E Análise Descritiva.....</i>	78
6.3.3	<i>Análise Histométrica Dos Palatos Por Planimetria Digital.....</i>	78
6.3.4	<i>Expressão De Proliferação Celular (PCNA).....</i>	79

6.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
7	RESULTADOS.....	81
7.1	TRIAGEM DOS ANIMAIS.....	81
7.2	MONITORAMENTO DOS ANIMAIS.....	81
7.3	ANÁLISE VISUAL.....	82
7.4	CONTAGEM DE UFC/mL.....	88
7.4.1	<i>UFC/mL De C. albicans Nos Palatos.....</i>	<i>88</i>
7.4.2	<i>UFC/mL De C. albicans Nos Dispositivos Intra-Orais.....</i>	<i>89</i>
7.4.3	<i>UFC/mL De Candida ssp. Nos Palatos.....</i>	<i>90</i>
7.4.4	<i>UFC/mL De Candida ssp. Nos Dispositivos Intra Orais.....</i>	<i>91</i>
7.5	ANÁLISES ENZIMÁTICAS.....	92
7.5.1	Dosagem De MPO.....	92
7.5.2	Dosagem De NAG.....	94
7.6	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	95
7.6.1	Análise Histopatológica Descritiva.....	95
7.6.2	Análise Histométrica Dos Palatos Por Planimetria Digital.....	99
7.6.3	Expressão De Proliferação Celular (PCNA).....	104
8	DISCUSSÃO.....	108
9	CONCLUSÃO.....	116
	REFERÊNCIAS.....	117
	ANEXO A - Autorização para uso de animais em pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) para o Estudo I.....	125
	ANEXO B - Protocolo de processamento histológico (histotécnico)–UEPG	126
	ANEXO C - Protocolo de coloração Hematoxilina–Eosina (H.E.) (AFIP/USA) – UEPG.....	127
	ANEXO D - Autorização para uso de animais em pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) para o Estudo II.....	128
	ANEXO E- Protocolo de processamento histológico – FOB-USP.....	129
	ANEXO F - Protocolo de coloração Hematoxilina–Eosina (H.E.) FOB-USP..	130
	ANEXO G - Protocolo de coloração para Imuno-histoquímica PCNA (FOB-USP).....	131

INTRODUÇÃO

A estomatite protética é caracterizada como uma doença com alta taxa de recidiva¹ que acomete principalmente pacientes idosos² que utilizam próteses parciais e totais removíveis.³ Possui etiologia multifatorial com fatores locais e sistêmicos, tais como trauma constante da mucosa subjacente a próteses mal adaptadas, uso de próteses muito antigas e durante o período de sono, hipossalivação, higienização deficiente, deficiências nutricionais, quadros de imunossupressão, alterações endócrinas, dentre outros.^{1,2,4-8} Porém, o principal fator causal é a infecção por *Candida* spp., mais comumente *Candida albicans*.^{4,5,9,10,11} Foi primeiramente classificada por Newton¹² como Tipo I - inflamação localizada ou hiperemia pontual, sendo a mais comum; Tipo II - eritema difuso e Tipo III – inflamação com hiperplasia papilar. Ainda que raramente cause algum desconforto, essa doença deve ser corretamente tratada, pois sua progressão pode resultar em infecções sistêmicas⁵ de tratamento mais dificultoso.

Para o desenvolvimento da estomatite protética, faz-se necessária a formação de um biofilme, que progride em três fases distintas. Na fase inicial, células de *Candida* aderem à superfície de um substrato e glicoproteínas são liberadas para facilitar a sua adesão. Dentro de 3 a 4 horas, colônias de pequeno porte começam a aparecer. Na fase intermediária, o biofilme é composto por leveduras, tubos germinativos e hifas jovens com uma matriz extracelular polimérica. Essa fase desenvolve-se em um período de 12 a 30 horas. Na última fase ocorre a maturação. O material extracelular aumenta, enquanto as leveduras e hifas são totalmente incorporadas à matriz e esse processo leva de 38 a 72 horas.¹³ A transição morfológica de levedura para o estado hifal é um fator essencial da atividade patogênica de *Candida albicans*, pois assim são capazes de produzir proteinases ácidas causadoras de danos à mucosa oral.^{14,15}

Uma série de tratamentos tem sido recomendada, como terapia antifúngica tópica, melhora na higiene oral, desinfecção das próteses, descontinuação do uso noturno, reembasamento e confecção de novas próteses, terapia antifúngica sistêmica, terapia fotodinâmica, laserterapia e uma combinação desses métodos também podem ser alternativas viáveis.^{1,5,16} Entretanto, o maior desafio encontrado para o tratamento dessa condição refere-se às altas taxas de recidiva clínica e reinfecção pelo fungo.¹⁷ Essa reincidência tem sido atribuída à concentração insuficiente dos fármacos sobre a superfície protética que mantém contato com os

tecidos bucais, haja vista que ocorre a formação de um complexo biofilme microbiano em profundidade na resina acrílica.^{17,18} Nesse contexto, tratamentos alternativos têm sido propostos, porém, anteriormente à realização de ensaios clínicos, faz-se necessário comprovar a efetividade e, principalmente, a segurança dos mesmos.¹⁹

Para isso, torna-se fundamental estabelecer um modelo de estomatite protética in vivo para melhor elucidar seus mecanismos e características acerca de sua patogênese. São encontrados diversos protocolos na literatura, sendo que alguns estudos induzem a doença em modelos murinos via contaminação de dispositivos intra-orais,²⁰⁻²² outros por meio da inoculação do fungo diretamente na cavidade bucal dos animais²³⁻²⁵ e outros que associam a infecção fúngica à antibioticoterapia²⁶ ou imunossupressão.²⁰ Apesar do grande número de protocolos, não há comprovação sobre um método que induza e mantenha a infecção em modelo murino após a remoção do fator causal principal durante um período suficiente para a avaliação da efetividade de novos materiais e fármacos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O levantamento bibliográfico deste estudo teve como bases de dados o *Pubmed*, *Scielo*, *Lilacs*, *Bireme* *ProQuest* e o *ScienceDirect*. Foram selecionados trabalhos que descreveram o desenvolvimento de dispositivos palatais para ratos Wistar e trabalhos de indução de estomatite protética em animais imunocompetentes, imunocompetentes sob antibioticoterapia e imunossuprimidos, utilizando os termos: *palate*, *rat* e *candidosis*. Para ambos os levantamentos, as palavras chave foram empregadas isoladamente ou de forma cruzada, abrangendo o período de 1983 a 2019.

2.1 DISPOSITIVOS PALATAIS PARA RATOS

Procurando viabilizar a utilização de dispositivos intra-orais em modelos murinos para a posterior indução da estomatite protética, alguns *designs* e técnicas de confecção vêm sendo propostos. Em 1990, Jennings e MacDonald²⁷ confeccionaram dispositivos palatais individualizados por meio da moldagem utilizando polissulfeto. Os aparatos contavam com uma banda de aço inoxidável ao redor dos incisivos superiores e, para auxiliar na sua retenção, foram confeccionados entalhes na região distal desses dentes. Barclay e colaboradores,²⁸ em 1997, também moldavam o palato dos ratos com polissulfeto. Os dispositivos eram retidos por uma banda metálica cimentada na região dos incisivos superiores com resina acrílica e fios de aço inoxidável eram soldados para unir essa porção ao restante do aparato. No ano de 2011, Lee et al.²² desenvolveram um aparato mais complexo composto por duas porções: uma fixa e uma removível. Na parte posterior do palato, o dispositivo foi fixado com resina acrílica. A parte removível era instalada na porção anterior do palato por meio de dois ímãs incluídos na porção fixa.

Com o intuito de avaliar alterações decorrentes do uso de dispositivos palatais acrílicos, Jennings e MacDonald²⁷ concluíram que os dispositivos poderiam ser utilizados satisfatoriamente por 28 dias, entretanto, o acúmulo de debris alimentares poderia ser um problema. Na avaliação microscópica, foi observado que o material acumulado sob os dispositivos era queratina descamada e debris alimentares e que o epitélio dos palatos do grupo experimental apresentava-se mais espesso que o do grupo controle. Barclay e colaboradores²⁸ avaliaram animais com alimentação

diversa: ração sólida convencional, ração pastosa e dieta líquida. Observou-se variação individual no peso dos animais durante o estudo, porém aqueles que receberam dieta pastosa foram os que apresentaram menor acúmulo de debris alimentares, sem alterações significativas de peso com o grupo controle. O uso dos dispositivos não resultou na alteração do comprimento e espessura do epitélio palatal e nem do comprimento da membrana basal. Os autores sugeriram que a dieta pastosa seria a mais indicada para estudos que envolvem o uso de dispositivos palatais em animais. Visando a redução do acúmulo de debris alimentares, Lee et al.²² administraram uma dieta gel aos animais e relataram que os dispositivos não comprometeram as atividades normais dos animais, que seu peso manteve-se estável ou até aumentou durante o experimento. Observaram, ainda, que os dispositivos mantiveram sua integridade e durabilidade por mais de oito semanas.

Hotta et al.²⁹ (2017) objetivaram a padronização de um dispositivo intra-oral (DIO) acrílico reembasado com material macio temporário modificado por fármacos antifúngicos em suas concentrações inibitórias mínimas ao biofilme de *C. albicans* para o tratamento da estomatite protética. Inicialmente, Ratos machos Wistar (N=114) foram divididos em duas partes do estudo, sendo 90 animais avaliados para a padronização dos seguintes critérios: dieta, técnica de moldagem e retenção do DIO. Dieta líquida, em pó e em pasta foram testadas, sendo administradas três dias antes da colocação dos DIO. Para a confecção dos DIO, duas técnicas foram empregadas: moldagem com silicone laboratorial a partir de um crânio seco de um animal de mesma idade dos animais experimentais ou moldagem utilizando poliéter e moldeira individual. Os métodos de retenção dos DIO avaliados foram: retenção por fios ortodônticos nas regiões de incisivos e molares; fixação utilizando resina acrílica autopolimerizável na região de molares ou mistos, que eram retidos por fios ortodônticos nos incisivos e fixados com resina acrílica nos molares. Os DIO foram reembasados com o material resiliente temporário Trusoft e mantidos em posição por 7 dias. Após a etapa inicial do estudo, 24 novos animais foram divididos em dois grupos de acordo com a obtenção das amostras histológicas, somente tecido mole (N=12) e tecido mole juntamente com tecido ósseo (N=12) e subdivididos nos seguintes grupos: NC (controle negativo, ratos sem DIO); GC (controle geral, ratos com DIO, sem reembasador); PC (controle positivo, ratos com DIO reembasado com Trusoft); CLO (clorexidina, ratos com DIO reembasado com Trusoft contendo 0,064 g/mL de diacetato de clorexidina); KET (cetoconazol, ratos com DIO reembasado com

Trusoft contendo 0,128 g/mL de cetoconazol) e NYS (nistatina, ratos com DIO reembasado com Trusoft contendo 0,032 g/mL de nistatina). Após o período de 7 ou 14 dias, os animais foram eutanasiados e as amostras histológicas dos seus palatos foram obtidas. Como resultado, os pesquisadores observaram que a melhor dieta a ser utilizada seria a pastosa, visto que menos debris alimentares foram encontrados nos DIO e um menor número de animais apresentou perda de peso, escurecimento dos pelos, prostração e morte. Em relação à técnica de moldagem e tipo de retenção, melhores resultados foram obtidos com a moldagem individualizada e com o DIO compreendendo apenas a região dos molares e fixado com resina acrílica, devido ao menor número de dispositivos perdidos. Em relação à padronização histológica, não foi possível utilizar amostras que continham somente tecido mole, pois eram muito discrepantes mesmo quando utilizados cortes com a mesma distância, assim, amostras de tecido mole juntamente com tecido ósseo foram selecionadas. Aos 7 dias de avaliação, os parâmetros espessura do estrato córneo, estratificação das camadas epiteliais e arranjo das fibras colágenas, vasos e células da lâmina própria não diferiram entre os grupos estudados. Após 14 dias, na análise do epitélio nos grupos GC, PC, CLO, KET e NYS, foi observado um aumento da compressão das células epiteliais e do tecido conjuntivo da lâmina própria em comparação ao grupo NC, o que foi explicado pelo uso contínuo do DIO. No período de 7 dias, na análise da superfície óssea palatina adjacente ao epitélio para os grupos PC, CLO, KET e NYS, não foram observadas alterações no contorno ósseo em comparação com o grupo NC. Semelhante aos achados de 7 dias, o tecido conjuntivo não exibiu alterações histológicas visíveis em todos os grupos de estudo também aos 14 dias de avaliação.

Shakir et al.³⁰ (1986) avaliaram o efeito do uso de dispositivos acrílicos sobre a atividade mitótica do epitélio palatal de ratos Wistar, com e sem a inoculação de *C. albicans*. Após uma semana, a espessura do epitélio palatal reduziu em ambos os grupos experimentais, sem diferenças significativas entre eles. Após 2 semanas, a atividade mitótica aumentou significativamente em ambos os grupos experimentais. No entanto, ao final da quarta semana, apenas o grupo inoculado com *Candida* continuou com padrão elevado de atividade mitótica. Martin e colaboradores³¹ (1987), por sua vez, avaliaram o efeito de *C. albicans* sobre a permeabilidade do tecido palatal de ratos Wistar. Anteriormente à instalação de dispositivos, alguns animais foram inoculados com aproximadamente 30 mg de *C. albicans* diretamente sobre o palato e superfície interna dos aparatos. Os grupos experimentais avaliados consistiram de

animais com dispositivos inoculados apenas uma vez e animais com dispositivos inoculados durante duas semanas e imediatamente eutanasiados ou eutanasiados após 2, 4 ou 8 semanas da remoção dos dispositivos. Previamente à eutanásia, os animais foram perfundidos com uma mistura de 1% de cloreto de lantânio, 2,5% de glutaraldeído e 3% de dextran em 0,1 M de tampão cacodilato. No epitélio dos animais controle, foi possível encontrar um depósito de lantânio no interior da camada granulosa, enquanto que os animais que receberam o dispositivo com *Candida* apresentaram a substância por todo o tecido, incluindo a camada córnea. Nos animais que permaneceram sem os dispositivos por 4 ou 8 semanas, o lantânio encontrava-se apenas entre as células da camada granulosa, sugerindo que a barreira de permeabilidade do tecido havia se reparado. A análise em eletroforese mostrou que o tecido palatal normal permitiu a passagem de pequenas quantidades de proteínas com baixo peso molecular, enquanto que o tecido dos animais infectados permitiu a passagem de proteínas de peso molecular mais alto.

2.2 INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS

2.2.1 Em Animais Imunocompetentes

Utilizando dispositivos palatais, alguns estudos objetivaram a indução da estomatite protética em Ratos Wistar imunocompetentes. No experimento de Olsen e Bondevik³² (1987), foram avaliados grupos de animais que receberam dispositivos palatais acrílicos, animais inoculados com suspensão de *C. albicans* e animais que utilizaram dispositivos com inóculo aplicado sobre sua porção interna. Todos os dispositivos foram removidos ao final da primeira semana e reinstalados. No grupo que utilizou dispositivo com inóculo, foi observada a transformação de blastóporos em hifas, inflamação generalizada discreta ao final da primeira semana, paraqueratose, hiperplasia e atrofia epitelial, infiltrado inflamatório de leucócitos e ocasionais formações de abscessos. Não se observou a penetração de hifas no epitélio.

Shakir et al.³³ (1981) avaliaram quatro grupos: 1. que utilizou um dispositivo acrílico e foi inoculado com uma suspensão de *C. albicans* sorotipo A no palato e na superfície interna dos dispositivos; 2. que recebeu dispositivo acrílico sem inoculação de *C. albicans*; 3. que foi inoculado com suspensão de *C. albicans*, sem a instalação de dispositivo; 4. controle, nenhum procedimento realizado. Os animais do grupo 1

exibiram eritema localizado na região intermolares ao final da primeira semana. Microscopicamente, foi observado um infiltrado inflamatório difuso composto principalmente por neutrófilos e áreas de colonização por blastóporos na superfície do epitélio. Ao final da segunda semana, o infiltrado inflamatório aumentou significativamente e, na quarta semana pós-inoculação, as alterações foram ainda mais notáveis. Clinicamente, a mucosa apresentou áreas de eritema difuso e impacção alimentar. Histologicamente, a invasão epitelial de hifas estava ainda mais evidente com a formação de microabscessos. O epitélio apresentava-se majoritariamente hiperplásico, com algumas áreas de atrofia. O tecido conjuntivo estava moderadamente infiltrado com células inflamatórias crônicas, principalmente linfócitos. Após 6 semanas, essas alterações estavam bem estabelecidas e generalizadas por todas as camadas do epitélio. Não foram encontradas alterações clínicas e histológicas nos palatos de animais que permaneceram duas semanas sem dispositivos, apesar de ainda ter sido possível recuperar *C. albicans*.

Jennings e MacDonald³⁴ (1992) avaliaram a indução da estomatite protética em animais utilizando dispositivos mucossuportados ou dentossuportados cobrindo os molares pelas faces oclusal e vestibular. Metade dos animais de cada grupo experimental recebeu um inóculo de 60 mg de *C. albicans* aplicado na superfície interna dos dispositivos. Os animais foram eutanasiados após quatro semanas. A coloração PAS revelou presença fúngica em apenas três casos, os quais apresentavam hifas, hiperplasia epitelial e formação de microabscessos. Não foram encontradas diferenças significativas nos epitélios entre os animais que não receberam *Candida* e aqueles que foram inoculados. A espessura de queratina apresentou-se reduzida no grupo mucossuportado. Os autores sugeriram que o fato de que cada dispositivo foi confeccionado de forma individual fez com que os mesmos apresentassem uma melhor adaptação ao palato, causando menor trauma e, com isso, deixando o tecido menos vulnerável à infecção por *Candida*.

Em outro estudo, Shakir et al.³⁵ (1983) compararam a efetividade de espécies diferentes na indução da estomatite protética utilizando *C. glabrata*, duas cepas de *C. tropicalis* e duas cepas sorotipos A e B de *C. albicans*. A concentração da suspensão era de aproximadamente 3×10^{20} blastóporos/mg. Cinco animais de cada grupo tiveram um dispositivo palatal instalado, enquanto outros dois mantiveram-se sem o aparato. Duas semanas após a inoculação, não foram notadas alterações no palato dos animais que foram inoculados com as duas cepas de *C. tropicalis* e com *C.*

glabrata e que receberam os dispositivos. Por outro lado, os cinco animais que utilizaram o dispositivo e foram inoculados com o sorotipo A de *C. albicans* apresentaram características histológicas condizentes com candidose, incluindo hiperplasia epitelial com infiltrado leucocitário, microabscessos e invasão de hifas fúngicas. Apenas dois animais inoculados com o sorotipo B de *C. albicans* exibiram sinais similares de candidose no palato. Ambos os sorotipos de *C. albicans* estavam presentes no palato de todos os animais (com ou sem dispositivo) ao final do experimento.

Yano e colaboradores (2019),³⁶ por sua vez, objetivaram a determinação da influência de *C. glabrata* na patogênese da estomatite protética, seu papel na indução ou na sua potencialização. Para isso, inocularam *C. albicans* e/ou *C. glabrata* na forma gel na concentração de 1×10^9 UFC/mL no palato de ratos eutímicos sem pelos, juntamente com a utilização de dispositivos palatais. O processo de inoculação foi realizado 3 vezes, com intervalos de 3 dias durante 4 semanas. Ocorreu uma colonização consistente de *C. glabrata* quando inoculada sozinha. Os níveis de *C. albicans* não foram prejudicados e sua virulência não foi intensificada quando as duas estirpes de *Candida* foram inoculadas no palato dos animais. Foi observado que *C. glabrata* não tem potencial inflamatório quando inoculada sozinha, diferentemente de quando inoculada juntamente com *C. albicans*.

Para induzir a infecção, Johnson e colaboradores³⁷ (2012) também testaram formas diferentes de preparo de inóculo de *C. albicans*, ou em suspensão líquida e ou na forma de pasta, com leveduras sedimentadas. Grupos controles consistiram de animais não inoculados sem dispositivo; animais não inoculados com dispositivo; e animais inoculados sem dispositivo. As suspensões líquidas foram insuficientes para a colonização dos palatos e as pastas de leveduras sedimentadas demonstraram níveis mais altos de colonização após 14 dias. Os animais que receberam inoculações e não utilizavam dispositivos apresentaram níveis de colonização inferiores. A formação de biofilme no palato não foi evidente 2 ou 4 semanas pós-inoculação, com apenas leveduras visíveis. Nos dispositivos, a formação de biofilme tornou-se evidente a partir da quarta semana pós-inoculação, e a maturação continuou até a oitava semana. Inflamação mais severa foi observada 6 e 8 semanas pós-inoculação. Os resultados histológicos refletiram o aspecto clínico, sendo atribuído escore 0 aos animais que não foram inoculados, escore 1 aos animais 4 semanas pós-inoculação, e escore 2 aos animais 6 e 8 semanas pós-inoculação.

Visando verificar a capacidade de *C. albicans* em mudar da forma comensal para a patogênica, Shakir e colaboradores³⁸ (1986) fixaram dispositivos palatais em ratos Wistar durante duas semanas, removeram por duas semanas, reinstalaram, e os mantiveram por mais duas semanas. Foram avaliados dois grupos; um no qual foi inoculada na mucosa palatal e superfície interna do dispositivo uma suspensão de 3×10^{20} blastóporos/mg de *C. albicans* sorotipo A e outro grupo que recebeu dispositivos sem a inoculação do fungo. Quando os dispositivos foram reinstalados, não foi feita nova inoculação de *Candida*. Após 2 semanas, o palato dos animais do grupo experimental apresentava evidências macroscópicas de candidose, consistindo de áreas eritematosas difusas na região intermolares. Os animais que tiveram os dispositivos reinstalados exibiram sinais consistentes de candidose. Histologicamente, o epitélio do palato desses animais estava hiperplásico e não-queratinizado, com algumas áreas de atrofia. Além disso, exibiam infiltrado inflamatório e microabscessos. Foi possível recuperar *C. albicans* dos animais inoculados, tanto no grupo dos dispositivos removidos, quanto no dos dispositivos reinstalados. Foi sugerido que *C. albicans* foi capaz de mudar da forma comensal para a patogênica com a reinstalação do dispositivo.

Tobouti e colaboradores,²¹ em 2016, desenvolveram pela primeira vez um modelo murino de estomatite protética para análise da expressão das aspartil proteinases secretadas 2, 5 e 9 por *C. albicans* a partir de biofilme formado sobre a superfície de dispositivos palatais. Os animais foram divididos em: grupo controle que não utilizou dispositivos, grupo que utilizou dispositivo sem *C. albicans*; e grupo que recebeu dispositivo contaminado (não apenas inoculado) com *C. albicans*. Os dispositivos permaneceram em boca durante 2, 4 e 6 dias. Para manter os dispositivos em posição, dois orifícios foram feitos na região dos primeiros e segundos molares e fios de aço inoxidável foram fixados na região dos incisivos com resina acrílica. O grupo com dispositivo contaminado apresentou alterações nas porcentagens de neutrófilos e linfócitos quando comparado aos demais grupos, principalmente no quarto dia, no qual houve aumento significativo da porcentagem de neutrófilos e diminuição significativa na porcentagem de linfócitos. Clinicamente, foram observados sinais de inflamação grau I na escala de Newton após 4 dias da utilização do dispositivo contaminado. Ainda, o grupo com dispositivo contaminado apresentou epitélio escamoso estratificado hiperplásico, com hiperortoqueratinização e projeções papilares exofíticas, principalmente ao quarto e sexto dia. As maiores expressões

relativas de aspartil proteinases 2, 5 e 9 deram-se no quarto dia. A concordância dos achados moleculares com os aspectos clínicos, microscópicos e séricos observados ao quarto dia mostrou que esse modelo experimental poderia ser utilizado em futuros experimentos.

2.2.2 Em Animais Imunocompetentes Sob Antibioticoterapia

Os estudos apresentados anteriormente utilizaram animais imunocompetentes para desenvolvimento da estomatite protética por meio de dispositivos acrílicos palatais. Yano et al.²⁶ (2016) determinaram o papel da formação do biofilme no dano à mucosa utilizando cepas de *C. albicans* geneticamente modificada DAY185 e cepas com deficiências na morfogênese (*efg1*^{-/-}) ou na formação de biofilme (*bcr1*^{-/-}) em ratos eutímicos sem pelos sob antibioticoterapia. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam dieta gel uma semana antes da instalação dos dispositivos. Além disso, quatro dias antes da inoculação, os animais receberam amoxicilina e ácido clavulânico na água de beber. As cepas foram inoculadas em uma formulação gel na concentração de 1×10^9 UFC/mL diretamente sobre o palato. O processo de contaminação foi realizado 3 vezes, com intervalos de 3 dias. A cepa DAY185 apresentou crescimento fúngico com formação de biofilme espesso, a cepa *efg1*^{-/-} apresentou crescimento apenas de leveduras dispersas e a cepa *bcr1*^{-/-} desenvolveu biofilme com crescimento de hifas, porém, significativamente mais fino e com o padrão de crescimento disperso. A quantificação do crescimento fúngico revelou redução na colonização com o passar do tempo nos animais que foram inoculados com a cepa *efg1*^{-/-}. Os animais inoculados com as cepas *efg1*^{-/-} e *bcr1*^{-/-} apresentaram danos teciduais mínimos e perda de peso, enquanto aqueles que receberam a cepa DAY185 demonstraram o oposto.

2.2.3 Em Animais Imunossuprimidos

Finalmente, Nett e colaboradores²⁰ (2010) associaram a imunossupressão para indução de estomatite protética em ratos Sprague-Dawley. Anteriormente à instalação de dispositivos palatais, os animais foram imunossuprimidos com dose única de cortisona, administrada subcutaneamente na concentração de 200 mg/Kg. Uma suspensão de *C. albicans* na concentração de 1×10^8 UFC/mL foi inoculada

sobre o palato dos animais. A carga de microrganismos viáveis nos dispositivos aumentou com o passar do tempo, sendo que com 6 h de uso, $<2 \log_{10}$ UFC/dispositivo de *Candida* spp. e bactérias estavam aderidas à superfície, enquanto que com 48 h de uso, aproximadamente $6 \log_{10}$ UFC/dispositivo de *Candida* spp. e $8 \log_{10}$ UFC/dispositivo de bactérias foram contabilizadas. Histologicamente, notou-se a ocorrência de inflamação, com a presença de células polimorfonucleares e o epitélio não se apresentava atrófico. A invasão tecidual de hifas de *Candida* foi confirmada pela coloração GMS.

2.3 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM MODELOS ANIMAIS

2.3.1 Contagem De UFC/mL

Para verificar a presença de candidose e/ou a efetividade da terapia testada, diversos métodos são descritos na literatura. O teste mais utilizado tem sido a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), que tem como objetivo estimar a colonização por *Candida albicans* nos palatos e línguas dos animais. São coletadas amostras da cavidade oral utilizando swabs estéreis que, posteriormente, são semeados em ágar Sabouraud Dextrose ou ChroMagar®, meio específico cromogênico para isolamento e identificação presuntiva de espécies de *Candida*. Então, o meio é mantido em estufa bacteriológica, para posterior contagem das UFC/mL.^{20,21,24,26,39-44}

2.3.2 Análise Visual

Alterações macroscópicas nos tecidos orais dos animais têm sido avaliadas por meio de escores. Tobouti e colaboradores²¹ avaliaram os palatos de ratos Wistar quanto a sinais clínicos de inflamação, atribuindo escores de acordo com a classificação de Newton em tipo I: petéquias dispersas por parte ou toda a mucosa palatina em contato com o dispositivo palatal; tipo II: eritema macular sem hiperplasia; e tipo III: eritema difuso ou generalizado com hiperplasia papilar. Neste estudo, os autores encontraram apenas lesões condizentes com o tipo I de Newton. Takakura et al. (2004)⁴³ relataram a gravidade de lesões no tecido lingual de camundongos,

atribuindo escores de 0 a 4, com base na extensão das lesões esbranquiçadas, sendo 0 para o tecido normal; 1 para lesões brancas que acometessem mais de 20% do tecido lingual; 2 para lesões brancas que acometessem mais de 21% e menos de 90% do tecido lingual; 3 para lesões brancas que acometessem mais de 91% do tecido lingual e 4 para lesões brancas espessas, como pseudomembranas, em mais de 91% do tecido lingual.

2.3.3 Análise Histopatológica Descritiva

Após a eutanásia, os tecidos lingual e palatal de ratos e camundongos são removidos, fixados em formol, emblocados em parafina, cortados, corados rotineiramente com hematoxilina-eosina ou ácido periódico de Schiff e posteriormente analisados. As alterações histopatológicas investigadas nos estudos são: presença de hifas e leveduras de *C. albicans* nos tecidos, microabscessos, hiperplasia epitelial, hiperparaqueratose, desorganização da camada basal do epitélio, espongiose, exocitose e infiltrado inflamatório, além de áreas de despilação na língua.

2.3.4 Análise Histométrica Por Planimetria Digital

A análise histopatológica por planimetria digital consiste em uma análise histométrica do tecido em avaliação. Após eutanásia, os tecidos removidos são processados de maneira convencional e corados com hematoxilina-eosina. Hotta et al.^{29,45} avaliaram nove variáveis do palato de ratos Wistar, entre elas: comprimento da superfície córnea, comprimento da camada basal, proporção entre a superfície córnea e a camada basal, espessura de queratina, espessura do compartimento celular, proporção entre a espessura de queratina e a de compartimento celular, área de queratina, área do compartimento celular e a proporção entre a área de queratina e do compartimento celular. Quando são realizados estudos para a indução de candidose em modelos animais, espera-se a diminuição nas medições dos tecidos palatais de ratos e camundongos, devido ao infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo, quase que, impossibilitando a diferenciação da camada basal, que divide o tecido conjuntivo do tecido epitelial.

2.3.5 Expressão De Proliferação Celular (PCNA)

Essa metodologia é empregada para verificar o índice de células que estão em qualquer fase da mitose em determinado tecido. O nível de expressão do antígeno nuclear de proliferação celular é considerado um marcador para a proliferação de células, por estar diretamente relacionado com as atividades mitóticas locais.⁴⁶ Para marcação das células em fase de proliferação, é utilizado um anticorpo de acordo com as instruções do fabricante. A taxa de proliferação celular é obtida pela relação entre o número de células marcadas, dividido pelo número total de células contadas em determinado campo, multiplicado por 100, para obter um valor em porcentagem.⁴⁶ Na literatura, ainda não existem estudos que utilizaram essa metodologia para avaliar a indução de estomatite protética em modelos animais. Porém, o que se espera encontrar em um tecido palatal ou lingual de animais acometidos pela doença é uma alta taxa proliferativa, dada a inflamação tecidual local e tentativa de reparo desse mesmo tecido.

2.3.6 Dosagem De Mieloperoxidase (MPO) E N-Acetilglucosaminidase (NAG)

A mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. E, ao dosá-la, é possível determinar quantitativamente a atividade dessa enzima durante a reação inflamatória,⁴⁷⁻⁴⁹ sendo que a quantidade de MPO está diretamente ligada ao número de neutrófilos presentes no tecido.⁴⁸ Já a N-acetilglucosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem de NAG é utilizada para quantificar a infiltração destas células em sítios inflamatórios.⁵⁰ Assim, para realizar a quantificação de ambas as enzimas, uma parte do tecido removido deve ser homogeneizada, centrifugada e diferentes soluções sequenciais devem ser adicionadas ao homogenato para posterior leitura em espectrofotômetro. Ainda não existem na literatura estudos que utilizem essa metodologia para avaliar a indução de candidose ou estomatite protética em modelos animais. Porém, espera-se encontrar em um tecido palatal ou lingual de animais acometidos pela doença uma taxa mais elevada de ambas as enzimas MPO e NAG em comparação com animais de um grupo controle negativo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a efetividade da indução e a duração da estomatite protética em ratos machos Wistar sob antibioticoterapia utilizando tetraciclina ou amoxicilina associada a ácido clavulânico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a efetividade da indução e a duração da estomatite protética em ratos Wistar sob antibioticoterapia por meio de análises visual, contagem de UFC/mL e histopatológica;
2. Definir o protocolo mais adequado de antibioticoterapia para auxiliar na indução da estomatite protética em ratos Wistar por meio das análises visual, contagem de UFC/mL, dosagem enzimática de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) e análises histopatológicas descritiva, histométrica e expressão de proliferação celular (PCNA).

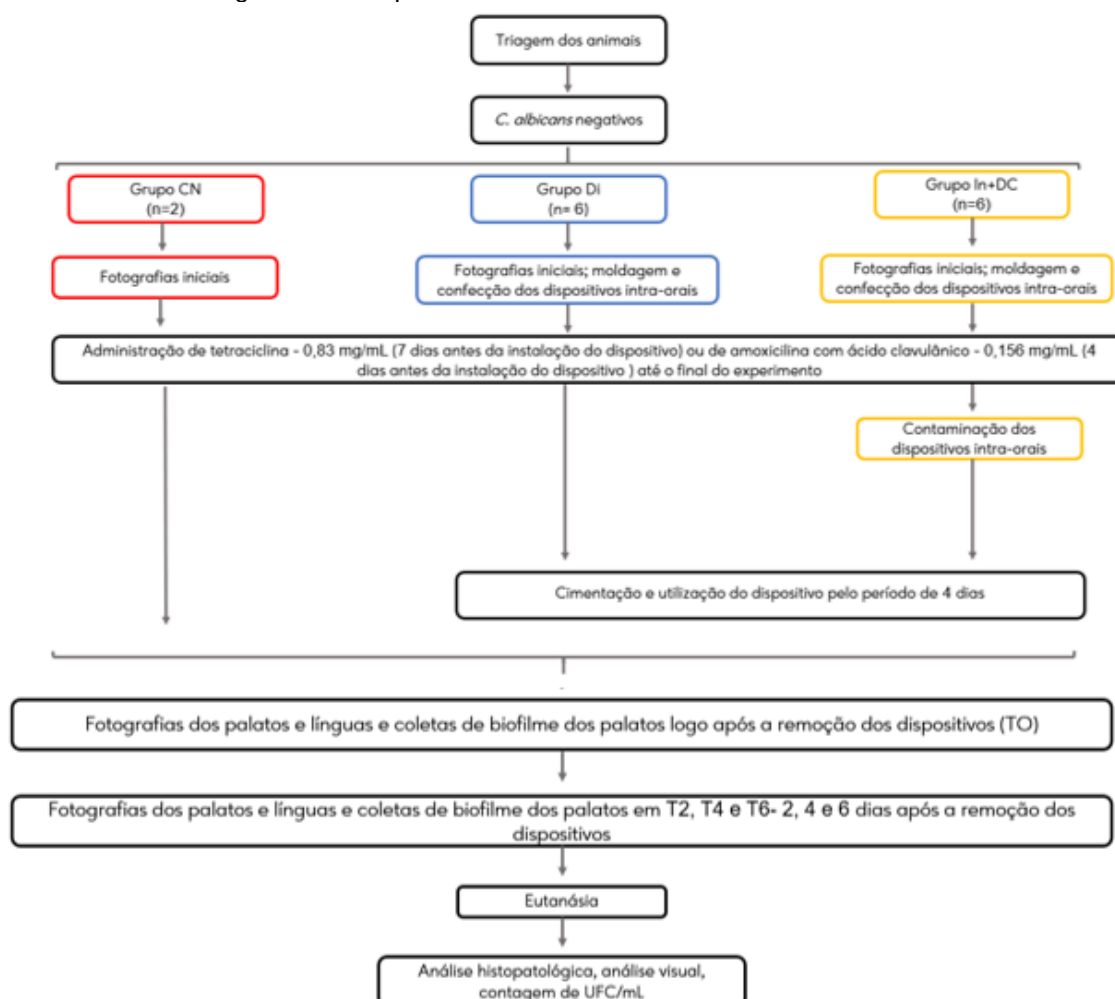
4 ETAPA I - MODELO DE INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA: AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DA INFECÇÃO

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Delineamento Experimental

O delineamento da Etapa I deste trabalho pode ser visualizado no fluxograma e linha do tempo das Figuras 1 e 2.

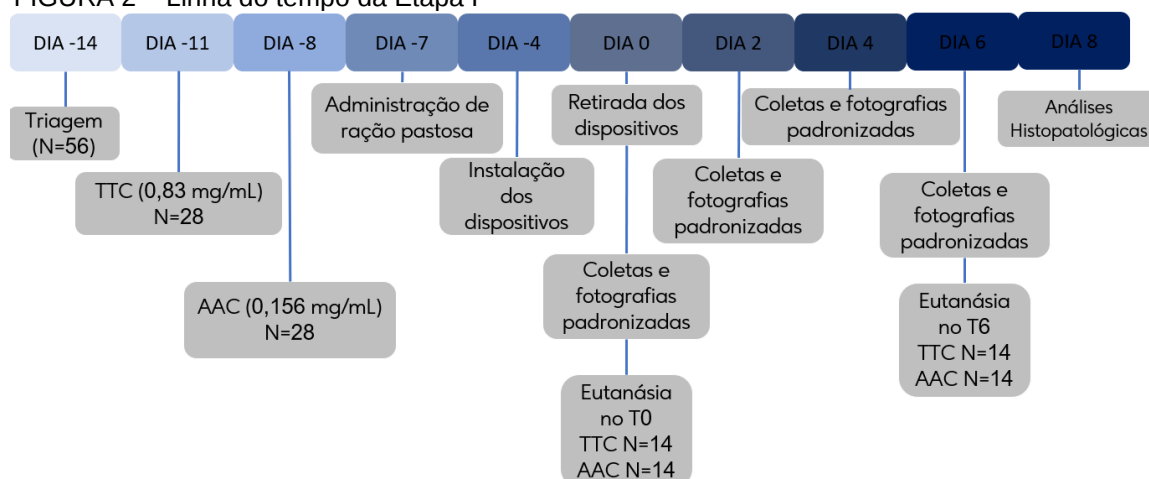
FIGURA 1 - Fluxograma da Etapa I



Fonte: O autor.

CN: Controle negativo; DI: Dispositivo intra-oral; In+DC: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

FIGURA 2 – Linha do tempo da Etapa I



Fonte: O autor.

TTC: Cloridrato de Tetraciclina; AAC: Amoxicilina associada a ácido clavulânico

4.1.2 Animais E Grupos De Experimentação

Para a Etapa I, foram utilizados 56 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) para a avaliação da efetividade da indução e duração da estomatite protética sob antibioticoterapia com tetraciclina (N=28) ou com amoxicilina associada a ácido clavulânico (N=28). A eutanásia dos animais foi realizada no tempo zero (T0; N=14), logo após a indução da doença e remoção do dispositivo palatal, e no tempo seis (T6; N=14), seis dias após a indução da doença e remoção do dispositivo palatal para ambos os antibióticos em três grupos experimentais (Figura 1). Os grupos experimentais avaliados⁵¹ foram: CN = Controle negativo, animais saudáveis sem indução de candidose (n=2); Di = Dispositivo intra-oral, animais submetidos à utilização de dispositivo intra-oral estéril (n=6); In+DC = Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado, animais submetidos à inoculação de suspensão de *C. albicans* e à utilização de dispositivo intra-oral contaminado.

Os animais tinham em torno de 300 g^{28/29} com aproximadamente 90 dias de idade e foram obtidos do Núcleo Avançado de Estudos da Vida da Universidade Estadual de Ponta Grossa (NAEVI/UEPG), após aprovação do formulário de autorização para uso de animais em pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade (protocolo CEUA 048/2016 – ANEXO A). As condições nas quais os animais foram alocados e a alimentação estavam adequadas às normas do NAEVI/UEPG. O protocolo experimental está de acordo com o *The Guiding Principles for the Care and Use of Animals*.

Os animais foram mantidos em grupos de dois ou três por gaiola, sendo que cada gaiola alojava animais de mesmos grupos experimentais. As condições de iluminação, ventilação, temperatura e umidade estavam de acordo com as normas do NAEVI/UEPG: fotoperíodos de 12 h; cerca de 15 a 20 trocas de ar/hora; temperatura entre 20°C e 24°C e taxa de umidade relativa entre 45 e 55%.

Inicialmente, durante o período de moldagem e confecção dos dispositivos palatais, os animais receberam dieta sólida com ração convencional proveniente do NAEVI/UEPG e água *ad libitum*. Para a etapa de indução de estomatite protética sob antibioticoterapia, os animais receberam cloridrato de tetraciclina (Fleming Manipulação Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR) na água de beber *ad libitum* na concentração de 0,83 mg/mL^{43,52,53} ou amoxicilina com ácido clavulânico (Fleming Manipulação) na água de beber *ad libitum* na concentração de 0,156 mg/mL.²⁶

Os animais receberam a água com a tetraciclina sete dias²⁴ ou com a amoxicilina com ácido clavulânico quatro dias²⁶ antes da inoculação de *C. albicans* e instalação de dispositivos contaminados e durante o período de indução da estomatite protética²⁴ até o fim do experimento. O consumo de água era verificado diariamente e o líquido era repostado antes de acabar. Os animais também receberam uma dieta pastosa três dias antes e durante o período de indução da doença.²⁹ Para o preparo da ração pastosa, o pó da ração convencional foi misturado a água até se obter uma mistura homogênea de consistência pastosa, que foi armazenada em um recipiente hermeticamente fechado. Cada rato recebeu uma quantidade diária aproximada de 30 g dessa mistura. Os animais contaminados eram mantidos em ambientes diferentes dos animais controles não contaminados, evitando assim a ocorrência de infecção cruzada. Após o período de indução da doença, os animais voltaram a receber a dieta sólida convencional e água *ad libitum* com a adição dos antibióticos até o fim do experimento. Os animais não foram, em nenhum momento, mantidos em jejum.

Os pesquisadores utilizaram equipamentos de proteção individual (EPIs), de acordo com a Resolução CEPE/UEPG n.057, de 13 de julho de 2004. Os materiais e instrumentais utilizados durante os experimentos foram previamente esterilizados ou desinfetados.

Durante os procedimentos de triagem, moldagem, instalação e retirada dos dispositivos, coletas e fotografias padronizadas, os animais foram submetidos à anestesia geral através da administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina 75

mg/Kg (Cetamin; Syntec., Santana de Paranaíba, SP) e cloridrato de xilazina 5 mg/Kg (Xilazin; Syntatec do Brasil Ltda., Cotia, SP).

No decorrer do experimento, a saúde dos animais foi monitorada por meio da observação de sua massa corporal. Outros aspectos como a ocorrência de isolamento do resto do grupo, dificuldades respiratórias, alteração na postura corporal, ocorrência de resistência à movimentação ou indiferença ao manuseio e redução do *grooming*, também foram levados em consideração. Caso algum animal viesse a se tornar severamente doente ou debilitado, o mesmo seria eutanasiado antes do experimento acabar, visando a redução do seu sofrimento.^{54,55}

Como critério de inclusão, os ratos não deveriam apresentar *C. albicans* em suas cavidades bucais anteriormente ao início do experimento.²¹ Com os animais anestesiados, amostras da saliva foram coletadas durante 30 s utilizando *swabs* estéreis (Labor Import, Osasco, SP), os quais foram previamente embebidos em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi Imp. e Dist., Curitiba, PR) e então esfregados por toda a cavidade bucal. O conteúdo dos *swabs* foi transferido para tubos de Falcon contendo 1 mL de caldo BHI, os quais foram homogeneizados em vórtex (QL-901; Biomixer, Curitiba, PR) e incubados em estufa bacteriológica (MA 033; Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP) a 37°C. Após 24 h, as placas de Petri contendo o meio de isolamento e identificação de fungos, comercialmente denominado *Candida* CHROMagar® (*Candida* Cromogênico; LB Laborclin, Pinhais, PR), foram divididas em quadrantes e 25 µL deste caldo foram semeados em cada um para identificar UFC.²¹ As placas foram, então, incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 h e a interpretação dos resultados foi feita de maneira presuntiva pela análise da morfologia e da pigmentação das colônias. Como controle positivo, foram semeados 25 µL de uma suspensão padronizada de *C. albicans* parental (*wild-type*) de *C. albicans* SC5314 em placas de *Candida* CHROMagar®. Os animais que apresentaram inicialmente *Candida* foram substituídos.⁵¹

4.1.3 Confeção Dos Dispositivos Intra-Orais

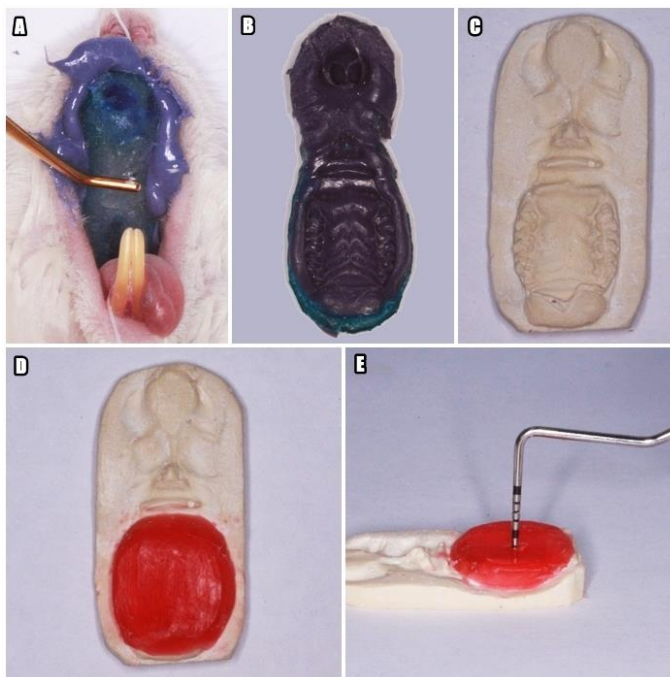
A partir de um crânio seco de um rato, com tamanho compatível aos dos animais que foram utilizados nesta pesquisa, foram confeccionadas moldeiras individuais de resina acrílica autopolimerizável incolor (Vipi Flash; Vipi® Ltda., Pirassununga, SP). Para tal, a maxila do crânio seco foi moldada utilizando silicone

por condensação de consistência pesada (Zetaplus; Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália) e o molde obtido foi vazado com gesso pedra especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ). Foi realizado um alívio de 2 mm utilizando cera rosa nº 7 (Lysanda Prod. Odontol., São Paulo, SP) em toda a extensão do modelo previamente determinada. A resina acrílica autopolimerizável foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante e acomodada no modelo na fase plástica. Após a polimerização, foi realizado o acabamento e o polimento das bordas da moldeira com brocas de tungstênio maxi-cutt e mini-cutt (Dhpro, Rhadartrade, Paranguá, PR).⁵¹

Após a anestesia, os animais foram estabilizados em uma placa de isopor envolta por papel alumínio e moldados utilizando as moldeiras individuais e poliéter (Impregum F; 3M do Brasil, Campinas, SP) (Figura 3A). Após a moldagem, os animais foram alojados em suas respectivas caixas e monitorados até sua total recuperação pós-anestésica, observando seus padrões cardiovascular e de respiração.⁵⁶ Os moldes obtidos (Figura 3B) foram, então, vazados com gesso pedra tipo IV (Figura 3C).⁵¹

A extensão do dispositivo palatal foi delimitada no modelo de trabalho e o enceramento (Figura 3D) foi realizado com 3 mm de espessura⁵⁷ na região do palato e 2 mm nas faces vestibulares dos molares.⁵¹ A espessura da cera foi conferida utilizando sonda periodontal milimetrada (Figura 3E).

FIGURA 3- Moldagem, vazamento e enceramento dos modelos de trabalho.



Fonte: O autor

A: Moldagem de trabalho; B: Molde e C: Modelo de trabalho; D: Enceramento e E: Conferência da espessura da cera

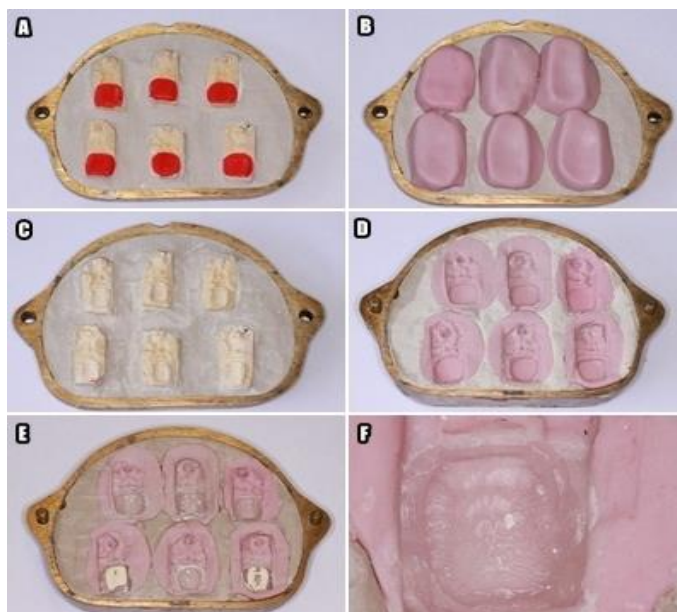
Os modelos de trabalho encerados foram incluídos convencionalmente em mufla metálica nº 6 (OGP Prod. Odontol. Ltda., São Paulo, SP) (Figura 4A) com gesso pedra tipo III (Herodent; Vigodent S.A. Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP), sendo construída uma muralha de silicone por condensação de consistência densa para uso laboratorial (Zetalabor; Zhermack., Badia Polesine, RO, Itália) sobre o modelo encerado^[51] (Figura 4B).

Após a eliminação da cera (Figura 4C), a resina acrílica termopolimerizável incolor para base de prótese Vipi Cril (Vipi® Ltda.) foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante e, então, inserida na fase plástica nos moldes de silicone no interior da mufla (Figura 4D). Após prensagem (Essence Dental VH, Araraquara, SP) de prova, as muflas foram prensadas definitivamente a 1,25 t por 30 min. Finalmente, a resina foi polimerizada convencionalmente em banho de água em termopolimerizadora (SL-155/22; Solab Equipam. Laborat. Ltda., Piracicaba, SP) seguindo o ciclo proposto pelo fabricante.

As muflas foram, então, resfriadas em bancada por 30 min e em água corrente por 15 min.^[58] Após demuflagem (Figuras 4E e 4F), os dispositivos foram removidos

cuidadosamente dos modelos e seu acabamento foi feito com broca do tipo mini-cutt (Figura 5A). A fim de reproduzir a rugosidade da superfície das próteses totais^[59] os dispositivos tiveram sua superfície externa polida utilizando lixas d'água (Figura 5B) de granulação 100 e 200 (3M do Brasil). Os dispositivos acrílicos (Figuras 5C e 5D) foram, então, mantidos em água destilada em estufa a 37°C por 48 h.^[58]

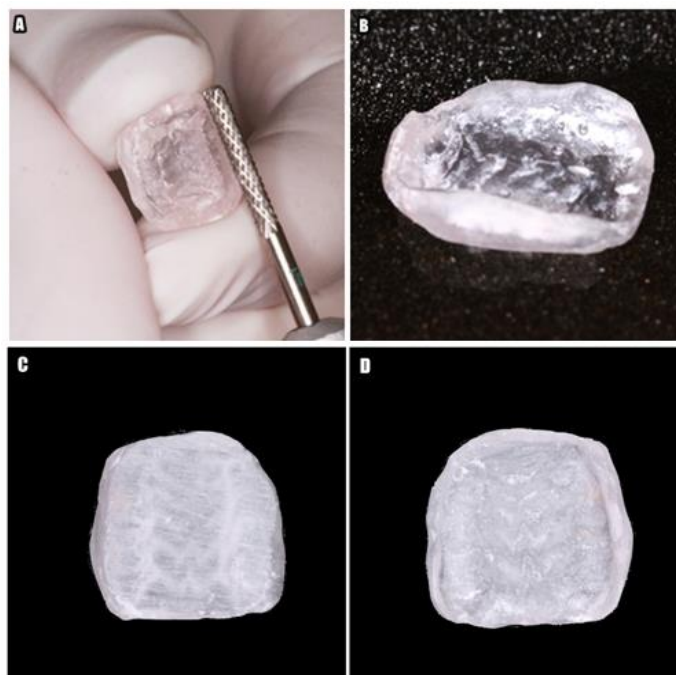
FIGURA 4 – Inclusão em mufla e polimerização dos dispositivos acrílicos.



Fonte: O autor

A: Modelos de trabalho encerados incluídos em mufla; B: Muralhas de silicone sobre os enceramentos; C: Modelos de trabalho em mufla após a eliminação da cera; D: Moldes dos enceramentos na contra-mufla; E e F: Dispositivos de resina acrílica após polimerização

FIGURA 5 – Acabamento e polimento dos dispositivos.



Fonte: O autor

A: Acabamento do dispositivo com broca mini-cut; B: Planificação e padronização da rugosidade da superfície externa com lixas d'água; C: Superfície externa do dispositivo; D: Superfície interna do dispositivo

Na sequência, os dispositivos foram imersos em 200 mL de água destilada estéril^[60] e submetidos a esterilização em micro-ondas (MEF 41; Electrolux, Manaus, AM) a 650 W por 3 min^[51]

4.1.4 Obtenção Do Inóculo De *C. albicans*

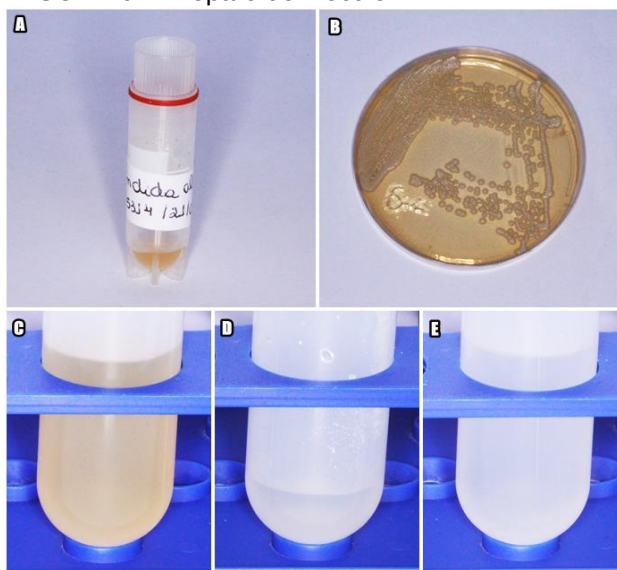
Para obtenção do inóculo, foi utilizada a cepa parental (*wild-type*) de *C. albicans* SC5314^[61] que foi mantida em ultra-freezer a -80°C em caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD; Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, EUA) contendo 20% de glicerol (Kasvi Imp. e Dist.)^[62] Uma alçada da cepa descongelada (Figura 6A) foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura YEPD Agar que foi mantida em estufa bacteriológica a 37°C durante 48 h^[63] Após esse período, uma única colônia de *C. albicans* foi coletada (Figura 6B) e ressuspensa em 20 mL de caldo YEPD em tubos de Falcon (Figura 6C) e mantida *overnight* (aproximadamente 16 h) em estufa bacteriológica a 37°C, o que resultou em uma pré-cultura^[51]

Os tubos de Falcon foram então centrifugados (mod. 5804 R; Eppendorf do Brazil Ltda., São Paulo, SP) a 4.000 rpm a 4°C por 15 min para a lavagem das células.

O conteúdo sobrenadante foi descartado e ao tubo foram adicionados 5 mL de PBS (Figura 6D); o novo conteúdo foi homogeneizado em vórtex (QL-901; Biomixer) e levado para centrifugação nas mesmas condições. O processo foi repetido mais uma vez^{64,65} e ao conteúdo final foram adicionados 20 mL de PBS estéril (Figura 6E).

O conteúdo final foi novamente homogeneizado em vórtex e alíquotas de 25 µL na concentração de 10^{-4} foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (Difco®, São Paulo, SP). As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 h e após esse período foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias de *C. albicans*. Em seguida, os resultados foram transformados para UFC/mL a partir da Equação 1: $\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n/q$, 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 6 – Preparo do inóculo.



Fonte: O autor

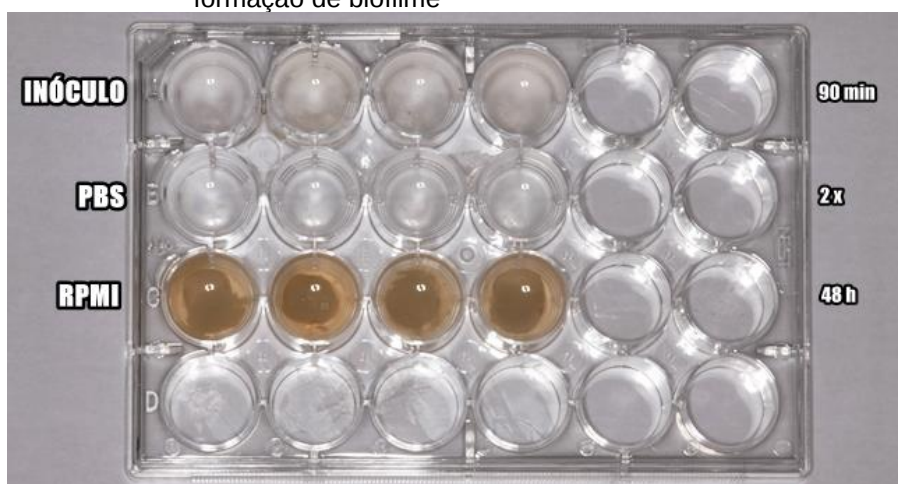
A: Cepa descongelada; B: Crescimento fúngico em ágar YEPD; C: Transferência de uma colônia de *C. albicans* para 20 mL de caldo YEPD; D: Lavagem do *pellet* em PBS estéril; E: Inóculo

4.1.5 Contaminação Dos Dispositivos Intra-Orais

Então, os dispositivos esterilizados foram contaminados com um inóculo de *C. albicans* ($\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL) com o objetivo de assemelhar às condições das próteses de pacientes que possuem estomatite protética.^[51]

Cada dispositivo foi colocado no fundo de um poço de uma placa de cultura de 24 poços (TPP®), com a superfície interna voltada para cima.^[51] (Figura 7). Em seguida, foram adicionados 2 mL do inóculo em cada poço e a placa de cultura foi mantida em uma incubadora com agitação orbital (Shaker - mod. 430/RDBP; Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP) sob velocidade de 75 rpm durante 90 min a 37°C.^[66] Após esse período, os dispositivos foram lavados gentilmente 2 vezes em 2 mL de PBS estéril para a remoção das células não aderidas e imersos em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Duque de Caxias, SP) em incubadora com agitação sob velocidade de 75 rpm durante 48 h a 37°C, sendo o meio esgotado e repostado em igual volume a cada 24 h para reposição dos nutrientes.^{[67][68]} Finalmente, os dispositivos foram lavados gentilmente em 2 mL de PBS em duplicata.^[67]

FIGURA 7 – Dispositivos imersos no meio de cultura após período de formação de biofilme



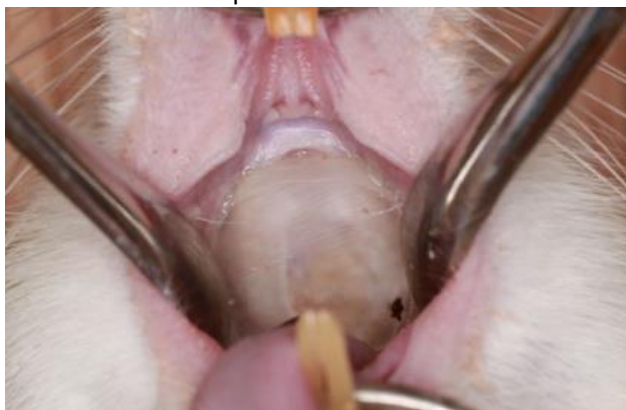
Fonte: O autor

4.1.6 Inoculação E Fixação Dos Dispositivos Intra-Orais

Durante a fixação dos dispositivos intra-orais, os animais dos grupos Di e In+DC receberam intraperitonealmente maleato de acepromazina 1% (Aprumazin 1%; Syntec, Santana de Parnaíba, SP) na dose de 0,01 mL para cada 100 g do animal, a fim de complementar o efeito anestésico da combinação cetamina/xilazina e manter a anestesia durante ao menos 2 h.^[69] Isto para que, no caso do grupo In+DC, os animais permanecessem anestesiados tempo suficiente, evitando a deglutição de *Candida*, reduzindo sua presença no esôfago e estômago, promovendo melhor colonização e invasão tecidual na cavidade bucal, gerando tubos germinativos, transformando-se em hifas e pseudohifas.^[70-72]

Os dispositivos acrílicos foram, então, levados em posição na cavidade bucal dos animais e sua adaptação foi avaliada. Em seguida, foram cimentados utilizando cimento resinoso autoadesivo RelyX™ U200 (3M ESPE; St. Paul, EUA) (Figura 8), aplicado na região dos molares superiores do dispositivo.^[51]

FIGURA 8 - Dispositivo cimentado nos molares superiores do rato



Fonte: O autor

Antes da recuperação anestésica, os animais tiveram suas unhas cortadas, a fim de evitar que se machucassem ao tentar remover os dispositivos intra-orais.^[73]

Para os animais que foram inoculados oralmente com blastóporos de *C. albicans* (grupo In + DC), swabs estéreis foram embebidos na suspensão com o inóculo padronizado ($\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL) de *C. albicans* imediatamente antes da cimentação do dispositivo contaminado e esfregados sobre o palato dos animais por 30 s.^[69]

Os dispositivos permaneceram em posição na cavidade bucal dos animais por 4 dias²¹ e, então, foram removidos (Figura 9) para as avaliações de efetividade de indução e duração da estomatite protética.

FIGURA 9 - Dispositivo após remoção



Fonte: O autor

4.1.7 Avaliação Da Indução E Duração Da Estomatite Protética Em Ratos Imunocompetentes Sob Antibioticoterapia

O desenvolvimento e a duração da infecção por *Candida* foram determinados por meio de análise visual, contagem de colônias viáveis e análise histopatológica.

4.1.7.1 Análise visual

Os animais foram estabilizados em uma maca e fotografias com distância focal e iluminação padronizadas foram obtidas utilizando uma câmera digital (Canon EOS 500D; Canon Inc., NY, EUA) acoplada a uma mesa estativa (Figura 10). O palato e a língua dos animais foram fotografados no início do experimento (Inicial), após o período de quatro dias de indução da estomatite protética (T0) e após dois (T2), quatro (T4) e seis dias da indução da estomatite protética e antes da eutanásia (T6).

Para a avaliação do palato, as fotografias iniciais, as fotografias imediatamente após a retirada do dispositivo (T0) e seis dias após (T6) foram analisadas e atribuídos os seguintes escores:

- Eritema: 0 = sem alteração; 1 = eritema leve e localizado; 2 = eritema moderado e difuso;
- Edema: 0 = sem alteração; 1 = pregas palatinas pouco definidas; 2 = mucosa lisa, sem a presença de pregas palatinas;
- Erosão: 0 = sem erosão; 1 = com erosão.

Para a avaliação da língua, a confirmação da presença de candidose foi feita pela observação de áreas de atrofia papilar²³ Foram estabelecidos os seguintes escores: 0 = sem alteração; 1 = despapilação leve; 2 = despapilação moderada; 3 = despapilação severa, língua totalmente acometida.

As 286 fotos foram avaliadas por dois examinadores experientes, calibrados e cegos para o experimento. Para a calibração intra-examinador, os avaliadores examinaram as fotos em dois momentos, com um intervalo de 7 dias entre as avaliações.

FIGURA 10 - Posicionamento dos animais em maca estabilizadora e utilização de mesa estativa para obtenção de fotografias padronizadas



Fonte: O autor

4.1.7.2 Contagem de UFC/mL

Para esta etapa, foi realizada a coleta de biofilme da mucosa palatal dos animais utilizando *swabs* estéreis previamente embebidos em PBS estéril por 30 s^[51] (Figura 11). Os *swabs* foram, então, colocados em tubos de Falcon contendo 3 mL de PBS estéril^[74] e realizada a homogeneização do conteúdo em vórtex por 30 s. Em seguida, alíquotas na diluição 10^{-1} foram plaqueadas em ágar Sabouraud Dextrose suplementado com cloranfenicol 0,1 mg/mL (Fleming Manipulação Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR). As coletas foram feitas nos mesmos períodos em que as fotografias foram obtidas. Após 48 h de incubação em estufa a 37°C,^[67] foi determinado o número de UFC/mL utilizando a Equação 1.

FIGURA 11 - Coleta de biofilme na mucosa palatal do animal



Fonte: O autor

4.1.7.3 Análises histopatológicas

Nos períodos experimentais T0 ou T6, a eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10%, via intraperitoneal, o dobro do volume indicado, e posterior deslocamento cervical e a eutanásia foi confirmada ao se verificar ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos dos animais^[54]

O palato e a língua dos animais foram removidos cirurgicamente e acondicionados em frascos com solução de formol a 10% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP) contendo PBS pH neutro e encaminhadas para

o processamento histológico. Selecionou-se a área correspondente à faixa de tecido entre os primeiros molares direito e esquerdo, assim como definido por Hotta et al.²⁹

Após a remoção destas amostras, as carcaças dos animais foram encaminhadas ao NAEVI/UEPG e incineradas, seguindo as normas preconizadas pela Instituição.

4.1.7.3.1 Processamento das amostras histológicas

As amostras dos palatos e línguas permaneceram 48 h em solução de formol a 10%. Em seguida, as línguas foram submetidas à clivagem, processamento e inclusão em parafina, enquanto os palatos foram acondicionados em frascos contendo solução de EDTA (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.) a 4% e mantidos à temperatura ambiente em mesa agitadora orbital (VDRL Shaker; Biomixer, Presidente Prudente, SP). A solução de EDTA foi trocada diariamente, a fim de acelerar o processo de descalcificação do tecido ósseo. Após aproximadamente 30 dias, as amostras apresentaram-se completamente descalcificadas e foram colocadas em um frasco contendo sulfato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.) a 5% por 1 h e em seguida lavadas em água corrente *overnight*, quando finalmente puderam ser processadas. O processamento, a inclusão e a microtomia foram realizados conforme Protocolo de Processamento Histológico da UEPG (ANEXO B).

As lâminas com cortes de 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (H.E.; Nuclear, Diadema, SP), também seguindo protocolo preconizado pelo referido laboratório (ANEXO C).

4.1.7.3.2 Obtenção das fotomicrografias e análise histopatológica descritiva

As fotomicrografias foram obtidas com o auxílio do *software* cellSens Standard (Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão), o qual registrou as imagens capturadas por uma câmera Olympus DP72 (Olympus Latin America, Miami, Flórida, EUA) acoplada a um microscópio ótico Olympus BX41 (Olympus Latin America), utilizando lentes objetivas de diferentes magnificações. Foi observado se havia presença de *C. albicans* nos tecidos, microabscessos, hiperplasia epitelial, hiperparaqueratose, desorganização da camada basal do epitélio, espongiose, exocitose e infiltrado inflamatório, além de áreas de despapilação na língua.^{23,24,70,75}

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises, constatou-se, inicialmente, a normalidade dos dados com o teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) com o teste de Levene (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA) ($\alpha=0,05$).

Para as análises do peso dos animais e de UFC/mL, foi utilizado o teste ANOVA 3-fatores (“antibiótico”, “grupo” e “tempo”) com medidas repetidas seguido pelo teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$) (IBM SPSS 19; SPSS Inc.).

O teste usado para estabelecer os níveis de concordância intraexaminador e interexaminadores para a avaliação dos escores das fotos do palato e da língua foi o coeficiente de Kappa (k). Valores $k=1,0$ indicam perfeita concordância, entre $0,81 \leq k < 1,0$ são considerados de excelente concordância, entre $0,61 \leq k < 0,80$ apontam alta concordância, entre $0,41 \leq k < 0,60$ são considerados de concordância moderada, entre $0,40 \leq k < 0,20$ indicam baixa concordância e entre $0 \leq k < 0,20$ indicam nenhuma concordância.⁷⁶ O coeficiente de concordância (%) também foi apresentado.

Para os escores de Edema e de Eritema, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para a avaliação em diferentes períodos para o mesmo grupo e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre grupos em um mesmo período ($\alpha=0,05$). Para a avaliação da associação entre a presença ou ausência de Erosão dentro de um mesmo grupo nos diferentes períodos e antibióticos, foi utilizado o teste de exato de Fisher ($\alpha=0,05$). Para o quesito Despapilação, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para a avaliação em diferentes períodos para o mesmo grupo e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre grupos em um mesmo período ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DA ESTOMATITE PROTÉTICA INDUZIDA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA

5.1.1 Triagem Dos Animais

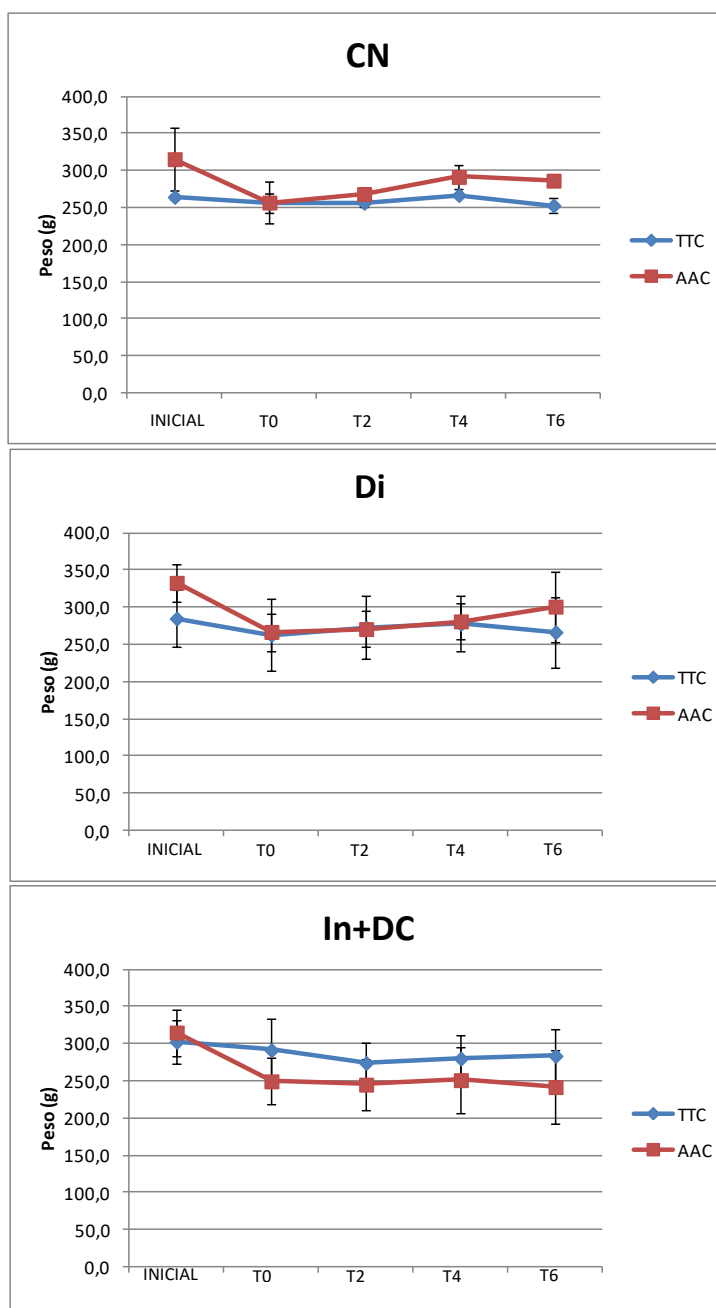
De 56 animais triados, nenhum apresentou colônias presuntivas de *C. albicans* em sua cavidade bucal, portanto, não houve necessidade de substituição.

5.1.2 Monitoramento Dos Animais

Dos 56 animais utilizados, apenas 2 foram perdidos durante o experimento durante os procedimentos de anestesia. Em relação à decimentação, quatro dispositivos foram perdidos no grupo Di e 6 no grupo In+DC para os ratos que recebiam tetraciclina. Para os ratos sob antibioticoterapia utilizando amoxicilina com ácido clavulânico, oito dispositivos foram perdidos no grupo Di e 7 no grupo In+DC. Pequena quantidade de detritos alimentares foi encontrada ao se remover os dispositivos em todos os grupos, independente do regime antibiótico.

Os resultados de acompanhamento dos pesos dos animais podem ser observados na Figura 12.

FIGURA 12 – Resultados das pesagens (g) dos animais



Fonte: O autor

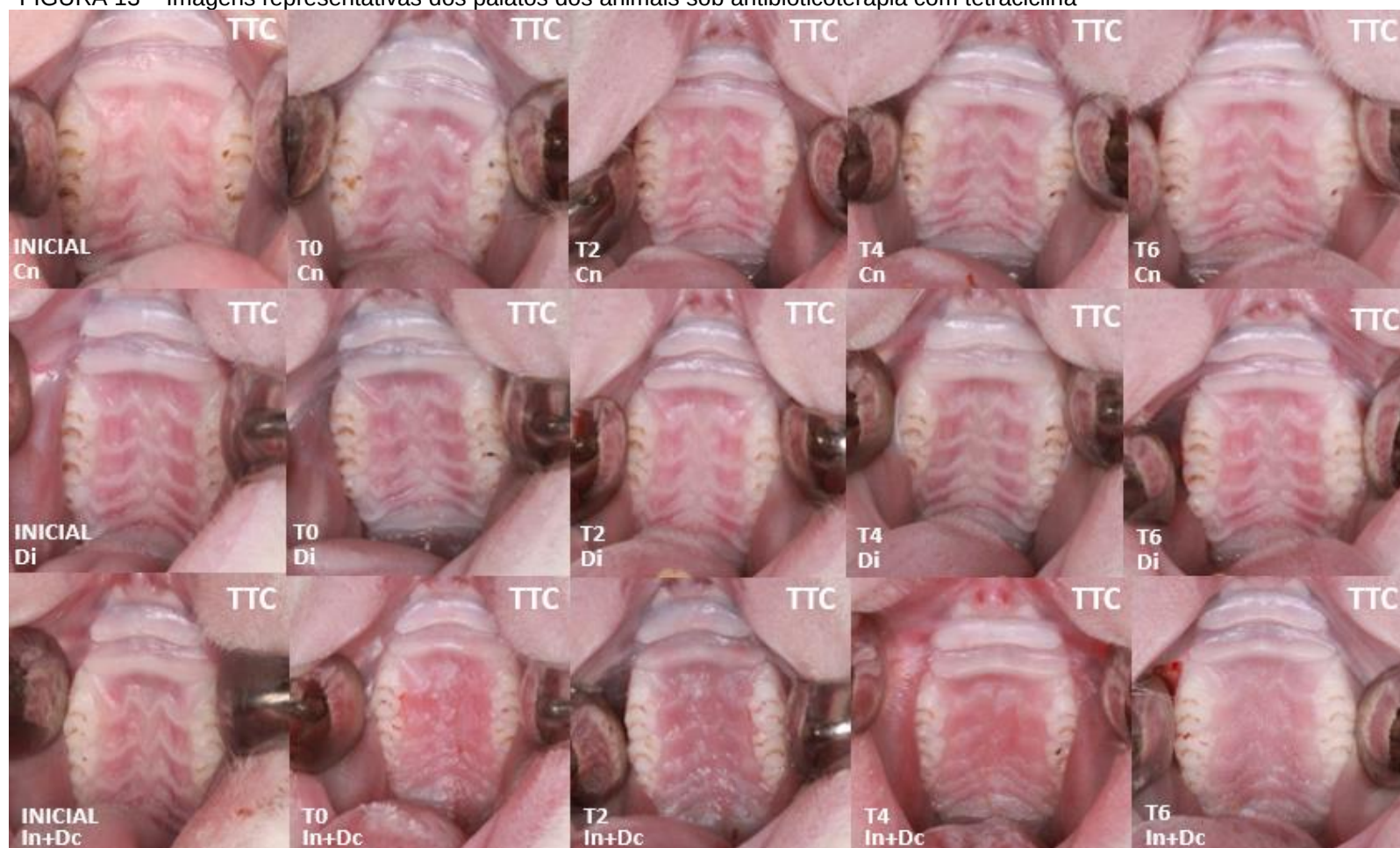
TTC: tetraciclina, AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico; T0: após período de indução da estomatite protética, T2: após 2 dias, T4: após 4 dias e T6: após 6 dias da indução da estomatite protética; CN: controle negativo, Di: dispositivo estéril e In+DC: inoculação+dispositivo contaminado

Como pode ser observado na Figura 12, houve variação no peso dos animais ao longo do período experimental para todos os grupos. Apesar disso, nenhum animal mostrou-se debilitado no decorrer do experimento.

5.1.3 Análise Visual

Fotografias do palato representativas de cada grupo experimental podem ser visualizadas nas Figuras 13 e 14 (Inicial, T0, T2, T4 e T6) e da língua podem ser visualizadas nas Figuras 15 e 16 (Inicial, T0, T2, T4 e T6) para os animais submetidos aos regimes antibióticos com tetraciclina e amoxicilina com ácido clavulânico, respectivamente.

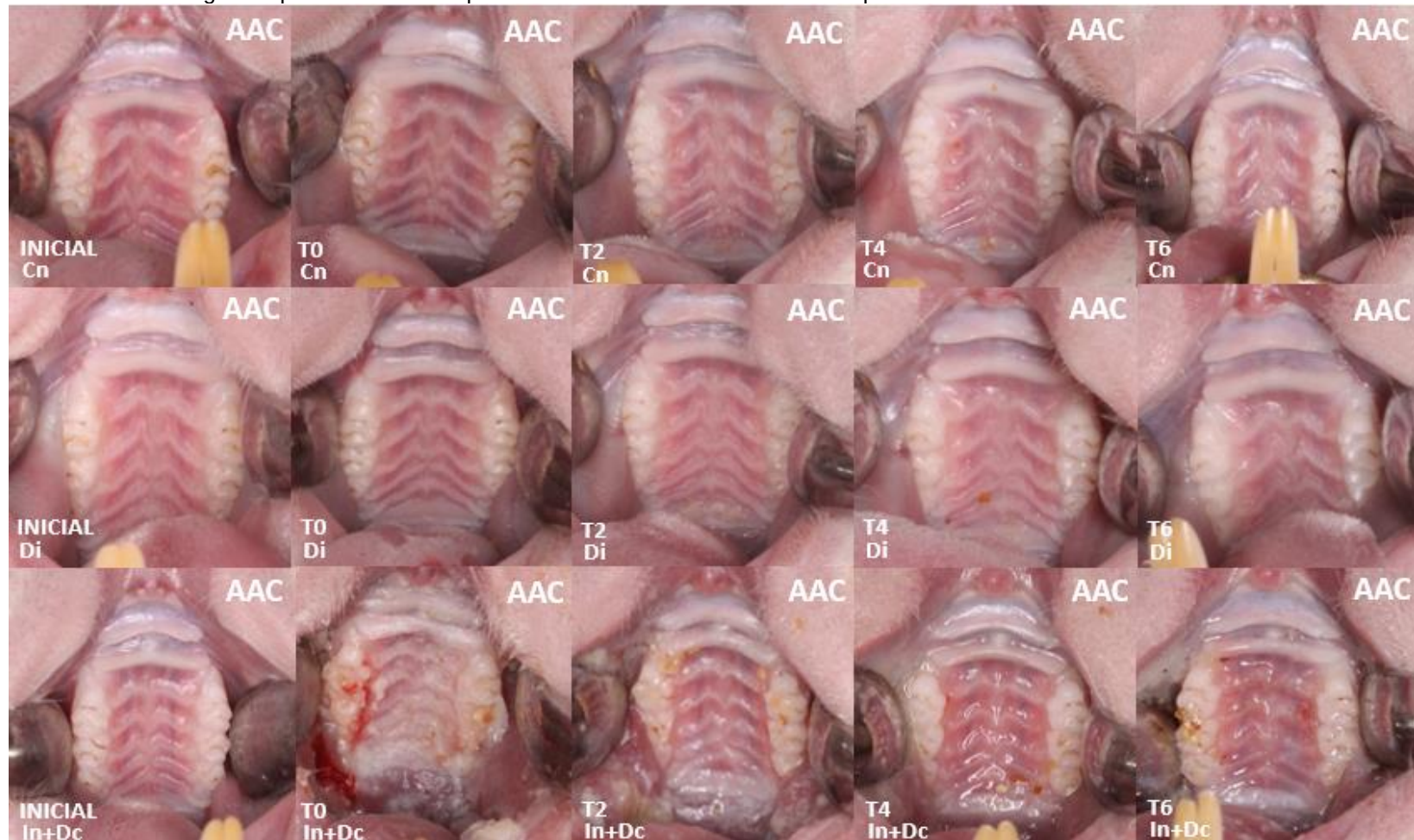
FIGURA 13 – Imagens representativas dos palatos dos animais sob antibioticoterapia com tetraciclina



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina; T0: após período de indução da estomatite protética, T2: após 2 dias, T4: após 4 dias e T6: após 6 dias da indução da estomatite protética; CN: controle negativo, Di: dispositivo estéril e In+DC: inoculação+dispositivo contaminado

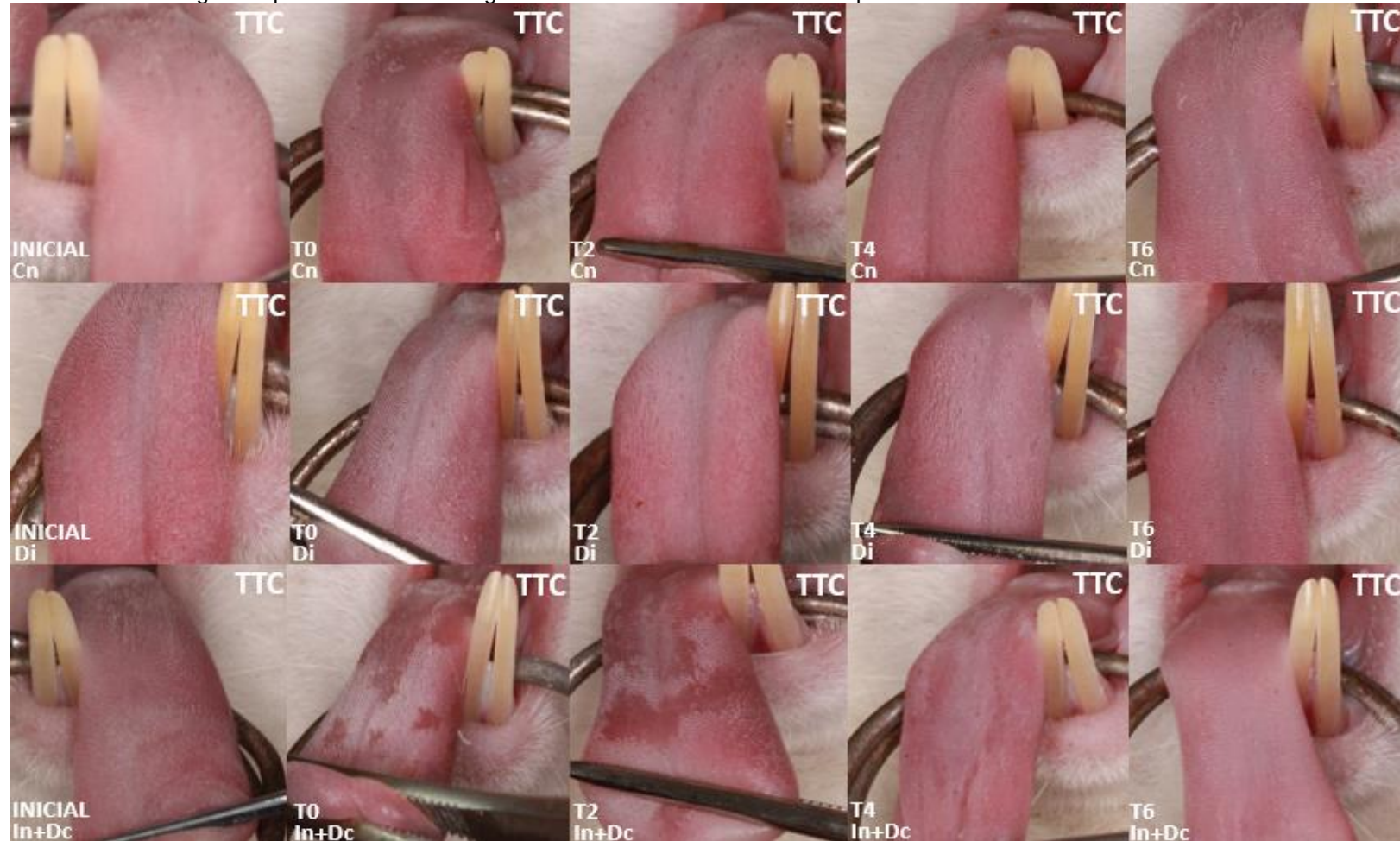
FIGURA 14 – Imagens representativas dos palatos dos animais sob antibioticoterapia com amoxicilina com ácido clavulânico



Fonte: O autor

AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T0: após período de indução da estomatite protética, T2: após 2 dias, T4: após 4 dias e T6: após 6 dias da indução da estomatite protética; CN: controle negativo, Di: dispositivo estéril e In+Dc: inoculação+dispositivo contaminado

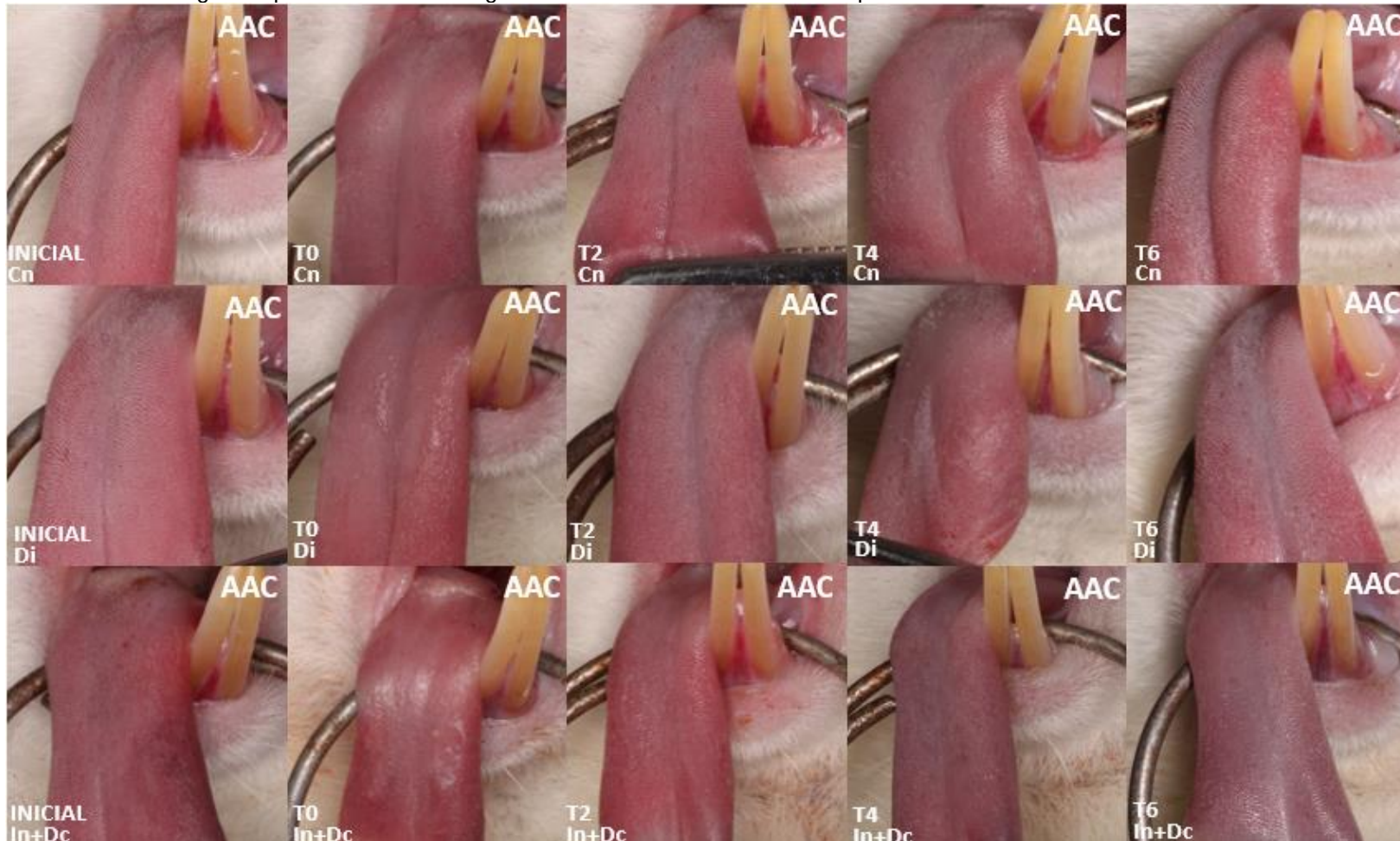
FIGURA 15 – Imagens representativas das línguas dos animais sob antibioticoterapia com tetraciclina



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina; T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias, T4: após 4 dias e T6: após 6 dias da indução da estomatite protética; CN: controle negativo, Di: dispositivo estéril e In+Dc: inoculação+dispositivo contaminado

FIGURA 16 – Imagens representativas das línguas dos animais sob antibioticoterapia com amoxicilina com ácido clavulânico

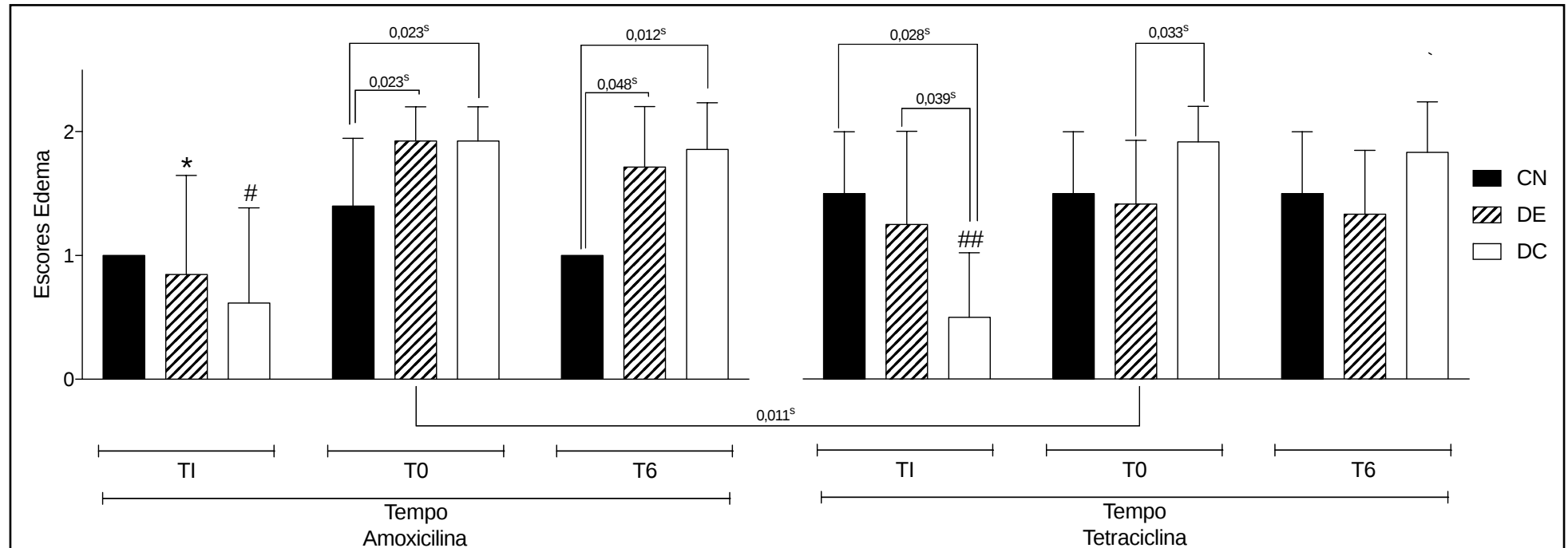


Fonte: O autor

AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T0: após período de indução da estomatite protética, T2: após 2 dias, T4: após 4 dias e T6: após 6 dias da indução da estomatite protética; CN: controle negativo, Di: dispositivo estéril e In+Dc: inoculação+dispositivo contaminado

A avaliação das fotografias dos palatos mostrou alto nível de concordância ($p < 0,0001$) entre os examinadores para os parâmetros Edema ($\kappa = 0,849$); Eritema ($\kappa = 0,723$) e Erosão ($\kappa = 0,762$). As distribuições dos escores para Edema, Eritema e Erosão estão representadas nas Figuras 17 a 19, respectivamente.

FIGURA 17 – Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Edema



Fonte: O autor

Colchetes superiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos em cada período de avaliação

Colchetes inferiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes antibióticos em cada grupo e período de avaliação

Símbolos representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo grupo nos diferentes períodos de avaliação

T1: período inicial; T0: após período de indução da estomatite protética; T6: após 6 dias da indução da estomatite protética

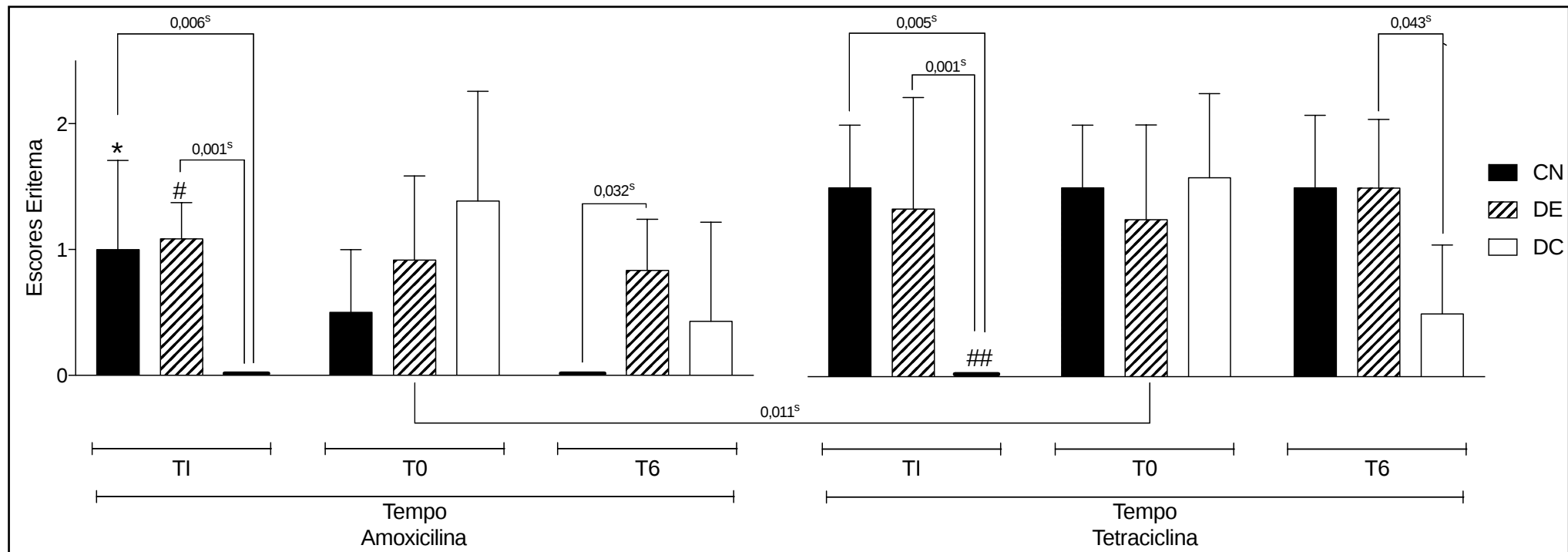
CN: controle negativo; Di: dispositivo estéril; In+DC: inoculação + dispositivo contaminado

Ao longo do período experimental, para AAC, maiores escores de Edema foram observados no grupo Di em T0 (* $p=0,001$) e no grupo In+DC em T0 (# $p=0,0001$) e em T6 (# $p=0,004$) em relação ao período inicial. Para a TTC, maiores escores de Edema foram observados no grupo In+DC em T0 (### $p<0,0001$) e em T6 (## $p=0,002$) em relação ao período inicial (Figura 17).

Na comparação entre os grupos, para a AAC, maiores escores de Edema foram observados no grupo Di ($p=0,023^S$) e no grupo In+DC ($p=0,023^S$) em relação ao CN em T0. O mesmo foi observado no grupo Di ($p=0,048^S$) e no grupo In+DC ($p=0,012^S$) em relação ao CN em T6. Para a TTC, maiores escores de Edema foram observados no grupo In+DC em relação ao grupo CN ($p=0,028^S$) e em relação ao grupo Di ($p=0,039^S$) no período inicial. Maiores escores de Edema foram observados no grupo In+DC em relação ao grupo Di ($p=0,033^S$) em T0 (Figura 17).

Na comparação entre os antibióticos, houve diferença significativa ($p=0,011^S$) apenas para o grupo Di em T0 (Figura 17).

FIGURA 18 – Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Eritema



Fonte: O autor

Colchetes superiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos em cada período de avaliação

Colchetes inferiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes antibióticos em cada grupo e período de avaliação

Símbolos representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo grupo nos diferentes períodos de avaliação

T1: período inicial; T0: após período de indução da estomatite protética; T6: após 6 dias da indução da estomatite protética

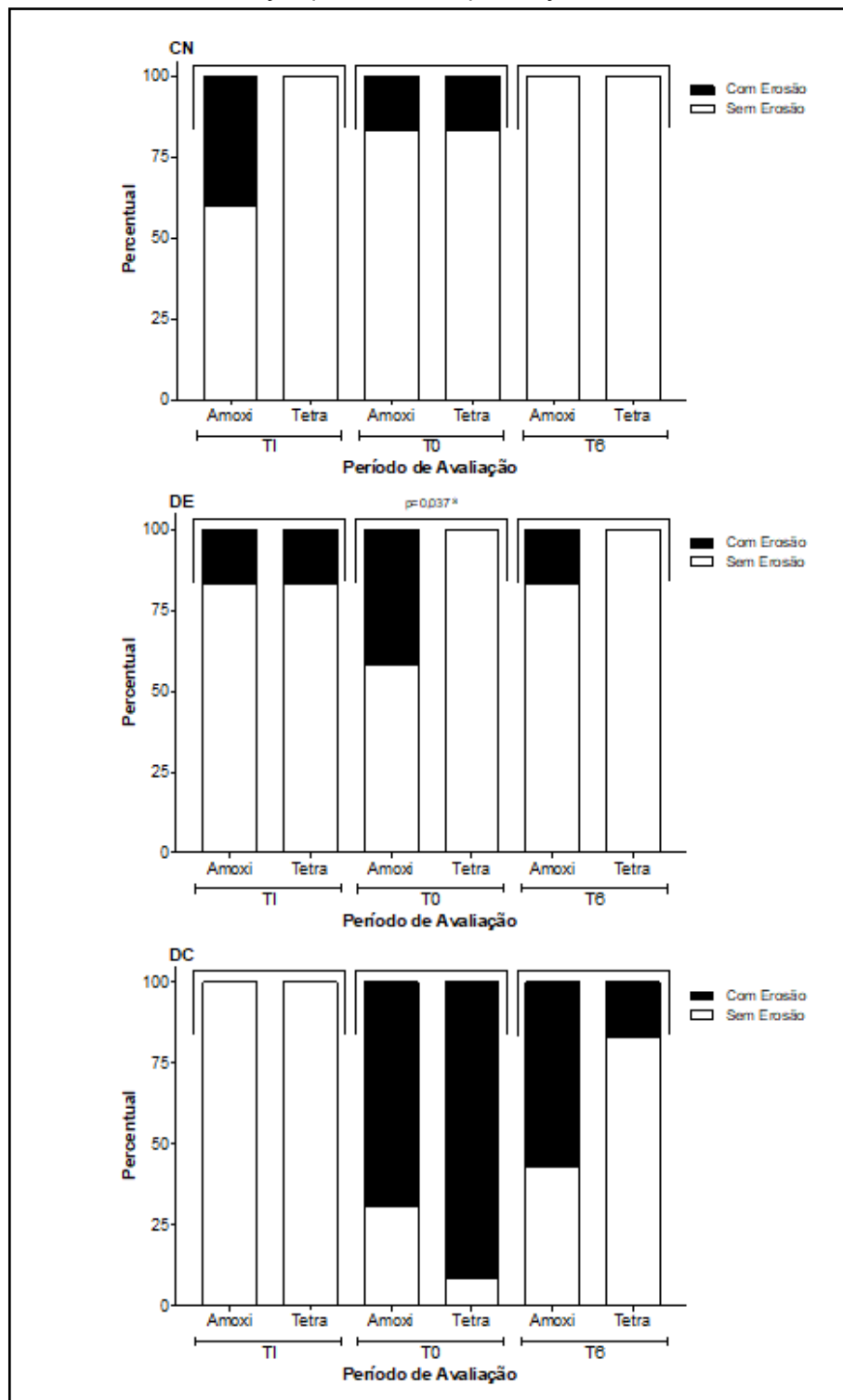
CN: controle negativo; Di: dispositivo estéril; In+DC: inoculação + dispositivo contaminado

Ao longo do período experimental, para a AAC, menores escores de Eritema foram observados no grupo CN em T6 em relação ao período inicial (* $p=0,029$) e no grupo Di em T0 em relação ao período inicial (# $p=0,0002$). Para TTC, maiores escores de Eritema foram observados no grupo In+DC em T0 em relação ao período inicial (## $p<0,0001$) (Figura 18).

Na comparação entre os grupos, para a AAC, maiores escores de Eritema foram observados para o grupo CN ($p=0,006^S$) e para o grupo Di ($p=0,001^S$) em relação ao grupo In+DC no período inicial. Maiores escores de Eritema também foram observados para o grupo Di ($p=0,032^S$) em relação ao grupo CN em T6. Para a TTC, maiores escores de Eritema foram observados para o grupo CN ($p=0,005^S$) e para o grupo Di ($p=0,001^S$) em relação ao grupo In+DC no período inicial. Menores escores de Eritema foram observados para o grupo In+DC ($p=0,043^S$) em relação ao grupo Di (Figura 18).

Na comparação entre os antibióticos, houve diferença significativa ($p=0,011^S$) apenas para o grupo Di em T0 (Figura 18).

FIGURA 19 – Distribuição percentual da presença e ausência da Erosão



Fonte: O autor

Colchetes superiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os antibióticos em cada período de avaliação

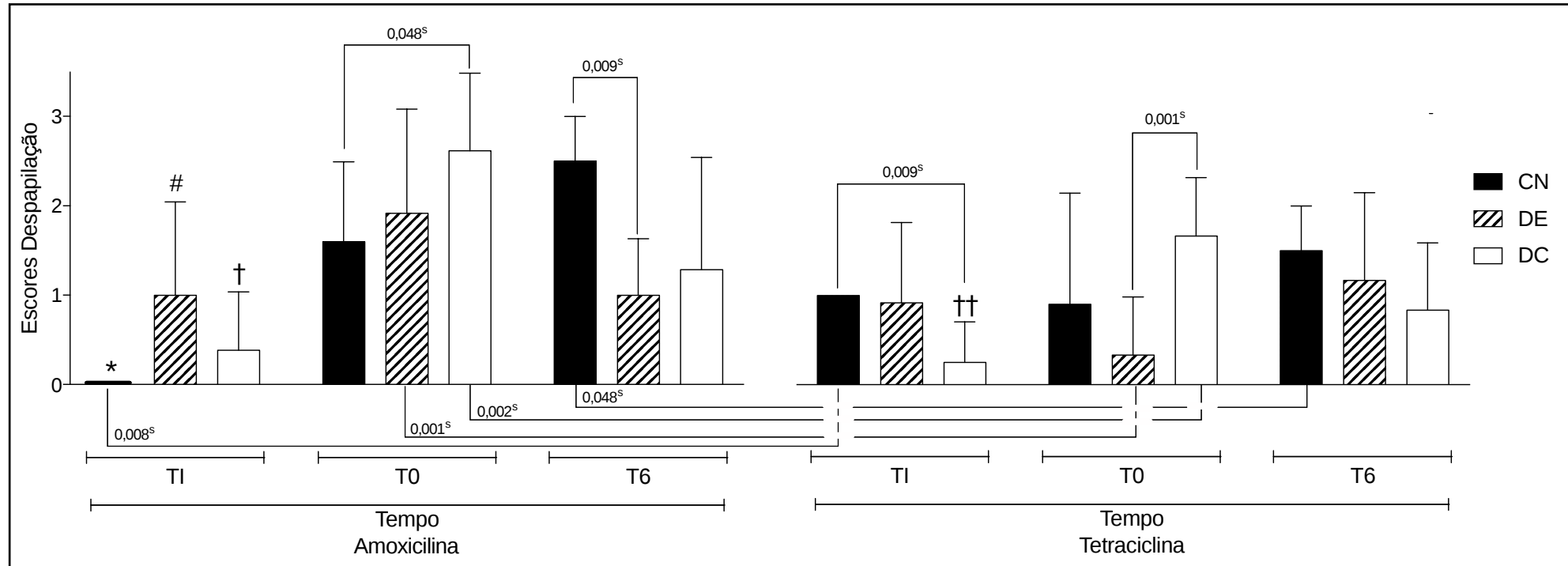
T1: período inicial; T0: após período de indução da estomatite protética; T6: após 6 dias da indução da estomatite protética

CN: controle negativo; Di: dispositivo estéril; In+DC: inoculação + dispositivo contaminado

Foi observada associação significativa entre a presença ou ausência de Erosão no palato do grupo Di em T0 e maior percentual de Erosão foi observado para os animais submetidos à administração de AAC ($p=0,037$).

A avaliação das fotografias das línguas mostrou alto nível de concordância ($p<0,0001$) entre os examinadores para o parâmetro Despapilação ($\kappa= 0,853$). A distribuição dos escores para Despapilação está representada na Figura 20.

FIGURA 20 – Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Despapilação



Fonte: O autor

Colchetes superiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos em cada período de avaliação

Colchetes inferiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes antibióticos em cada grupo e período de avaliação

Símbolos representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo grupo nos diferentes períodos de avaliação

T1: período inicial; T0: após período de indução da estomatite protética; T6: após 6 dias da indução da estomatite protética

CN: controle negativo; Di: dispositivo estéril; In+DC: inoculação + dispositivo contaminado

Ao longo do período experimental, para AAC, maior despapilação foi observada no grupo CN em T6 (* $p=0,003$), no grupo Di em T0 (# $p=0,028$) e no grupo In+DC († $p<0,0001$) em relação ao período inicial. Para TTC, foi observada maior despapilação apenas no grupo In+DC em T0 (†† $p=0,0001$) em relação ao período inicial.

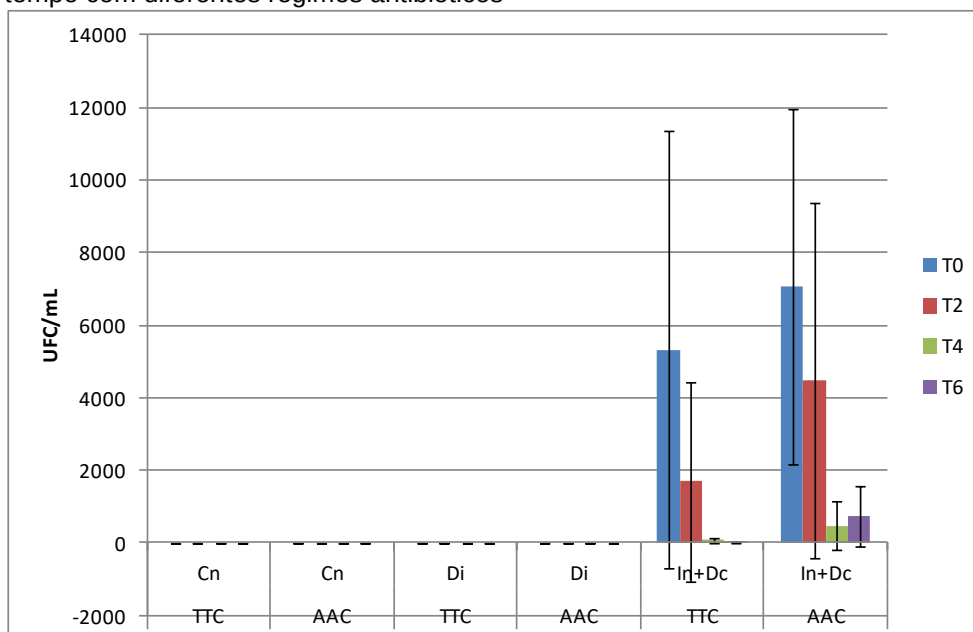
Na comparação entre os grupos, para AAC, maior despapilação foi observada para o grupo In+DC ($p=0,048^S$) em relação ao grupo CN em T0 e para o grupo CN ($p=0,009^S$) em relação ao grupo Di em T6. Para TTC, maior despapilação foi observada para o grupo CN ($p=0,009^S$) em relação ao grupo In+Dc no período inicial e para o grupo In+DC ($p=0,001^S$) em relação ao grupo Di ($p=0,001^S$) em T0.

Na comparação entre os antibióticos, maior despapilação foi observada para os ratos do grupo CN sob TTC no período inicial ($p=0,008^S$). Maior despapilação foi observada para os ratos sob AAC dos grupos Di ($p=0,001^S$) e In+DC ($p=0,002^S$) em T0 e do grupo CN ($p=0,048^S$) em T6.

5.2 CONTAGEM DE UFC/mL

Os resultados de contagem de UFC/mL das coletas nos palatos dos animais podem ser observados na Figura 21. *C. albicans* foi recuperada apenas no grupo In+DC em ambos os regimes antibióticos. Houve redução significativa ($p<0,05$) da contagem de UFC/mL de *C. albicans* nos períodos T4 e T6 em relação a T2 e T0, os quais não tiveram diferença entre si ($p>0,05$).

FIGURA 21 – Resultados da contagem de UFC/mL de *C. albicans* ao longo do tempo com diferentes regimes antibióticos



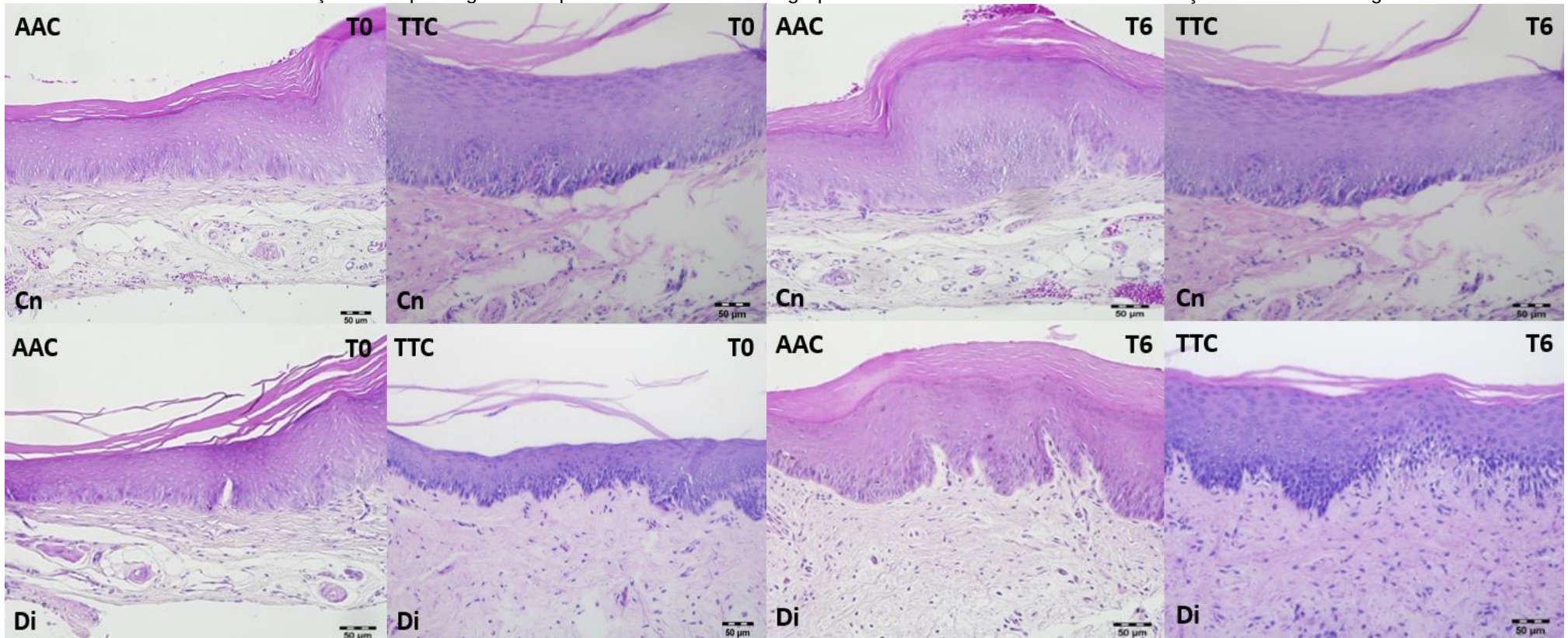
Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T0: após período de indução da estomatite protética, T2: após 2 dias, T4: após 4 dias e T6: após 6 dias da indução da estomatite protética; CN: controle negativo, Di: dispositivo estéril e In+DC: inoculação+dispositivo contaminado

5.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Não foram observadas alterações tanto no palato como na língua dos animais dos grupos CN e Di nos períodos experimentais T0 ou T6 em ambos os regimes antibióticos utilizados (Figuras 22 e 23, respectivamente).

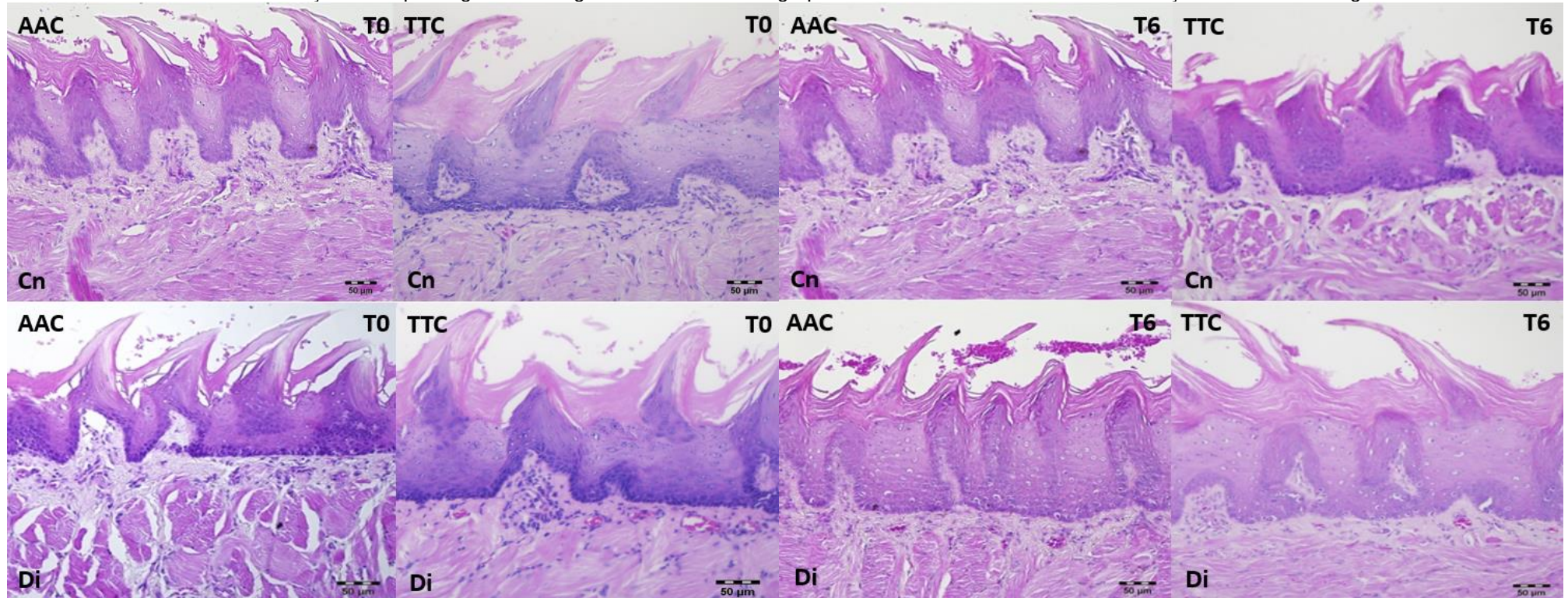
FIGURA 22 – Ausência de alterações histopatológicas nos palatos dos animais dos grupos CN e Di em T0 e T6 com administração de diferentes regimes antibióticos



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T0: logo após período de indução da estomatite protética; T6: 6 dias após período de indução da estomatite protética; CN: controle negativo e Di: dispositivo estéril

FIGURA 23 – Ausência de alterações histopatológicas nas línguas dos animais dos grupos CN e Di em T0 e T6 com administração de diferentes regimes antibióticos

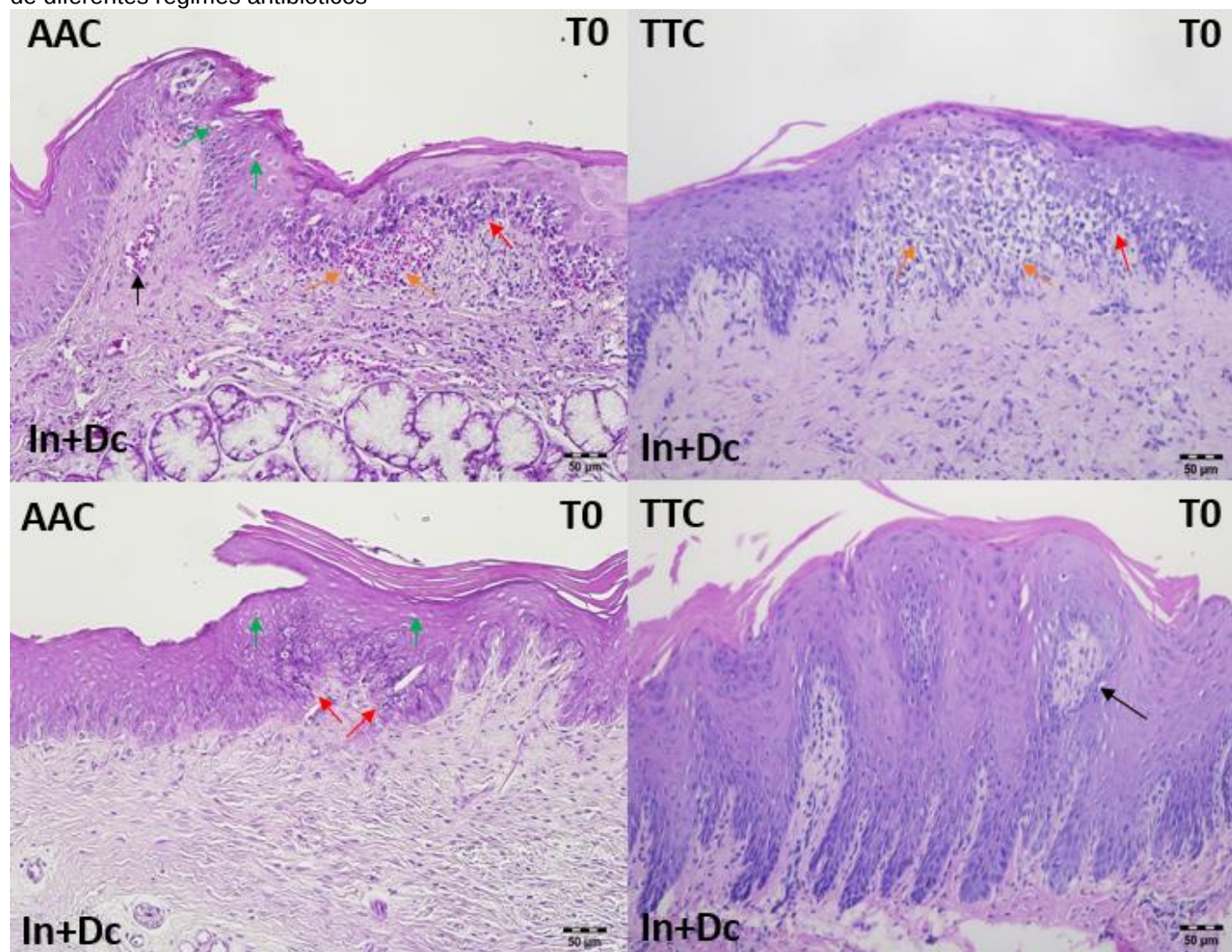


Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T0: após período de indução da estomatite protética; T6: 6 dias após período de indução da estomatite protética CN: controle negativo e Di: dispositivo estéril

Em relação ao grupo In+DC, foi possível a identificação de microabscessos, alterações da camada basal, edema intracelular e discreto infiltrado inflamatório no tecido palatal dos animais sob ambos os regimes antibióticos nos períodos experimentais T0 e T6 (Figuras 24 e 25, respectivamente).

FIGURA 24 – Fotomicrografias representativas dos palatos dos animais do grupo In+DC em T0 com administração de diferentes regimes antibióticos

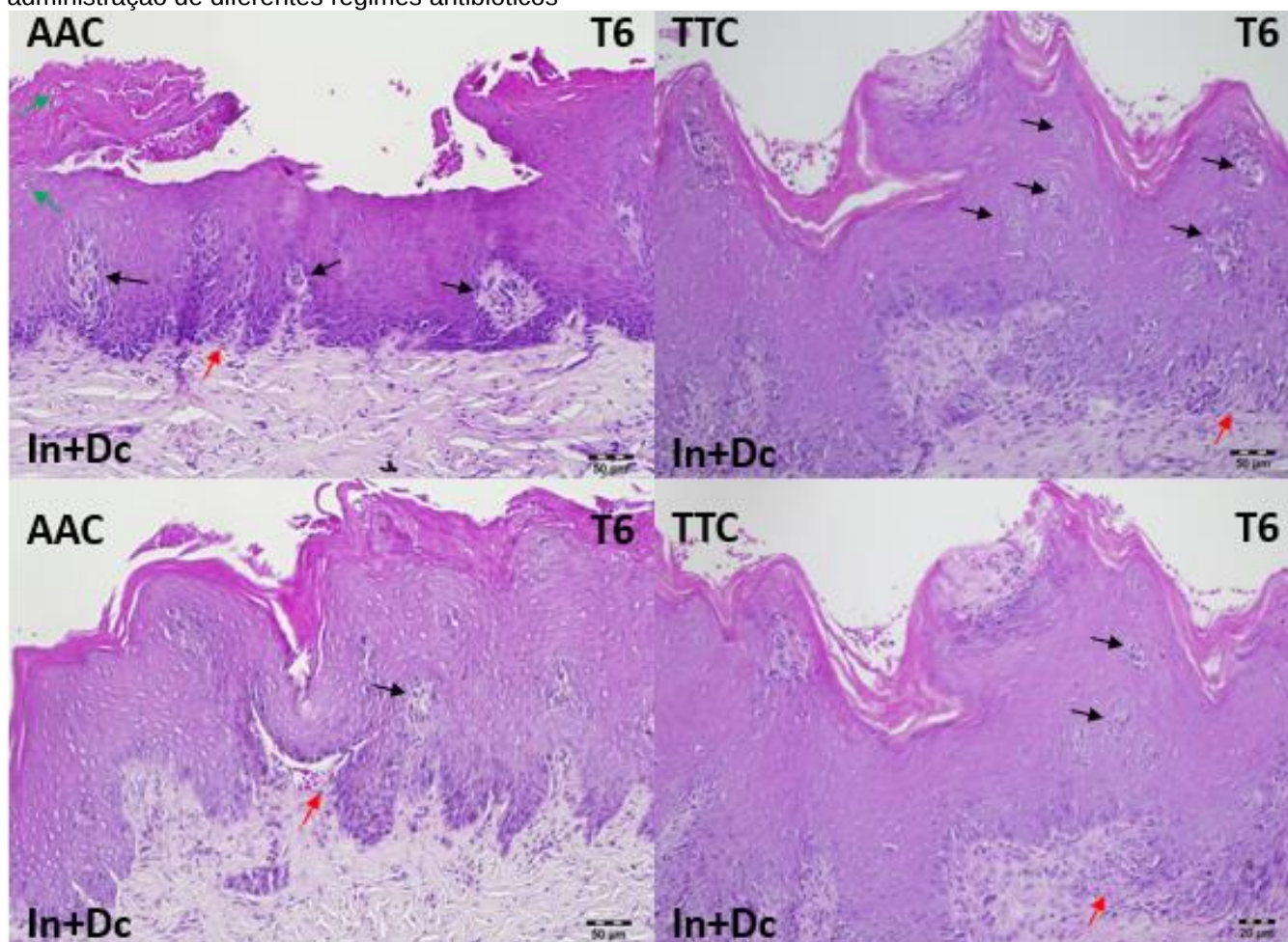


Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T0: após período de indução da estomatite protética; In+DC: inoculação+ dispositivo contaminado

Setas pretas indicam microabscessos no epitélio; Setas vermelhas indicam alteração da camada basal; Setas alaranjadas indicam infiltrado inflamatório; Setas verdes indicam edema intracelular

FIGURA 25 – Fotomicrografias representativas dos palatos dos animais do grupo In+DC em T6 com administração de diferentes regimes antibióticos



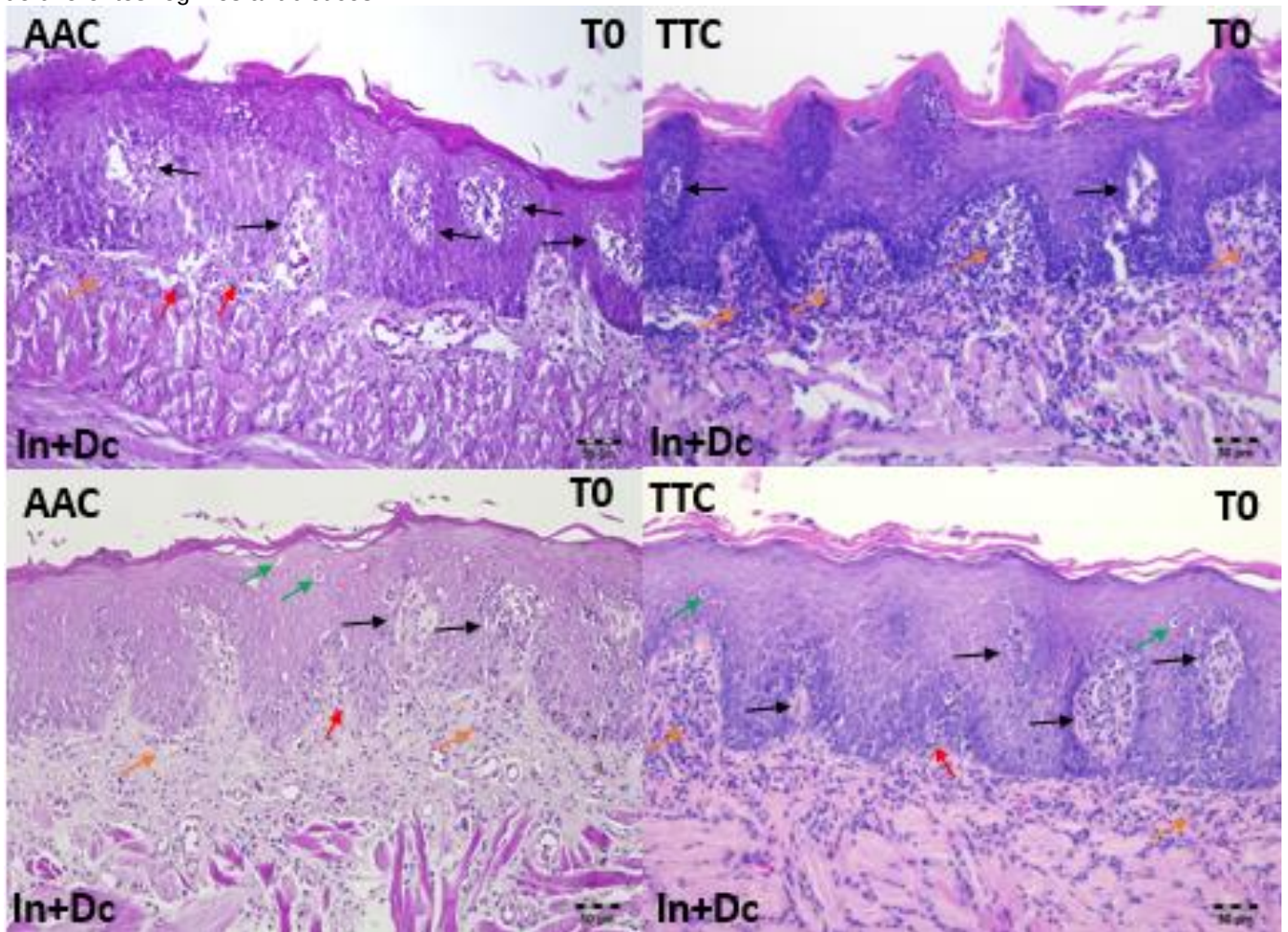
Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T6: 6 dias após período de indução da estomatite protética; In+DC: inoculação+dispositivo contaminado

Setas pretas indicam microabscessos no epitélio; Setas vermelhas indicam alteração da camada basal; Setas verdes indicam edema intracelular

Na língua dos animais do grupo In+DC sob ambos os regimes antibióticos, foi possível a identificação de áreas de despilação, microabscessos, edema intracelular e intenso infiltrado inflamatório nos períodos experimentais T0 e T6 (Figuras 26 e 27, respectivamente).

FIGURA 26 – Fotomicrografias representativas das línguas dos animais do grupo In+DC em T0 com administração de diferentes regimes antibióticos

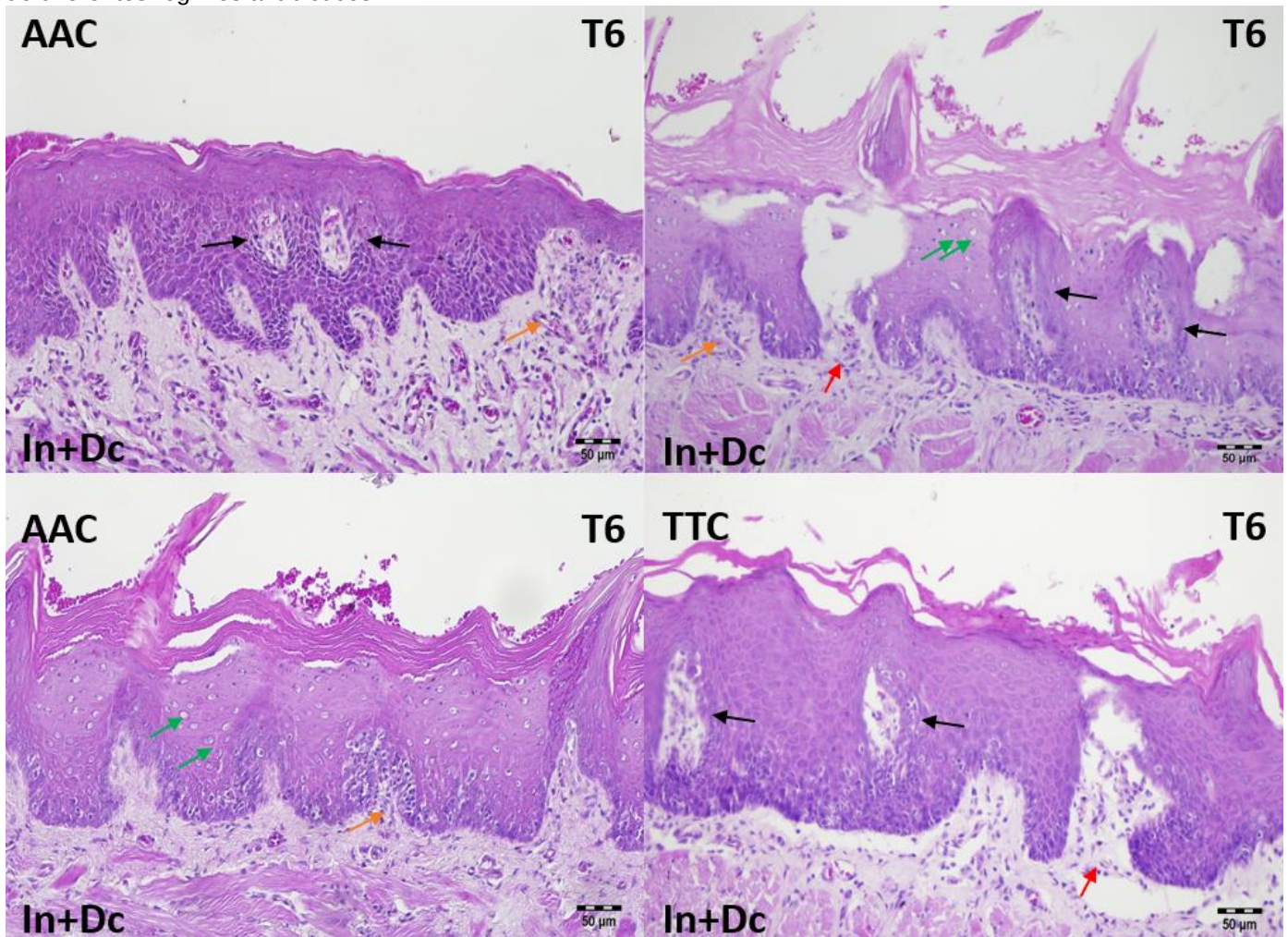


Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T0: após período de indução da estomatite protética; In+DC: inoculação+dispositivo contaminado

Setas pretas indicam microabscessos no epitélio; Setas vermelhas indicam alteração da camada basal; Setas alaranjadas indicam infiltrado inflamatório; Setas verdes indicam edema intracelular

FIGURA 27 – Fotomicrografias representativas das línguas dos animais do grupo In+DC em T6 com administração de diferentes regimes antibióticos



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T6: 6 dias após o período de indução da estomatite protética; In+DC: inoculação+dispositivo contaminado

Setas pretas indicam microabscessos no epitélio; Setas vermelhas indicam alteração da camada basal; Setas alaranjadas indicam infiltrado inflamatório; Setas verdes indicam edema intracelular

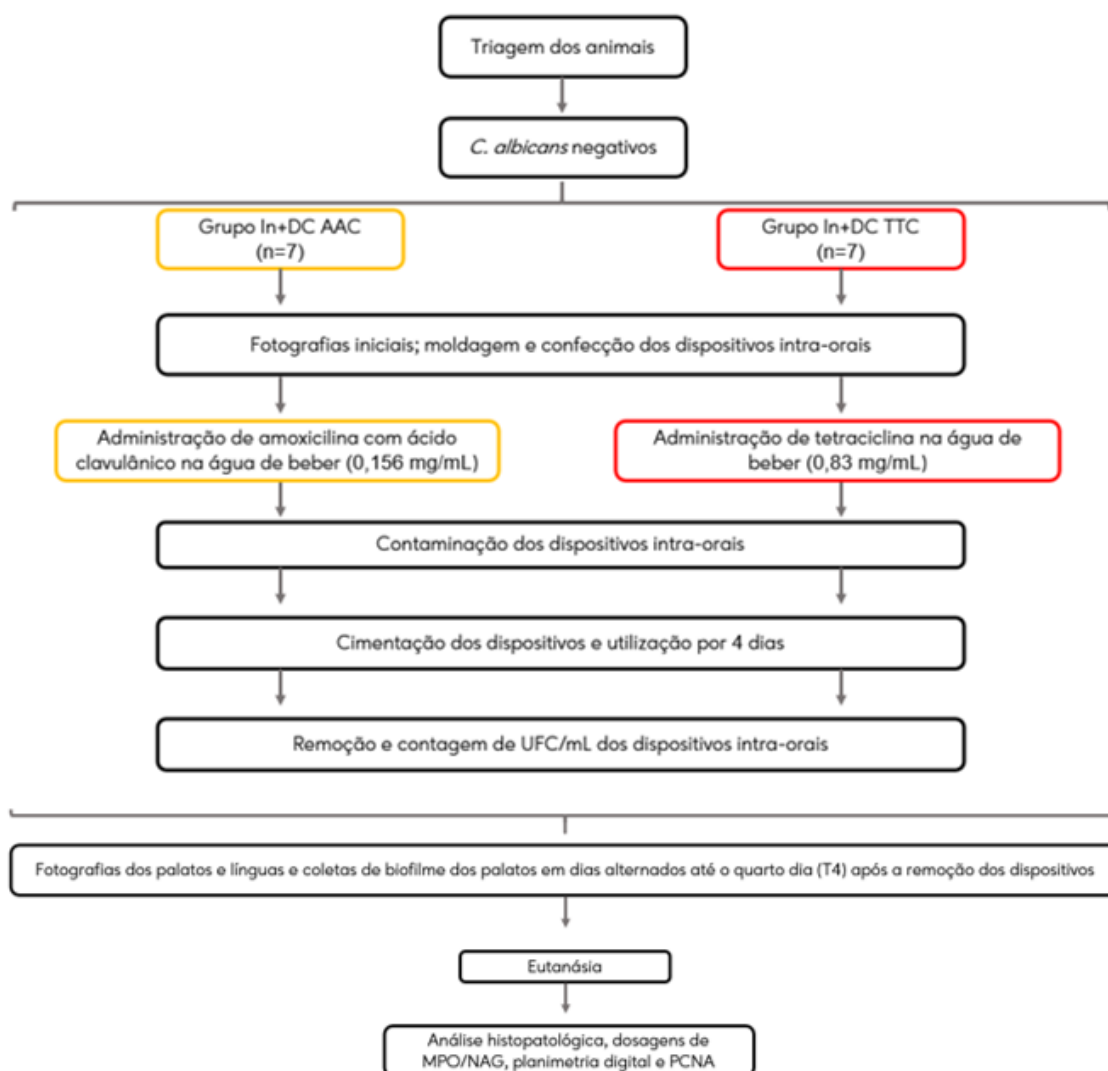
6 ETAPA II - DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Delineamento Experimental

O fluxograma e linha do tempo da Etapa II podem ser visualizados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

FIGURA 28 - Fluxograma da Etapa II



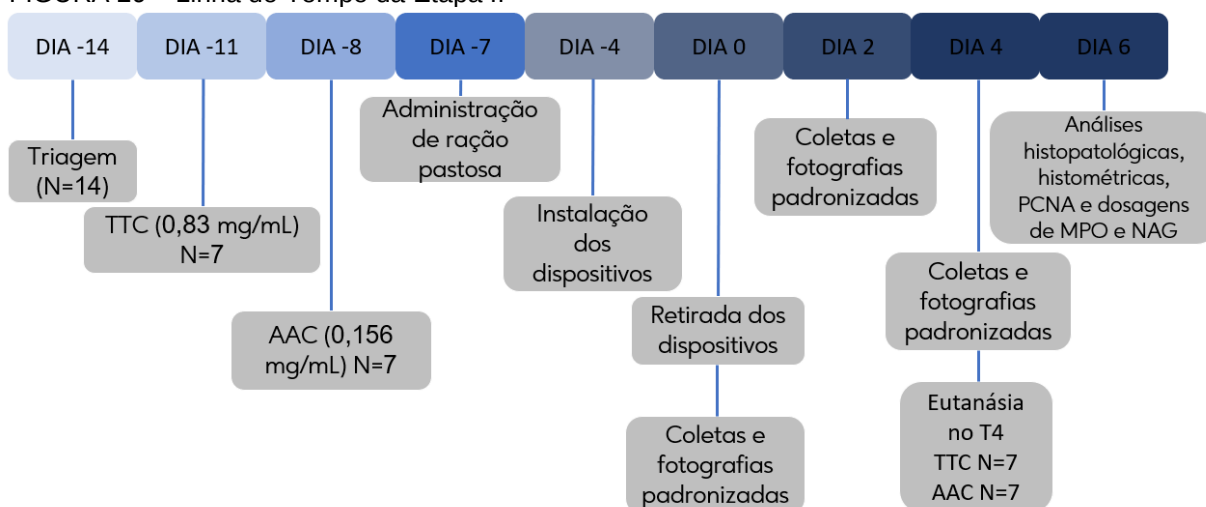
Fonte: O autor

AAC: amoxicilina com ácido clavulânico

TTC: tetraciclina

In+DC: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

FIGURA 29 – Linha do Tempo da Etapa II



Fonte: O autor

TTC: Cloridrato de Tetraciclina; AAC: Amoxicilina associado a ácido clavulânico

6.1.2 Animais E Grupos De Experimentação

Para a execução da Etapa II, foram utilizados 14 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Os animais foram obtidos do Núcleo Avançado de Estudos da Vida da Universidade Estadual de Ponta Grossa (NAEVI/UEPG), após aprovação do formulário de autorização para uso de animais em pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade (protocolo CEUA 038/2018 – ANEXO D). As demais informações sobre Animais de Experimentação, Confecção dos dispositivos intra-orais, Obtenção do inóculo de *C. albicans* e Contaminação dos dispositivos intra-orais foram de acordo com a Etapa I.

A Etapa II foi realizada em apenas um período experimental: T4- eutanásia após quatro dias da indução da estomatite protética e remoção do dispositivo intra-oral, para ambos os antibióticos (tetraciclina ou amoxicilina com ácido clavulânico). Nesta etapa, apenas o grupo experimental In+DC (n=7) foi avaliado. Isto porque na Etapa I foi observada redução dos sinais clínicos da estomatite protética em T6, além de redução significativa da contagem de UFC/mL de *C. albicans*.

6.1.3 Análise Visual

Idem a Etapa I.

As 112 fotos foram avaliadas por dois examinadores experientes, calibrados e cegos para o experimento. Para a calibração intra-examinador, os avaliadores examinaram as fotos em dois momentos, com um intervalo de 7 dias entre as avaliações.

6.1.4 Contagem De UFC/mL

6.1.4.1 Contagem de UFC/mL de *C. albicans* e *Candida* spp. dos palatos

A contagem de unidades formadoras de colônias tanto de *C. albicans* como de outras espécies de *Candida* foi de acordo com a Etapa I.

6.1.4.2 Contagem de UFC/mL de *C. albicans* e *Candida* spp. dos dispositivos intra-orais

Após a remoção dos dispositivos dos palatos dos animais, o biofilme formado foi destacado em vórtex durante 5 min. Para isso, os dispositivos foram imersos em 3 mL de PBS estéril a 4°C em tubos de Falcon. Uma alíquota de 25 µL da suspensão após agitação foi removida e a quantificação do biofilme desprendido foi realizada por meio de contagem de UFC/mL tanto de *C. albicans* como de *Candida* spp. a partir da semeadura de diluições seriadas em ágar *Candida* CHROMagar® conforme item 4.7.2.

6.2 DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO) E N- ACETILGLUGOSAMINIDASE (NAG)

Para o ensaio de dosagem de MPO, amostras (50 a 100 mg) das mucosas dos palatos da região compreendida entre os segundos e terceiros molares superiores e amostras (50 a 100 mg) das línguas foram separadas em *ependorfs* e mantidas em um recipiente de isopor com gelo durante todo o procedimento. A seguir, as amostras foram imersas em 1 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4; Sigma-Aldrich) e homogeneizadas utilizando um homogeneizador de tecidos (Homogeneizador T 10 Basic Ultra Turrax; IKA®, Campinas, SP) por 45 s a 0°C. O homogenato foi centrifugado (Centrifuge 5810 R; Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP)

a 13.000 rpm a 4°C por 10 min; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTBA; Sigma-Aldrich). Uma alíquota de 1,5 mL foi, então, removida, transferida para um microtubo e centrifugada a 13.000 rpm a 4°C por 10 min. Alíquotas de 30 µL do sobrenadante foram transferidas em duplicata para placas de 96 poços. A esses poços, foram adicionados 180 µL da seguinte solução: 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 80 µL de PBS 0,22 M (pH 5,4), 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% (Sigma-Aldrich). Em seguida, foram adicionados 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB; Sigma-Aldrich) 18,4 mM dissolvidos em uma solução aquosa de dimetilformamida (Sigma-Aldrich) a 8%. As placas foram incubadas na própria leitora de microplacas (Multiskan FC; Thermo Scientific, São Paulo, SP) a 37°C. Finalmente, foram adicionados 30 µL de acetato de sódio (1,46 mM, pH 3,0; Sigma-Aldrich) e as leituras foram feitas a cada 2 min (total de 5 leituras) a 650 nm.

Para o ensaio de dosagem de NAG, amostras (50 a 100 mg) das mucosas dos palatos também da região compreendida entre os segundos e terceiros molares superiores e amostras (50 a 100 mg) das línguas foram imersas em 0,75 mL de solução de fosfato de sódio 80 mM + 0,5% HTAB. Os tecidos foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos por 45 s a 4°C. O homogenato foi decantado em microtubo; foram adicionados 0,75 mL de solução de fosfato de sódio 80 mM + 0,5% HTAB e a centrifugação feita a 12.000 rpm a 4°C por 15 min. Alíquotas de 25 µL foram transferidas em triplicata para placas de 96 poços. A esses poços, foram adicionados 100 µL de tampão citrato (50 mM, pH 4,5; Sigma-Aldrich) e 25 µL de p-nitrofenil-acetamida-µglicopiranosídeo (2,24 mM; Sigma-Aldrich) dissolvidos em água Milli-Q® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). As placas foram incubadas na própria leitora de microplacas a 37°C por 1 h; foram adicionados 30 µL de tampão glicina (200 mM, pH 10,4; Sigma-Aldrich) e uma única leitura foi feita a 405 nm.

Paralelamente a essas dosagens, também foi realizada a dosagem de proteína dos tecidos utilizando o método de Bradford, que consiste na reação de resíduos de aminoácidos específicos com o corante *Coomassie brilliant blue G-250*.⁷⁷ Tal ensaio é considerado simples, rápido e sensível⁷⁷ e foi realizado para que os resultados obtidos pudessem ser expressados em D.O./mg de proteína.

6.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Após eutanásia, o palato e a língua dos animais foram removidos cirurgicamente e acondicionados em frascos com solução de formol a 10% (Merck Millipore, Damstsd, Alemanha) contendo PBS pH neutro e encaminhadas para o processamento histológico. Para o palato, selecionou-se a faixa de tecido entre mesial dos primeiros molares à metade dos segundos molares superiores.²⁹

6.3.1 Processamento Das Amostras Histopatológicas

Idem a Etapa I. O processamento, a inclusão em parafina e a microtomia foram realizados conforme Protocolo de Processamento Histológico da FOB/USP (ANEXO E). As lâminas com cortes de 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (H.E.; ANEXO F) (Nuclear, Diadema, SP), também seguindo protocolo preconizado pelo referido laboratório.

6.3.2 Obtenção Das Fotomicrografias E Análise Descritiva

As lâminas dos palatos e das línguas dos animais foram digitalizadas com *scanner* de alta resolução (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, EUA) e as imagens foram obtidas com o *software* ImageScope (Aperio Technologies Inc). Foi observado se havia presença de *C. albicans* nos tecidos, microabscessos, hiperplasia epitelial, hiperparaqueratose, desorganização da camada basal do epitélio, espongirose, exocitose e infiltrado inflamatório, além de áreas de despapilação na língua.^{23,24,70,75}

6.3.3 Análise Histométrica Dos Palatos Por Planimetria Digital

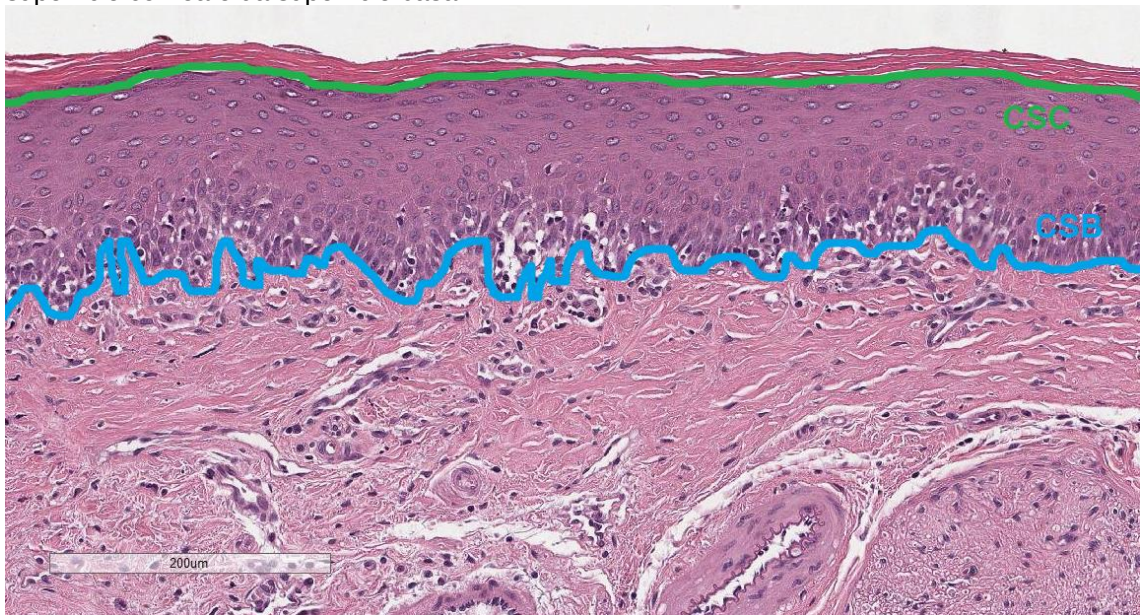
Para análises quantitativas dos palatos, foram utilizados 5 cortes histológicos por animal. Para cada maxila, três campos histológicos correspondentes à mesial dos primeiros molares até metade dos segundos molares superiores foram analisados com lente objetiva de imersão de 40x utilizando um *software* de análise digital (AxioVision 4.8., Carl Zeiss., Berlim, DE, Alemanha). Nove variáveis foram avaliadas:

- 1) Comprimento da superfície córnea (µm);
- 2) Comprimento da superfície basal (µm);

- 3) Proporção entre o comprimento da superfície basal em relação ao comprimento da superfície córnea;
- 4) Espessura de queratina (μm);
- 5) Espessura do compartimento celular (μm);
- 6) Proporção entre a espessura do compartimento celular em relação à espessura de queratina;
- 7) Área de queratina (μm^2);
- 8) Área do compartimento celular (μm^2);
- 9) Proporção entre a área do compartimento celular em relação à área de queratina.

Fotomicrografias representativas das variáveis mensuradas por planimetria digital podem ser observadas nas Figuras 30 a 32.

FIGURA 30 – Fotomicrografia representativa da análise quantitativa do comprimento da superfície córnea e da superfície basal

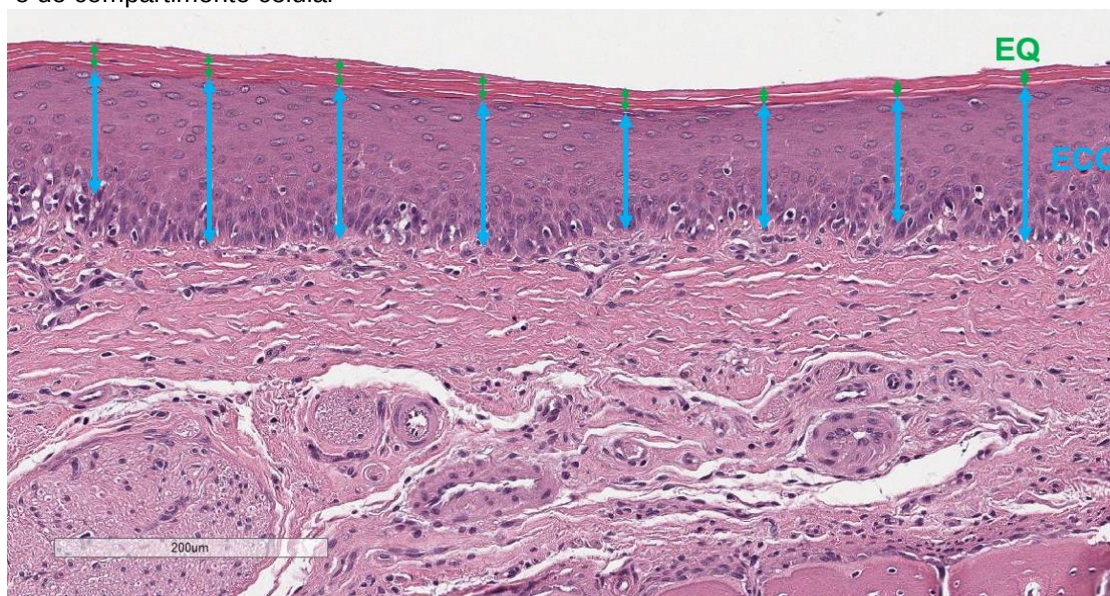


Fonte: O autor

CSC: comprimento da superfície córnea

CSB: comprimento da superfície basal

FIGURA 31 – Fotomicrografia representativa da análise quantitativa da espessura de queratina e do compartimento celular

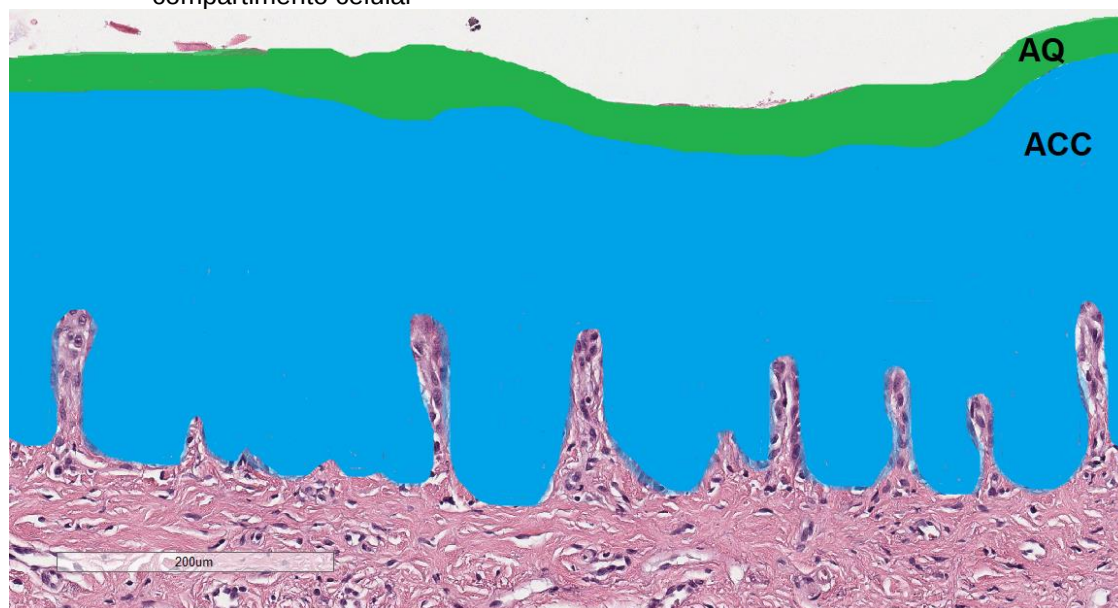


Fonte: O autor

EQ: espessura de queratina

ECC: espessura do compartimento celular

FIGURA 32 – Fotomicrografia representativa da análise quantitativa da área de queratina e de compartimento celular



Fonte: O autor

AQ: área de queratina

ACC: área do compartimento celular

Para obter a média da espessura da queratina e do compartimento celular de cada campo, foram realizadas oito mensurações para cada variável. 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.

6.3.4 Expressão De Proliferação Celular (PCNA)

O nível de expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é considerado um marcador para a proliferação de células por estar diretamente relacionado com as atividades mitóticas locais.⁴⁷ Para a análise da expressão de proliferação celular, foram utilizados os cortes histológicos dos palatos correspondentes à mesial dos primeiros molares até a metade dos segundos molares, que posteriormente foram desparafinizados por imersão em xileno e desidratados em uma série de álcoois graduados.

As lâminas com cortes de 5 µm de espessura foram coradas com a coloração para imuno-histoquímica PCNA (ANEXO G) seguindo protocolo preconizado pelo laboratório da FOB-USP. Foi utilizado o anticorpo PCNA Antibody PC10: sc-56 (Santa Cruz Biotechnology) segundo as recomendações do fabricante.

As lâminas foram digitalizadas com *scanner* de alta resolução (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, EUA) e as imagens foram obtidas com o *software* ImageScope (Aperio Technologies Inc). Então, as análises quantitativas foram realizadas com a contagem de células marcadas e não marcadas na região entre os feixes vâsculo-nervosos dos cortes histológicos. A taxa de proliferação celular foi obtida pela relação entre o número de células positivas para a imuno-expressão do PCNA dividido pelo número total de células contadas, multiplicado por 100.⁴⁶

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises, constatou-se, inicialmente, a normalidade dos dados com o teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) com o teste de Levene (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA) ($\alpha=0,05$).

Para a análise do peso dos animais, recuperação fúngica de *C. albicans* e outras espécies de *Candida* spp. a partir do palato dos animais foi utilizado o teste ANOVA 2-fatores de medidas repetidas seguido pelo teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$) (IBM SPSS 19; SPSS Inc.). Para a recuperação fúngica de *C. albicans* e outras espécies de *Candida* spp. a partir dos dispositivos intra-orais, foi utilizado o teste ANOVA 1-fator ($\alpha=0,05$) (IBM SPSS 19; SPSS Inc.). Para as análises de dosagem de mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase nos palatos e línguas e para as análises

histométrica por planimetria digital e expressão de proliferação celular dos palatos, foi utilizado o teste t-Student ($\alpha=0,05$) (IBM SPSS 19; SPSS Inc.).

Para os escores de Edema e Eritema, foi utilizado o teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn para a avaliação em diferentes períodos para o mesmo grupo e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre grupos em um mesmo período ($\alpha=0,05$). Para a avaliação da associação entre a presença ou ausência de Erosão dentro de um mesmo grupo nos diferentes períodos e antibióticos, foi utilizado o teste Q-Cochran e para a associação entre a presença ou ausência de Erosão entre os diferentes grupos em um mesmo período, foi utilizado o teste de exato de Fisher ($\alpha=0,05$).

Para a avaliação dos escores de Despapilação da língua dos animais, foi utilizado o teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn para a avaliação em diferentes períodos para o mesmo grupo e o teste de Wilcoxon para comparação entre os diferentes antibióticos em cada período de avaliação ($\alpha=0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 TRIAGEM DOS ANIMAIS

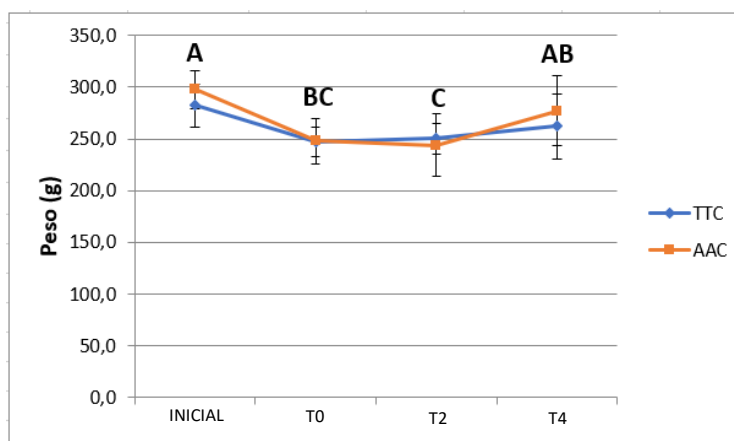
De 14 animais triados, nenhum apresentou colônias presuntivas de *C. albicans* em sua cavidade bucal e, portanto, não houve necessidade de substituição.

7.2 MONITORAMENTO DOS ANIMAIS

Dos 14 animais utilizados, apenas 2 foram perdidos durante o experimento em decorrência do procedimento anestésico; sendo um animal que recebeu AAC e outro que recebeu TTC. Nenhum dispositivo foi perdido durante os 4 dias em que deveriam permanecer na cavidade bucal dos animais. Pequena quantidade de detritos alimentares foi encontrada ao se remover os dispositivos.

Na avaliação dos pesos dos animais, os resultados da análise estatística mostraram distribuição homogênea dos dados no peso inicial para TTC ($p=0,275$) e AAC ($p=0,849$); em T0 para TTC ($p=0,513$) e AAC ($p=0,183$); em T2 para TTC ($p=0,122$) e AAC ($p=0,390$) e em T4 para TTC ($p=0,508$) e AAC ($p=0,808$). Houve homogeneidade das variâncias no peso inicial ($p=0,571$); em T2 ($p=0,060$) e em T4 ($p=0,706$). Os resultados da avaliação do acompanhamento dos pesos dos animais ao longo do período experimental podem ser observados na Figura 33.

FIGURA 33 – Resultados das pesagens (g) dos animais



Fonte: O autor

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$)

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

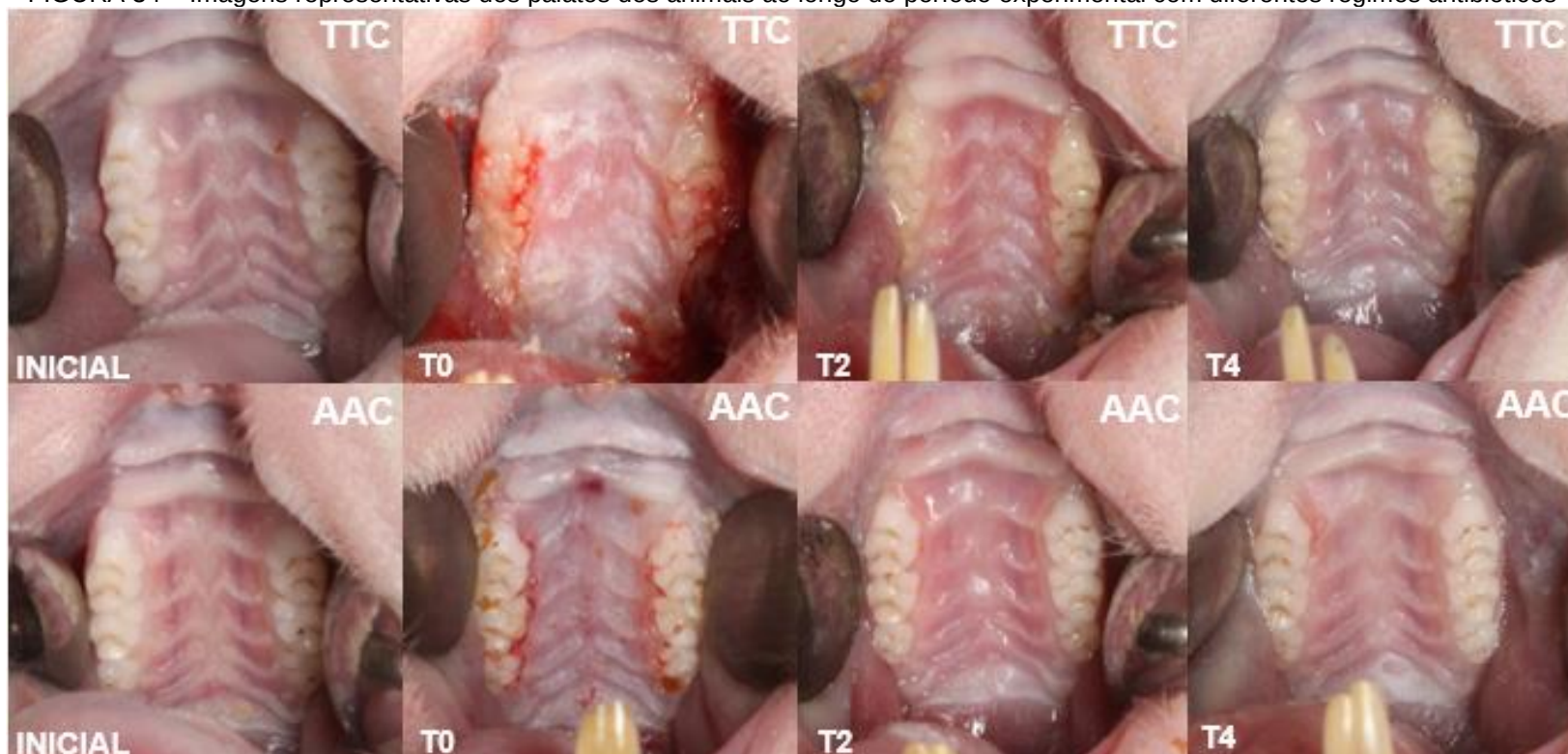
T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética; In+DC: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

Não houve diferença significativa ($p=0,145$) entre os pesos dos animais comparando os diferentes regimes antibióticos. Houve redução significativa do peso ($p=0,000$) para ambos os antibióticos após a indução da estomatite protética (T0); o peso dos animais manteve-se constante no período intermediário (T2; $p>0,05$) e aumentou em T4 ($p=0,037$), não havendo diferença do período inicial ($p=0,223$). Apesar dessas pequenas diferenças, nenhum animal mostrou-se debilitado no decorrer do experimento.

7.3 ANÁLISE VISUAL

Fotografias do palato representativas de cada grupo experimental podem ser visualizadas na Figura 34 (Inicial; T0; T2 e T4, respectivamente) e da língua podem ser visualizadas na Figura 35 (Inicial; T0; T2 e T4, respectivamente).

FIGURA 34 – Imagens representativas dos palatos dos animais ao longo do período experimental com diferentes regimes antibióticos



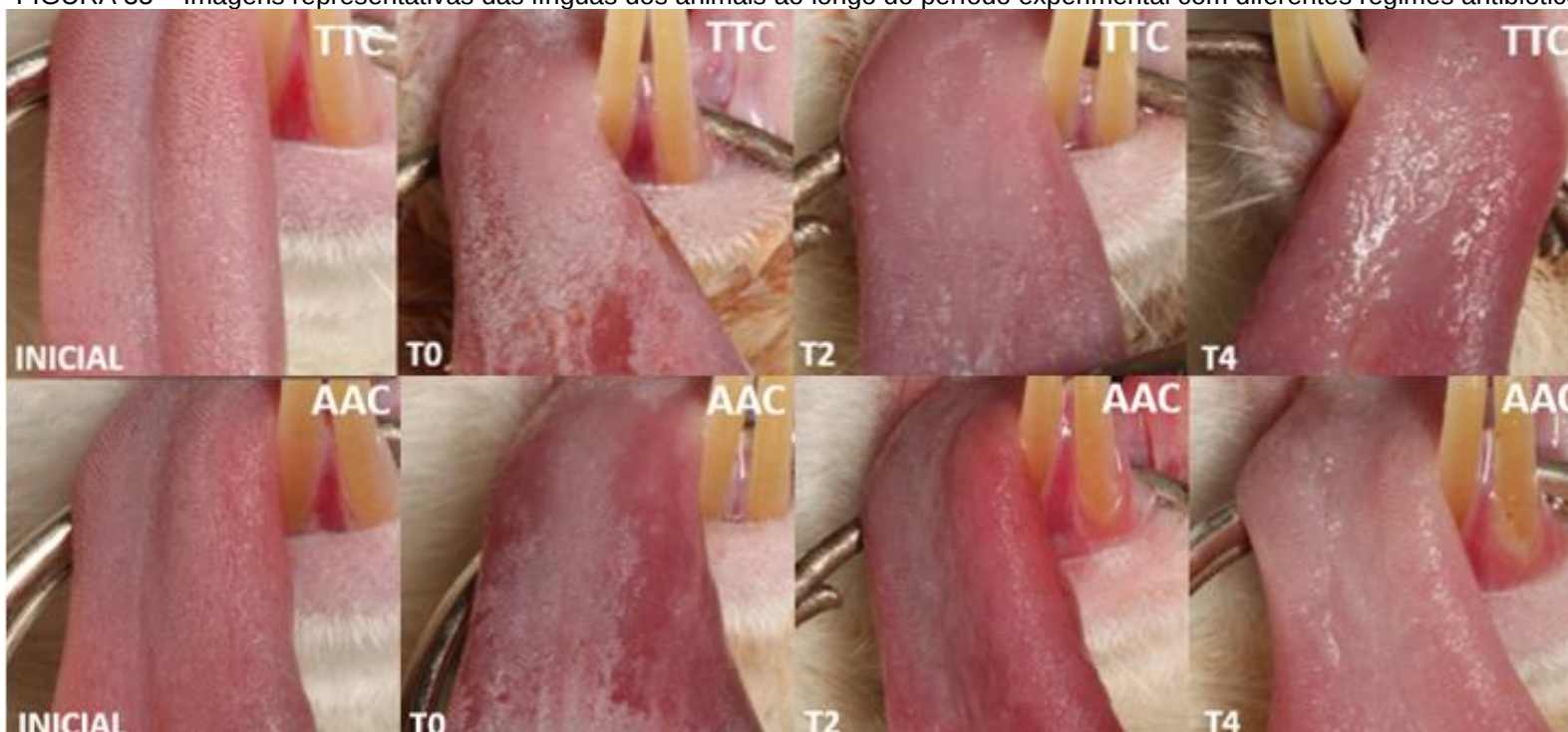
Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética; In+DC: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

FIGURA 35 – Imagens representativas das línguas dos animais ao longo do período experimental com diferentes regimes antibióticos



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

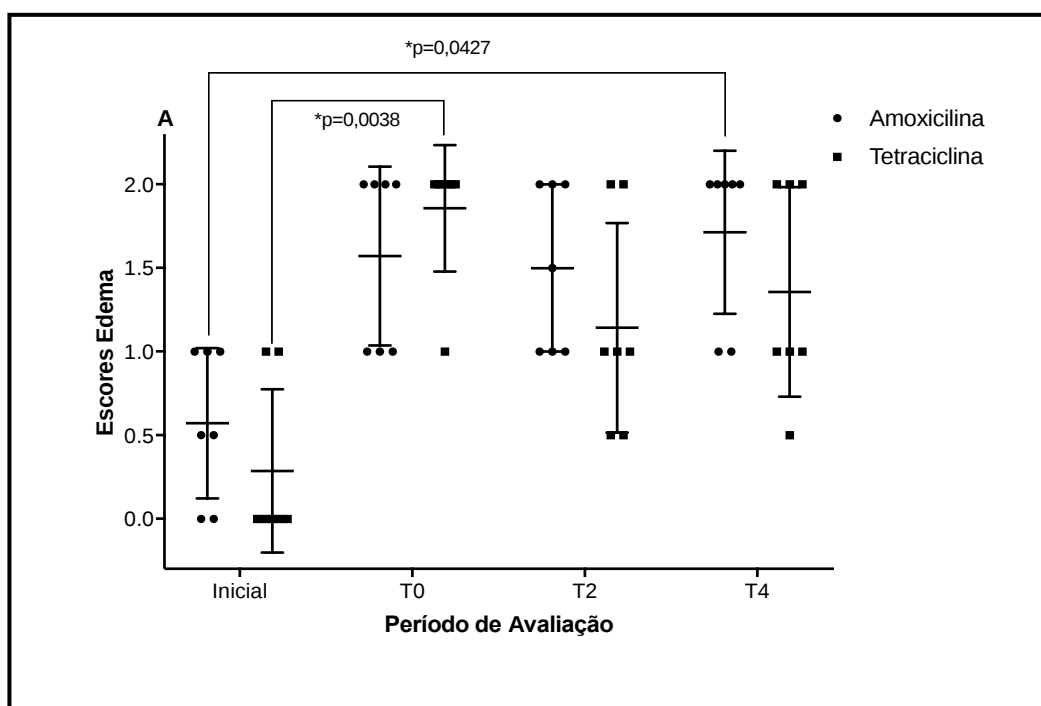
AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética; In+DC: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

A avaliação das fotografias dos palatos mostrou alto nível de concordância ($p < 0,0001$) entre os examinadores para os parâmetros Edema ($\kappa = 0,849$); Eritema ($\kappa = 0,723$) e Erosão ($\kappa = 0,762$).

A distribuição dos escores para Edema, Eritema e Erosão estão representadas nas Figuras 36 a 38, respectivamente.

FIGURA 36 – Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Edema



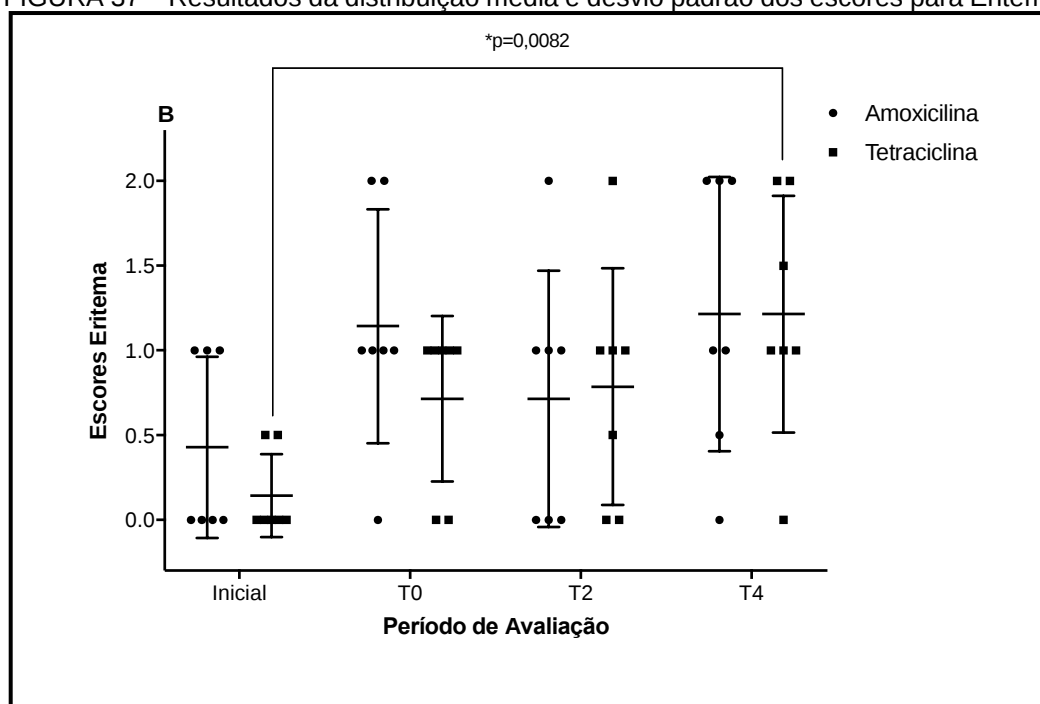
Fonte: O autor

Colchetes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dentro do grupo em diferentes períodos

T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética

De acordo com a Figura 36, houve diferença estatisticamente significativa para AAC entre os períodos inicial e T4 ($p = 0,0427$) e para TTC entre os períodos inicial e T0 ($p = 0,0038$). Ou seja, escores médios maiores foram observados 4 dias após a remoção dos dispositivos para AAC, enquanto, para TTC foram observados valores maiores logo após o período de indução de estomatite protética em relação ao período inicial.

FIGURA 37 – Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Eritema



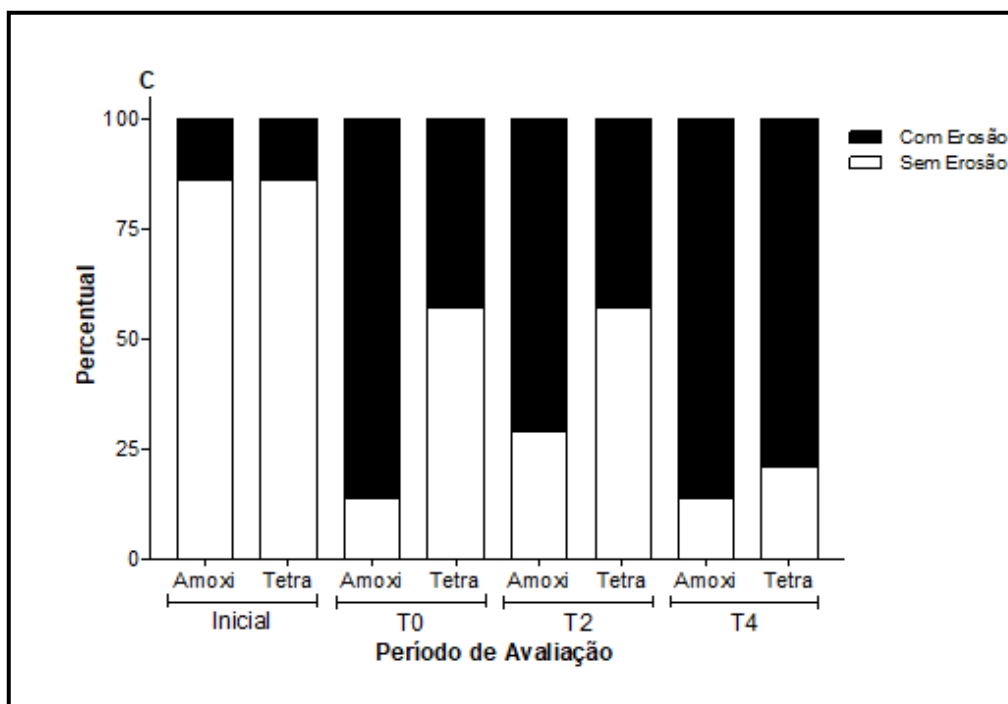
Fonte: O autor

Colchetes representam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) dentro do grupo em diferentes períodos

T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética

De acordo com a Figura 37, houve diferença estatisticamente significativa para TTC entre os períodos inicial e T4 ($p=0,0082$). Ou seja, escores médios maiores foram observados 4 dias após a remoção dos dispositivos em relação ao período inicial, para TTC.

FIGURA 38 – Distribuição percentual da presença e ausência da Erosão



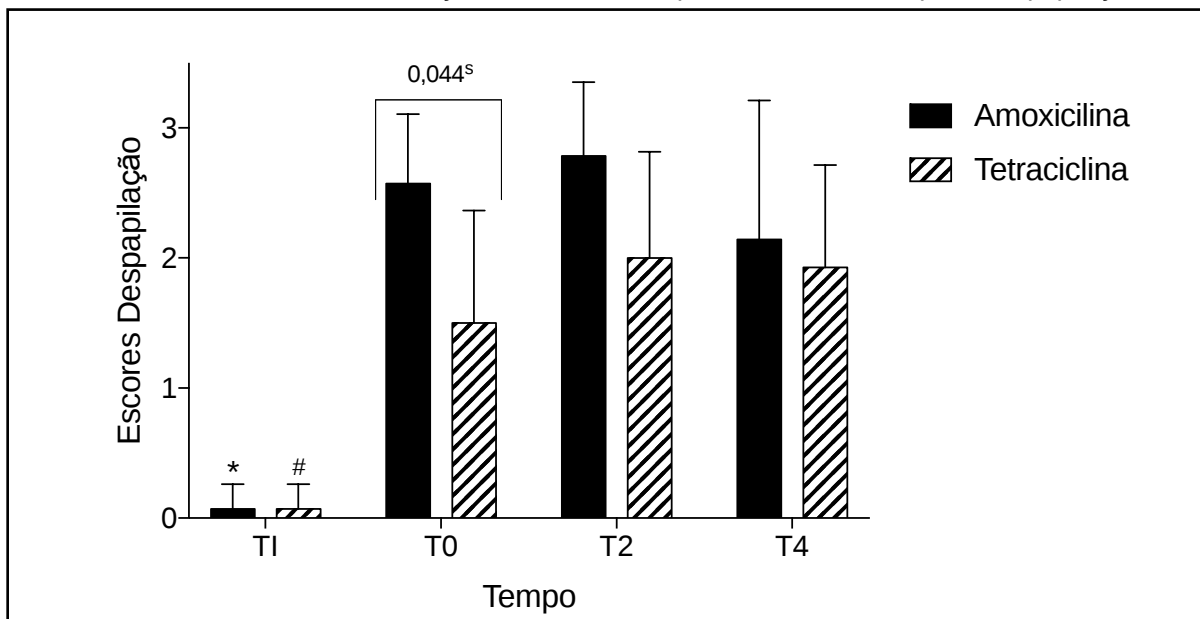
Fonte: O autor

T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética

Foi observada na Figura 38, associação não significativa entre a presença ou ausência da Erosão no palato dos animais tanto entre antibióticos quanto entre períodos de avaliação ($p > 0,05$).

A avaliação das fotografias das línguas mostrou alto nível de concordância ($p < 0,0001$) entre os examinadores para o parâmetro Despapilação ($\kappa = 0,853$). A distribuição dos escores para Despapilação está representada na Figura 39.

FIGURA 39 – Resultados da distribuição média e desvio padrão dos escores para Despapilação



Fonte: O autor

Colchetes superiores representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos em cada período de avaliação

Símbolos representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo grupo nos diferentes períodos de avaliação

TI: período inicial; T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética

De acordo com a Figura 39, maiores escores de despapilação foram observados em T0 (* $p=0,022$) e em T2 (* $p=0,006$) em relação ao período inicial para os ratos sob AAC. Para os ratos sob TTC, maiores escores de despapilação foram observados em T2 (# $p=0,006$) e em T4 (# $p=0,022$) em relação ao período inicial. Na comparação entre antibióticos, a AAC resultou em maior despapilação ($p=0,044^S$) logo após a indução da doença (em T0).

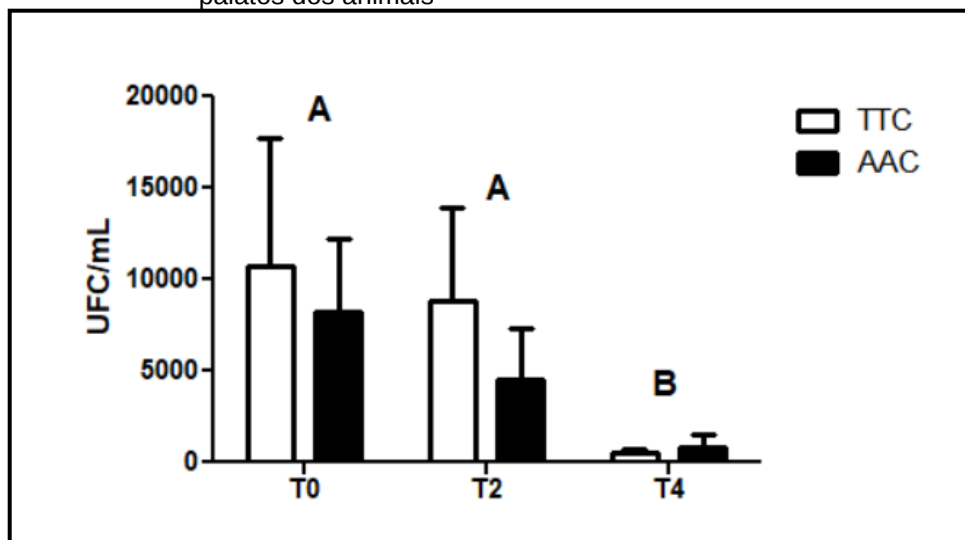
7.4 CONTAGEM DE UFC/mL

7.4.1 UFC/mL de *C. albicans* Nos Palatos

Na avaliação das unidades formadoras de colônias de *C. albicans* nos palatos dos animais, houve distribuição homogênea dos dados em T0 para TTC ($p=0,272$) e AAC ($p=0,694$); em T2 para TTC ($p=0,973$) e AAC ($p=0,630$) e em T4 para TTC ($p=0,972$) e AAC ($p=0,311$). Os resultados da homogeneidade das variâncias em cada tempo foram: T0 ($p=0,370$); em T2 ($p=0,453$) e em T4 ($p=0,002$).

Os resultados de contagem de UFC/mL das coletas nos palatos dos animais podem ser observados na Figura 40.

FIGURA 40 – Resultados da contagem de UFC/mL de *C. albicans* das coletas nos palatos dos animais



Fonte: O autor

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$)

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética

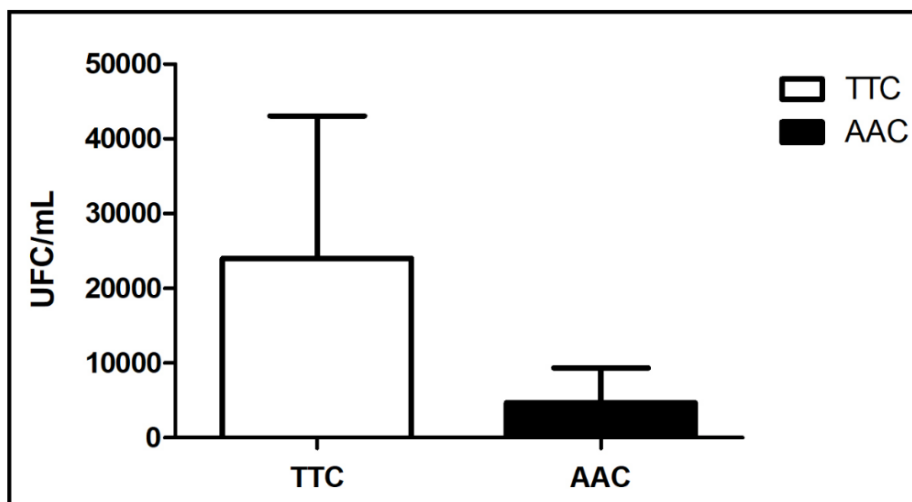
De acordo com a Figura 40, não houve diferença estatisticamente significativa entre os antibióticos para todos os tempos ($p=0,439$). Ao longo do período experimental, não houve diferença significativa entre a contagem de UFC/mL de *C. albicans* nos palatos dos animais para ambos os antibióticos entre o período inicial e T2 ($p=0,697$) e houve redução nos valores de UFC/mL tanto após 4 dias da indução da estomatite protética em relação ao período inicial ($p=0,022$) quanto em relação ao T2 ($p=0,018$).

7.4.2 UFC/mL de *C. albicans* Nos Dispositivos Intra-Orais

Na avaliação das unidades formadoras de colônia de *Candida albicans* nos dispositivos intra-oriais, houve distribuição homogênea dos dados para TTC ($p=0,972$) e AAC ($p=0,374$), como também foi observada homogeneidade das variâncias ($p=0,423$).

Os resultados da contagem de UFC/mL nos dispositivos intra-oriais podem ser observados na Figura 41.

FIGURA 41 – Resultados da contagem de UFC/mL de *C. albicans* das coletas nos dispositivos intra-oriais dos animais



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

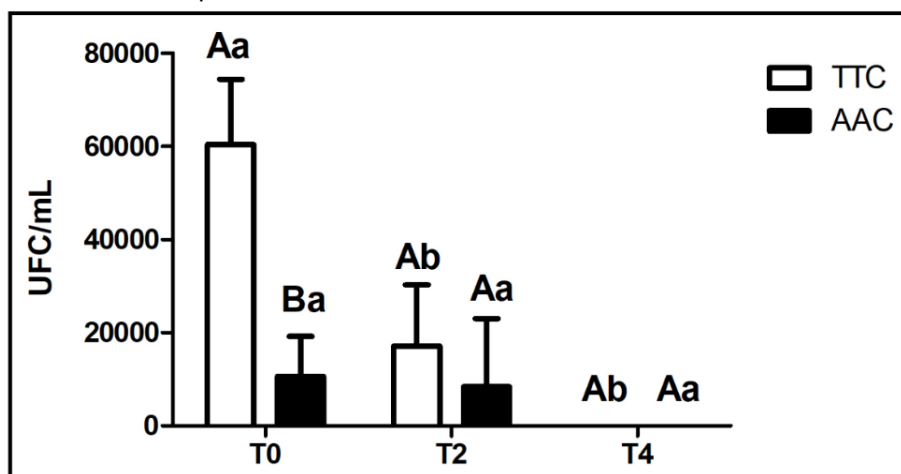
De acordo com a Figura 41, não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de UFC/mL de *C. albicans* dos dispositivos na comparação entre os antibióticos ($p=0,111$).

7.4.3 UFC/mL de *Candida* ssp. Nos Palatos

Na avaliação das unidades formadoras de colônias de outras espécies de *Candida* nos palatos dos animais, houve distribuição homogênea dos dados em T0 para TTC ($p=0,220$) e AAC ($p=0,835$) e em T2 para TTC ($p=0,681$) e AAC ($p=0,046$). Os resultados da homogeneidade das variâncias em cada tempo foram: T0 ($p=0,103$) e em T4 ($p=0,061$).

Os resultados de contagem de UFC/mL de *Candida* ssp. das coletas nos palatos dos animais podem ser observados na Figura 42.

FIGURA 42 – Resultados da contagem de UFC/mL de *Candida* spp. nos palatos dos animais



Fonte: O autor

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa no mesmo período para diferentes regimes antibióticos

Letras minúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa para o mesmo regime antibiótico ao longo do tempo

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

T0: após período de indução da estomatite protética; T2: após 2 dias e T4: após 4 dias da indução da estomatite protética

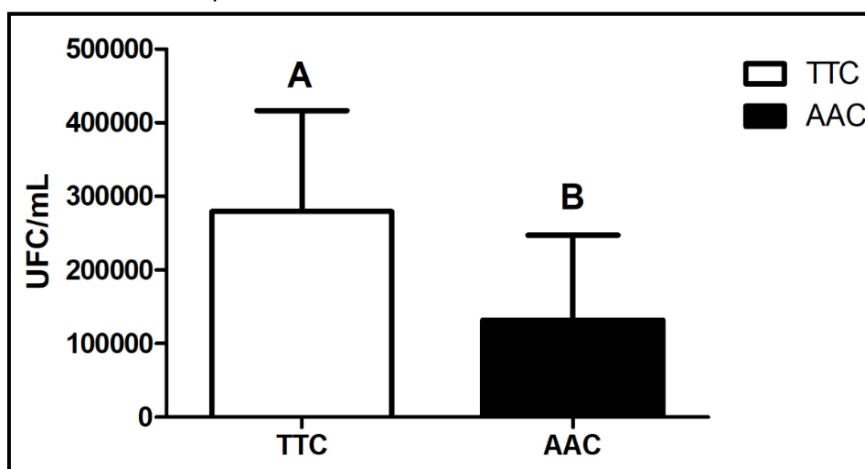
Como observado na Figura 42, maiores valores de contagem de UFC/mL de *Candida* spp. dos palatos dos animais foram obtidos no grupo TTC logo após a indução da estomatite protética em T0 ($p=0,003$). Para o antibiótico TTC, ao longo do período experimental, houve redução significativa na contagem de UFC/mL tanto entre o período inicial e T2 ($p=0,001$) quanto entre o período inicial e T4 ($p=0,000$). Entretanto, para o antibiótico AAC, não foi observada diferença significativa entre todos os períodos experimentais ($p > 0,05$).

7.4.4 UFC/mL de *Candida* spp. Nos Dispositivos Intra-Orais

Na avaliação das unidades formadoras de colônias de outras espécies de *Candida* nos dispositivos intra-oriais, houve distribuição homogênea dos dados para TTC ($p=0,894$) e AAC ($p=0,191$), como também foi observada homogeneidade das variâncias ($p=0,745$).

Os resultados de contagem de UFC/mL de *Candida* spp. das coletas nos dispositivos intra-oriais podem ser observados na Figura 43.

FIGURA 43 – Resultados da contagem de UFC/mL de *Candida* spp. nos dispositivos intra-orais



Fonte: O autor

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$)

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

De acordo com a Figura 43, maiores valores de contagem de UFC/mL de *Candida* spp. nos dispositivos intra-orais foram obtidos também para o grupo submetido à administração de TTC ($p=0,05$).

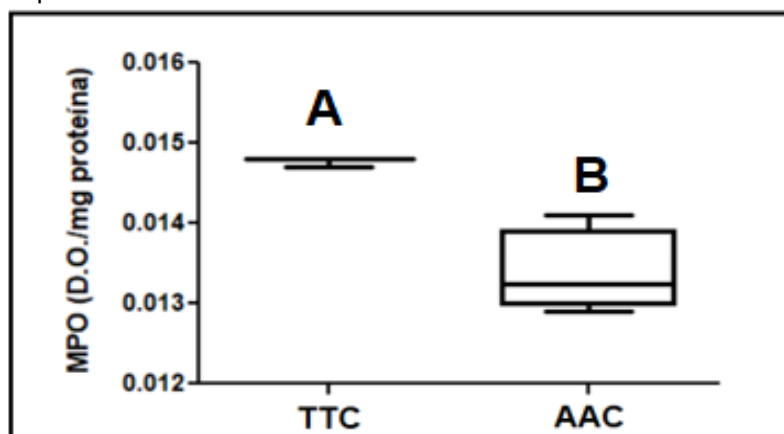
7.5 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

7.5.1 Dosagem De MPO

Na avaliação da dosagem de mieloperoxidase nos palatos dos animais, houve distribuição homogênea dos dados para TTC ($p=0,146$) e AAC ($p=0,056$). Também foi observada homogeneidade das variâncias ($p=0,383$). Na avaliação da dosagem de mieloperoxidase nas línguas dos animais, houve distribuição homogênea dos dados para TTC ($p=0,616$) e AAC ($p=0,469$) e homogeneidade das variâncias ($p=0,059$).

Os resultados das análises enzimáticas dos palatos e das línguas dos animais podem ser observados nas Figuras 44 e 45, respectivamente.

FIGURA 44 – Resultado da dosagem de mieloperoxidase nos palatos



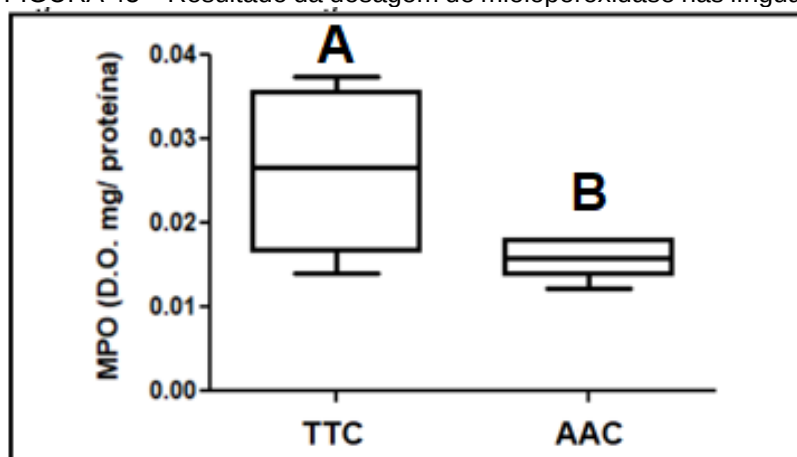
Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$)

FIGURA 45 – Resultado da dosagem de mieloperoxidase nas línguas



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$)

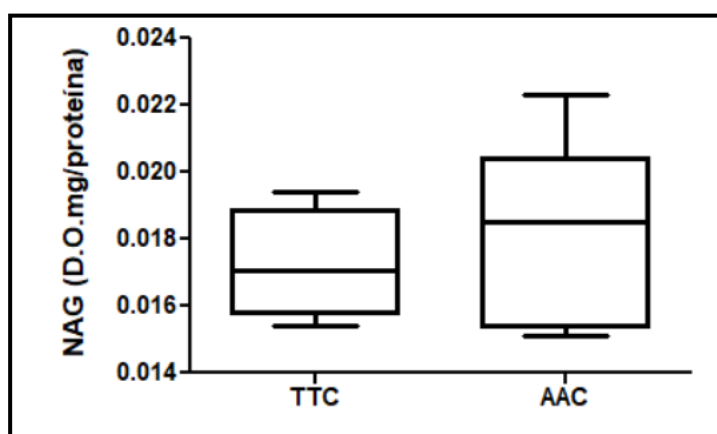
Como observado nas Figuras 44 e 45, maior dosagem de mieloperoxidase nos grânulos azurófilos dos neutrófilos de ambas as amostras avaliadas, palato e língua, foi obtida a partir dos animais submetidos à administração de TTC ($p=0,006$; $p=0,039$, respectivamente).

7.5.2 Dosagem De NAG

Na avaliação da dosagem de N-acetilglucosaminidase nos palatos dos animais, houve distribuição homogênea dos dados para TTC ($p=0,774$) e AAC ($p=0,452$). Foi observada também homogeneidade das variâncias ($p=0,314$). Na avaliação da dosagem de N-acetilglucosaminidase nas línguas dos animais, houve distribuição homogênea dos dados para TTC ($p=0,463$) e AAC ($p=0,780$).

Os resultados das análises enzimáticas dos palatos e das línguas dos animais podem ser observados nas Figuras 46 e 47, respectivamente.

FIGURA 46 – Resultado da dosagem de N-acetilglucosaminidase nos palatos

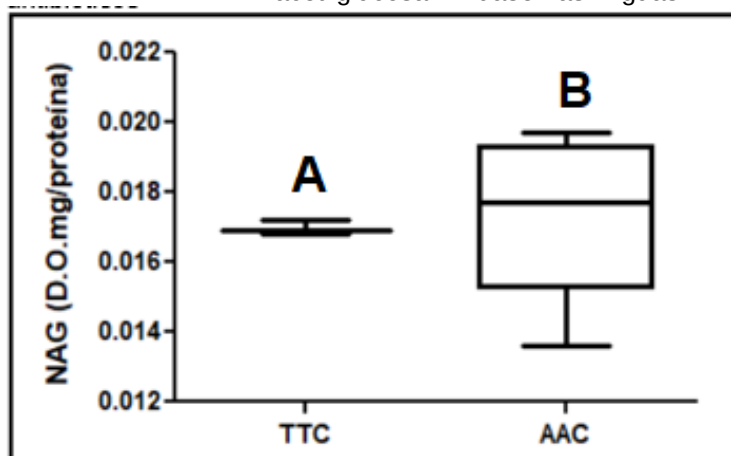


Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 47 – Resultado da dosagem de N-acetilglucosaminidase nas línguas



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$)

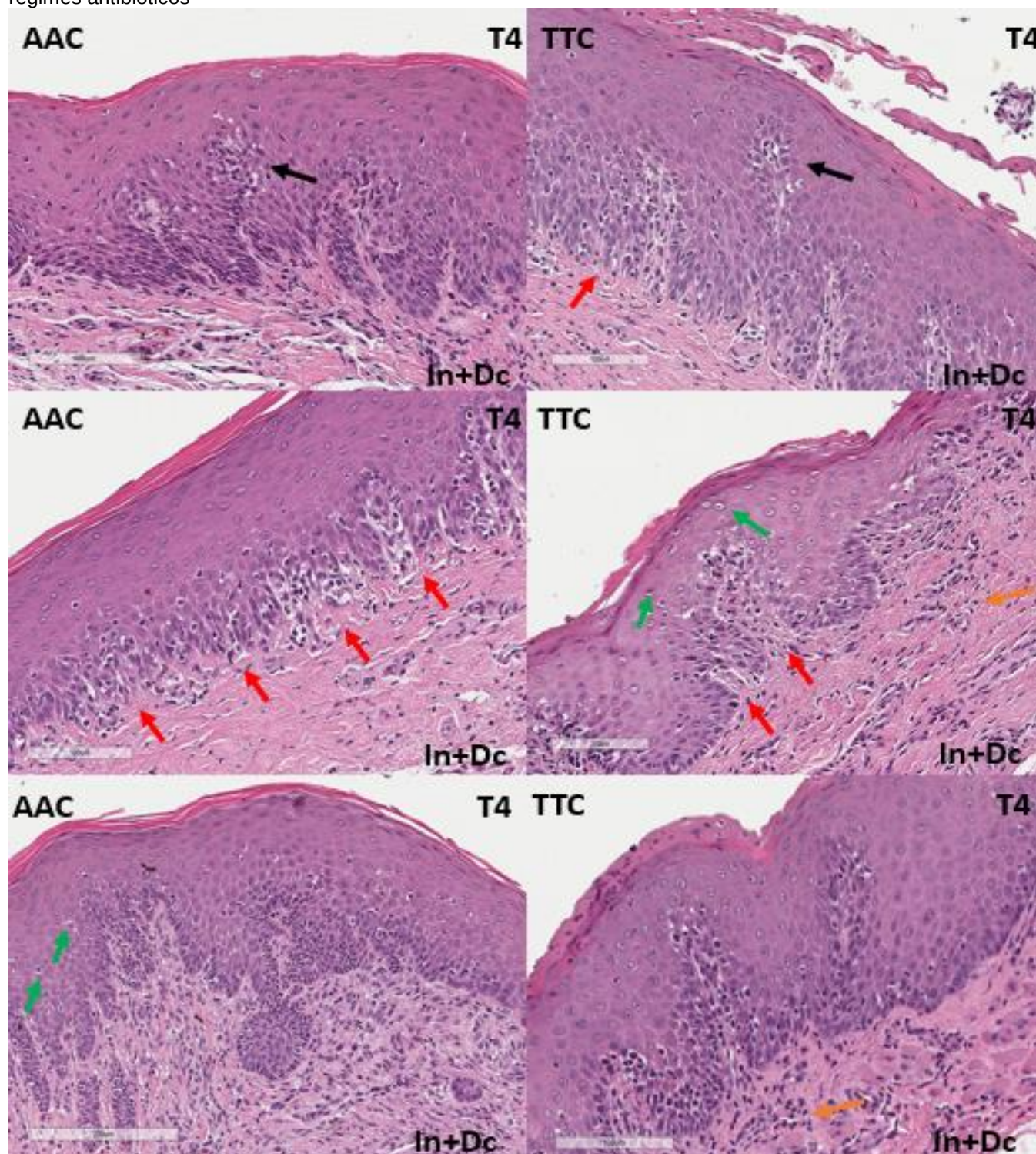
Como observado na Figura 46, não houve diferença significativa entre os antibióticos na dosagem de N-acetilglucosaminidase produzida por macrófagos nos palatos dos animais ($p=0,649$). Em contrapartida, a dosagem de N-acetilglucosaminidase nas línguas (Figura 47) foi superior para os animais que receberam AAC ($p=0,039$).

7.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

7.6.1 Análise Histopatológica Descritiva

Assim como na Etapa I deste estudo, foram observados achados histológicos como microabscessos, alterações na camada basal, edema intracelular e discreto infiltrado inflamatório no tecido palatal dos animais submetidos a ambos os regimes antibióticos, tetraciclina ou amoxiciclina associada a ácido clavulânico, quatro dias após a remoção do dispositivo intra-oral contaminado. Fotomicrografias representativas dos palatos desses animais podem ser observadas na Figura 48.

FIGURA 48 – Fotomicrografias representativas dos palatos dos animais em T4 com administração de diferentes regimes antibióticos



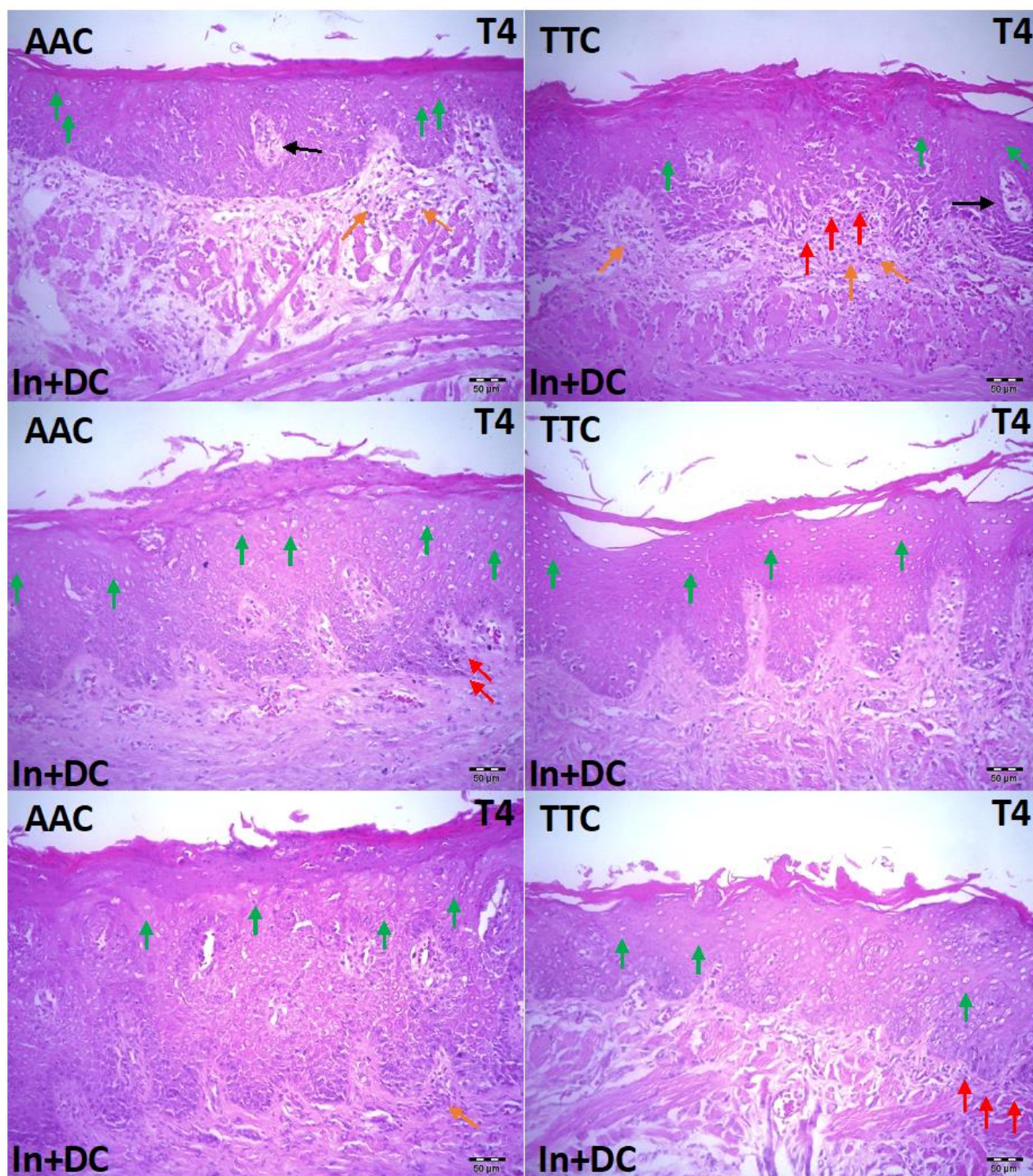
Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T4: quatro dias após período de indução da estomatite protética; In+DC: inoculação + dispositivo contaminado

Setas pretas indicam microabscessos no epitélio; Setas vermelhas indicam alteração da camada basal; Setas alaranjadas indicam infiltrado inflamatório; Setas verdes indicam edema intracelular

Em relação ao tecido lingual dos animais do grupo In+DC, foi possível a identificação de despilação, alterações na camada basal, edema intracelular e infiltrado inflamatório para ambos os antibióticos administrados. Microabscessos foram encontrados em apenas um animal do grupo TTC e em dois animais do grupo AAC (Figura 49).

FIGURA 49 – Fotomicrografias representativas das línguas dos animais em T4 com administração de diferentes regimes antibióticos



Fonte: O autor

TTC: tetraciclina, AAC: amoxicilina com ácido clavulânico; T4: quatro dias após período de indução da estomatite protética; In+DC: inoculação + dispositivo contaminado

Setas pretas indicam microabscessos no epitélio; Setas vermelhas indicam alteração da camada basal; Setas alaranjadas indicam infiltrado inflamatório; Setas verdes indicam edema intracelular

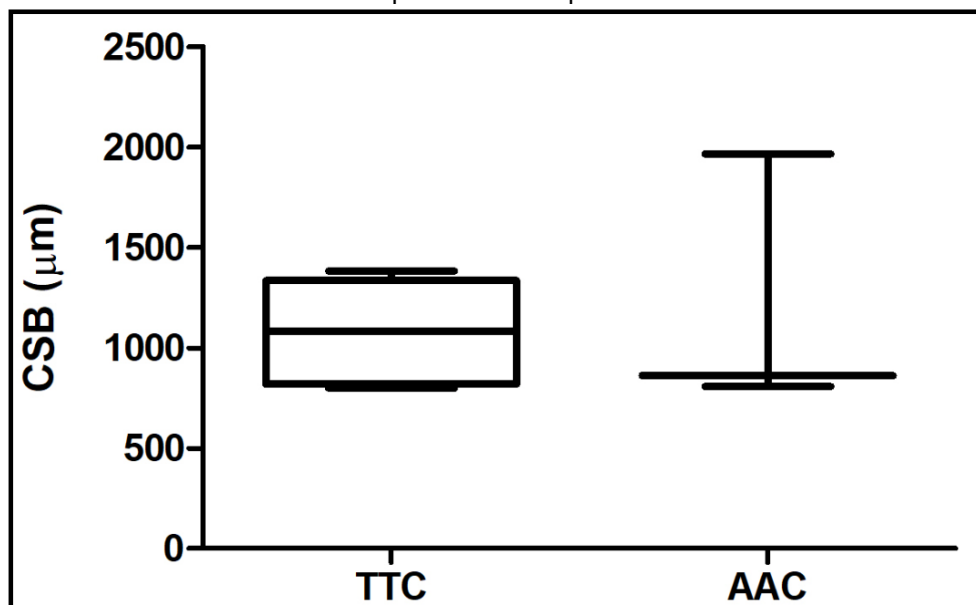
7.6.2 Análise Histométrica Dos Palatos Por Planimetria Digital

Para as análises histométricas dos palatos, foi observada distribuição homogênea dos dados na avaliação do comprimento da superfície basal para TTC ($p=0,452$) e AAC ($p=0,078$); da relação entre comprimento da superfície basal e comprimento da superfície córnea para TTC ($p=0,587$) e AAC ($p=0,101$); da área de compartimento celular para TTC ($p=0,779$) e AAC ($p=0,674$); da área de queratina para TTC ($p=0,758$) e AAC ($p=0,618$); da relação entre a área de compartimento celular e área de queratina para TTC ($p=0,966$) e AAC ($p=0,575$); da espessura de compartimento celular para TTC ($p=0,550$) e AAC ($p=0,778$); da espessura de queratina para TTC ($p=0,087$) e AAC ($p=0,206$) e da relação entre espessura de compartimento celular e espessura de queratina para TTC ($p=0,997$) e AAC ($p=0,067$).

Foi obtida homogeneidade das variâncias nas análises da relação entre comprimento da superfície basal e comprimento da superfície córnea ($p=0,097$); da área de compartimento celular ($p=0,180$); da relação entre área de compartimento celular e área de queratina ($p=0,331$); da espessura de compartimento celular ($p=0,285$) e da relação da espessura de compartimento celular e espessura de queratina ($p=0,430$).

Os resultados das análises das nove variáveis podem ser observados nas Figuras 50 a 58.

FIGURA 50 – Resultado do comprimento da superfície basal



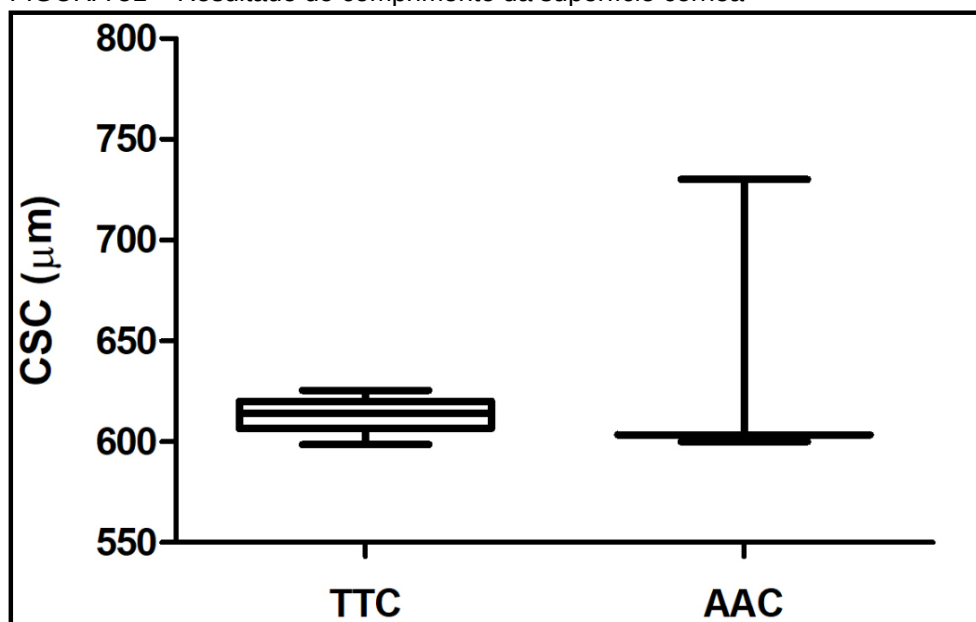
Fonte: O autor

CSB: comprimento da superfície basal

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 51 – Resultado do comprimento da superfície córnea



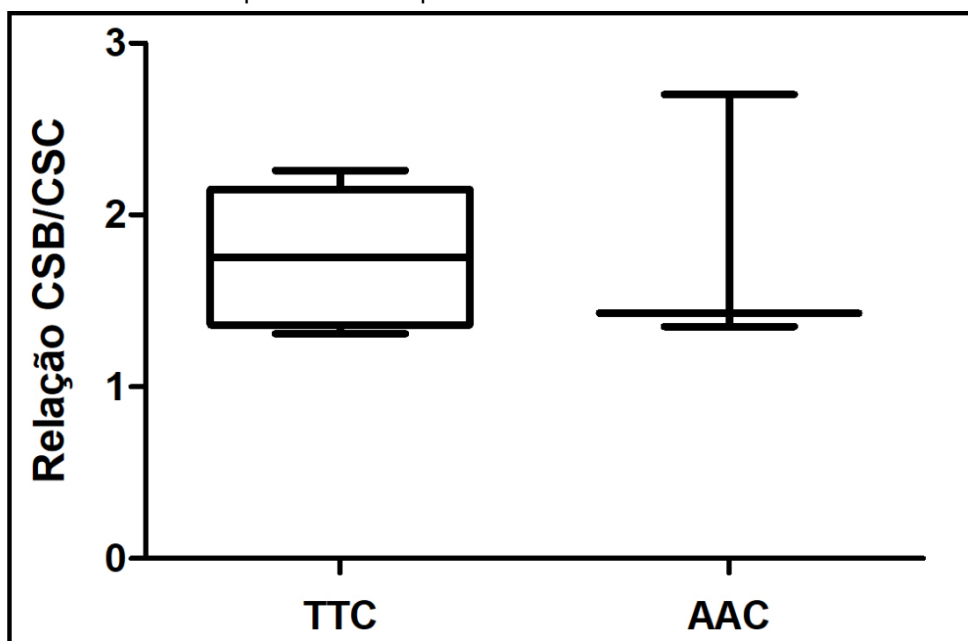
Fonte: O autor

CSC: comprimento da superfície córnea

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 52 – Resultado da relação do comprimento da superfície basal e comprimento da superfície córnea



Fonte: O autor

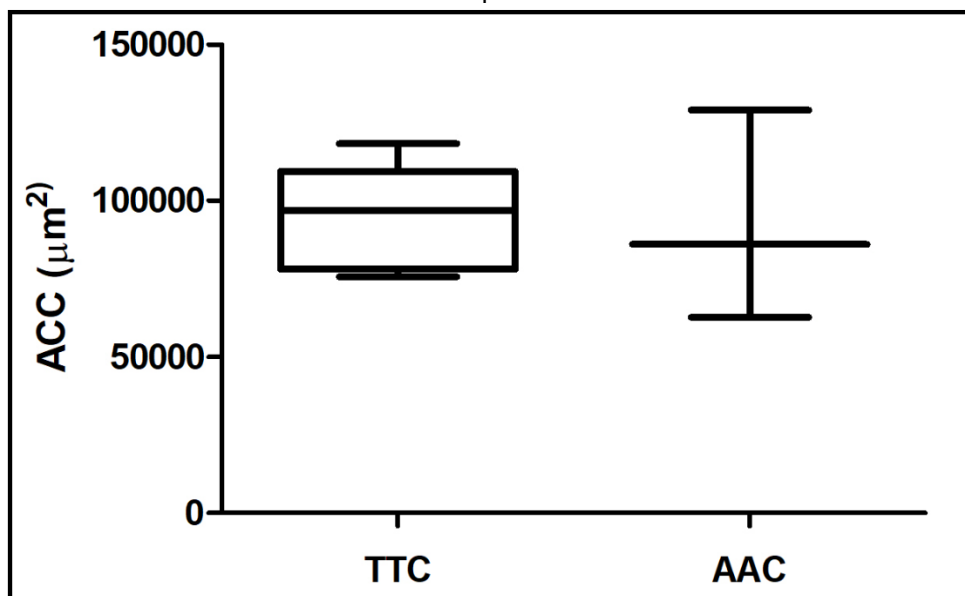
CSB: comprimento da superfície basal

CSC: comprimento da superfície córnea

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 53 – Resultado da área de compartimento celular



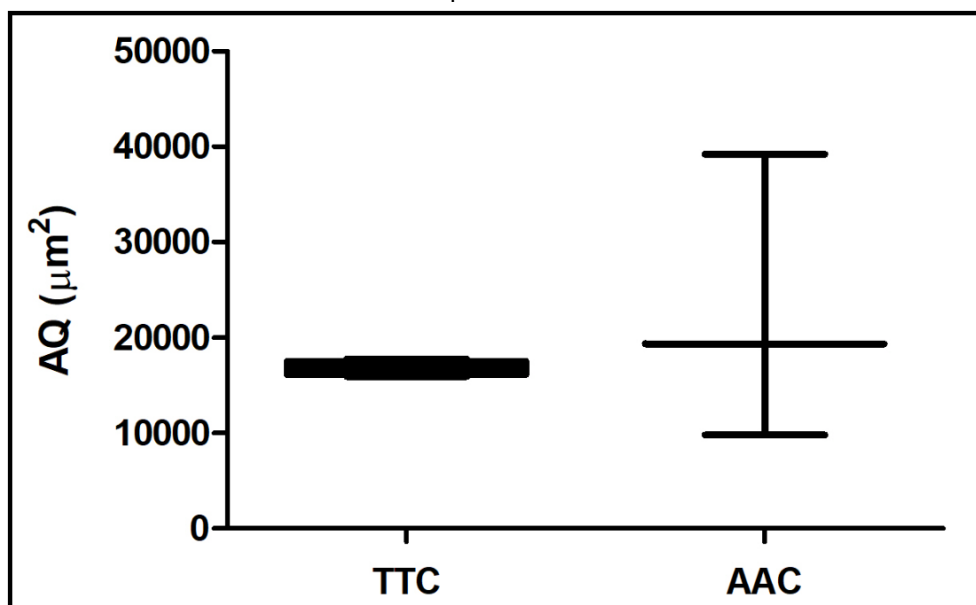
Fonte: O autor

CCA: área de compartimento celular

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 54 – Resultado da área de queratina



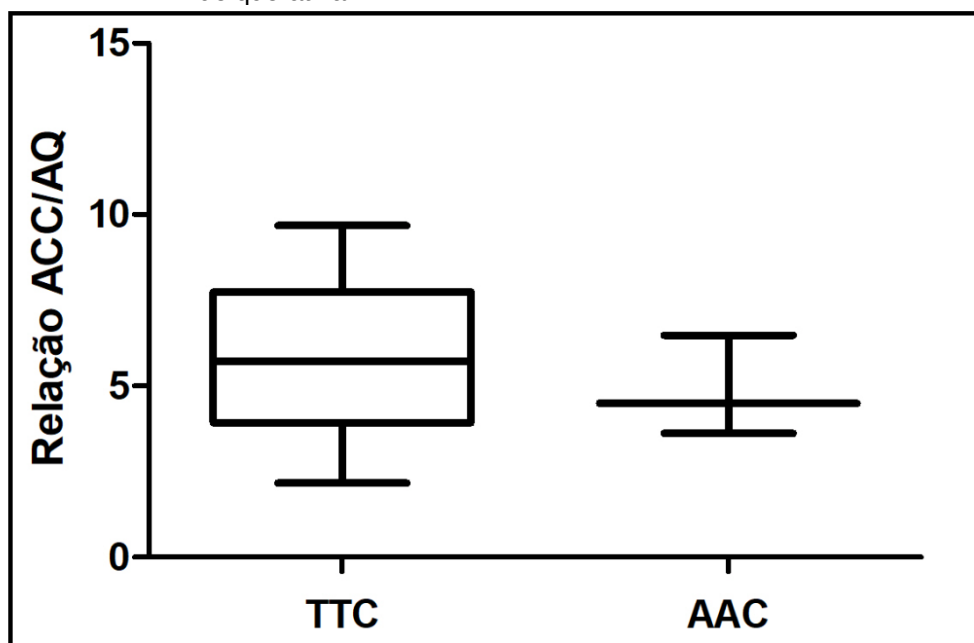
Fonte: O autor

AQ: área de queratina

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 55 – Resultado da relação da área de compartimento celular com a área de queratina



Fonte: O autor

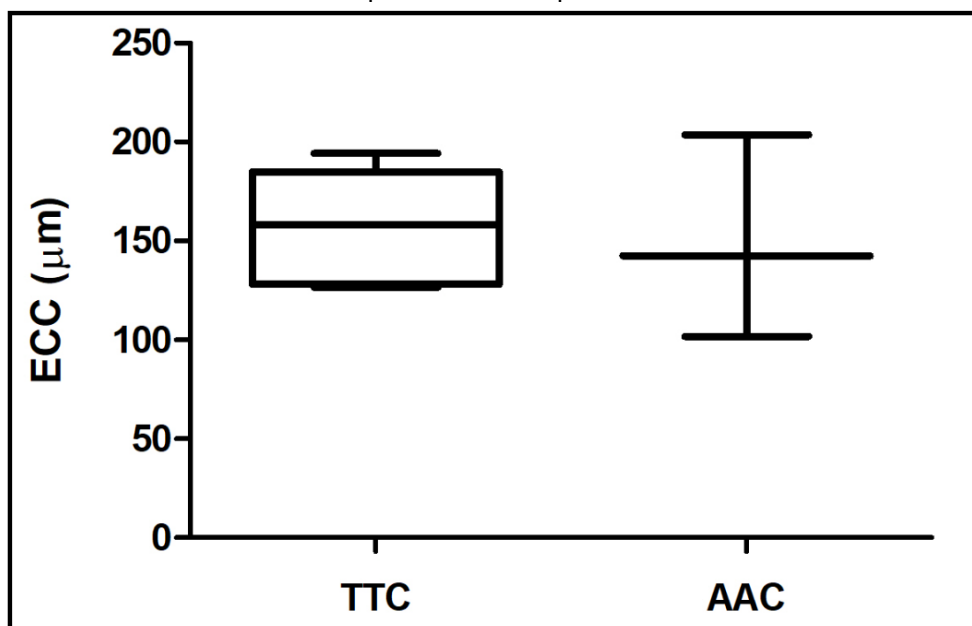
ACC: área de compartimento celular

AQ: área de queratina

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 56 – Resultado da espessura de compartimento celular



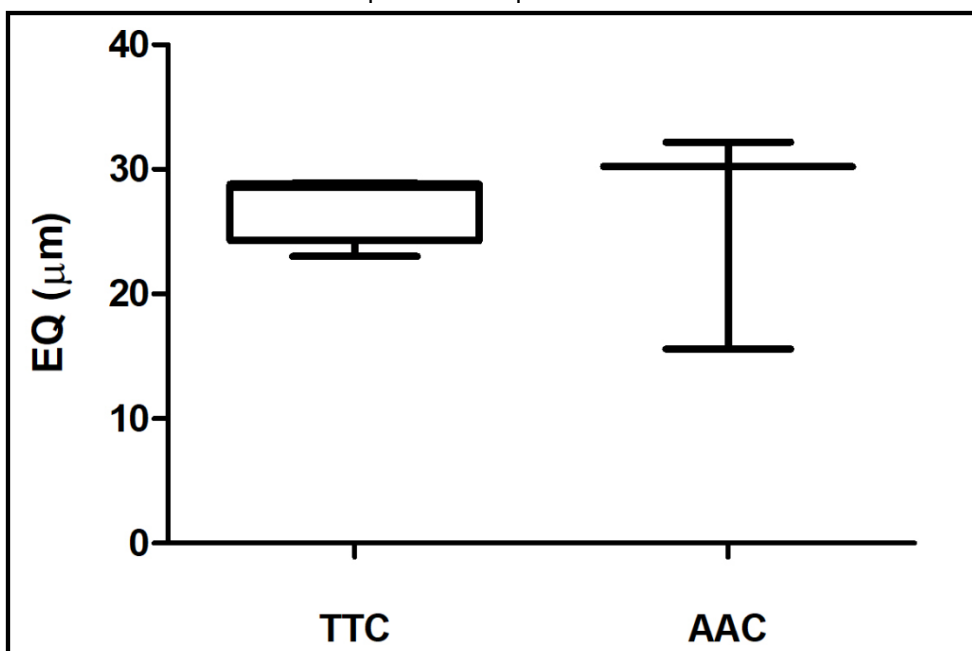
Fonte: O autor

ECC: espessura de compartimento celular

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 57 – Resultado da espessura de queratina



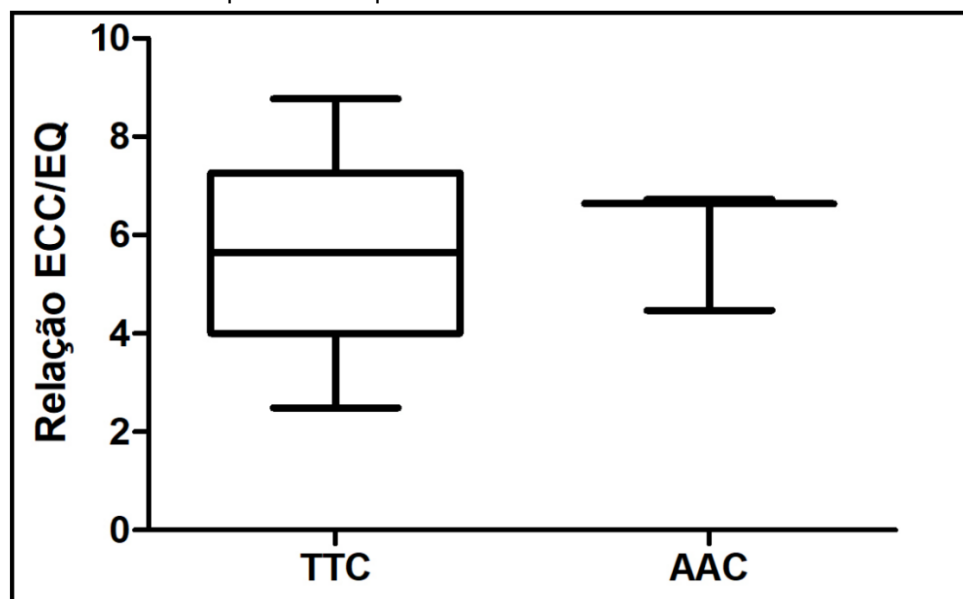
Fonte: O autor

EQ: espessura de queratina

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

FIGURA 58 – Resultado da relação da espessura de compartimento celular e espessura de queratina



Fonte: O autor

ECC: espessura de compartimento celular

EQ: espessura de queratina

TTC: tetraciclina

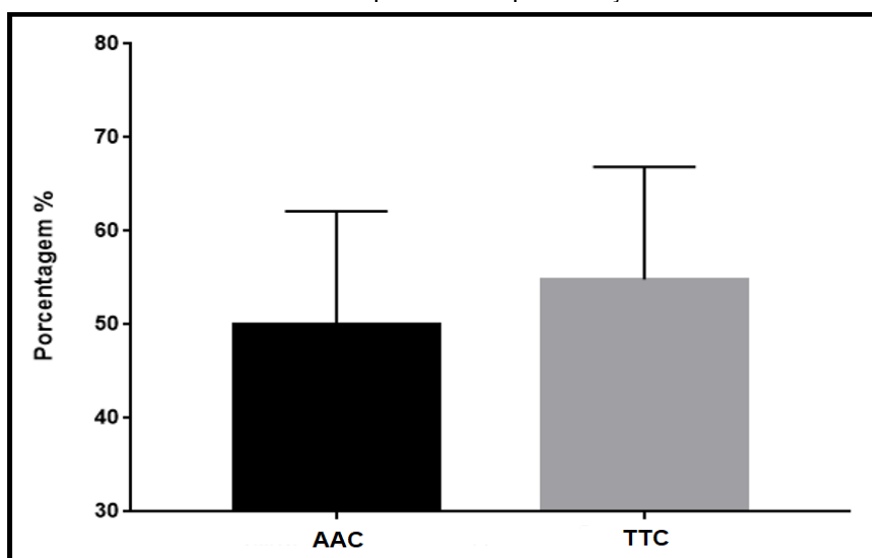
AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

Como observado nas Figuras 50 a 58, não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis analisadas na comparação entre os protocolos de administração dos antibióticos para facilitar a indução da estomatite protética: $p=0,665$ para CSB; $p=0,310$ para CSC; $p=0,867$ para CSB/CSC; $p=0,862$ para ACC; $p=0,447$ para AQ; $p=0,580$ para ACC/AQ; $p=0,740$ para ECC; $p=0,823$ para EQ e $p=0,827$ para ECC/EQ.

7.6.3 Expressão De Proliferação Celular (PCNA)

Para as análises de expressão de proliferação celular, foi observada distribuição homogênea das variâncias ($p=0,088$). Os resultados das análises de expressão de proliferação celular nos palatos dos animais podem ser observados na Figura 59.

FIGURA 59 – Resultado da expressão de proliferação celular



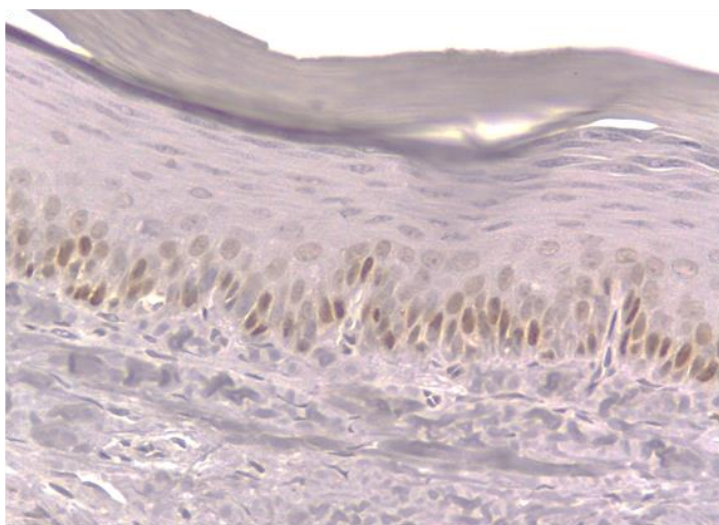
Fonte: O autor

TTC: tetraciclina

AAC: amoxiciclina com ácido clavulânico

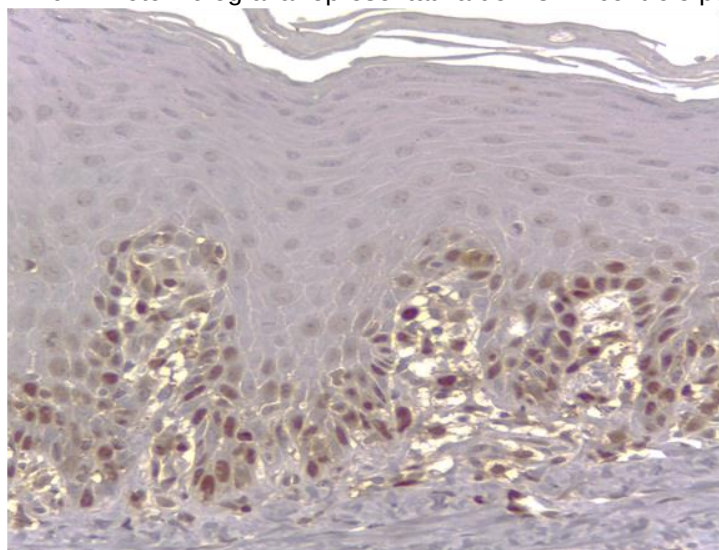
Como observado na Figura 59, também não houve diferença significativa na expressão de proliferação celular nos palatos ($p=0,774$) para a comparação entre os diferentes regimes antibióticos. Fotomicrografias representativas do controle negativo (controle negativo) e positivo (Estomatite Protética) podem ser observadas nas Figuras 60 e 61, respectivamente. Fotomicrografias do palato representativas para cada regime antibiótico podem ser visualizadas nas Figuras 62 e 63.

FIGURA 60 – Fotomicrografia representativa de PCNA controle negativo



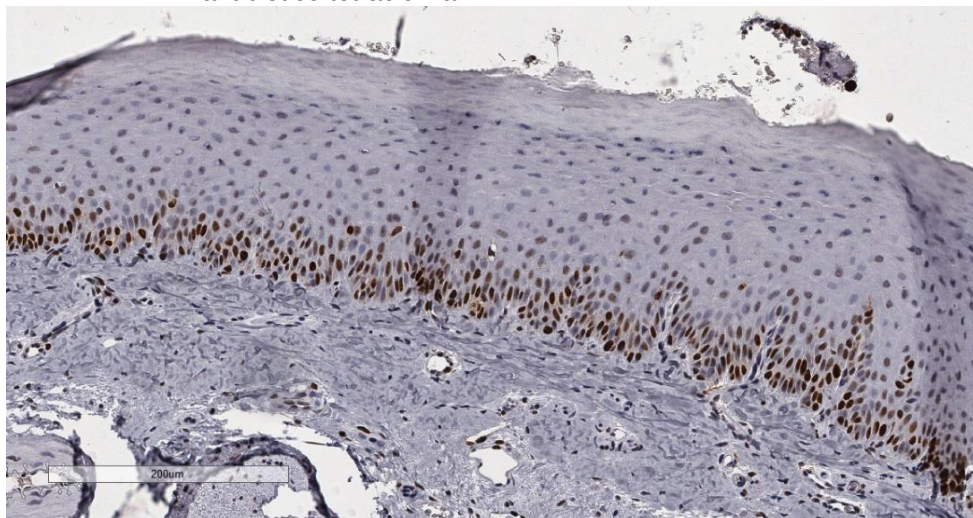
Fonte: O autor

FIGURA 61 – Fotomicrografia representativa de PCNA controle positivo



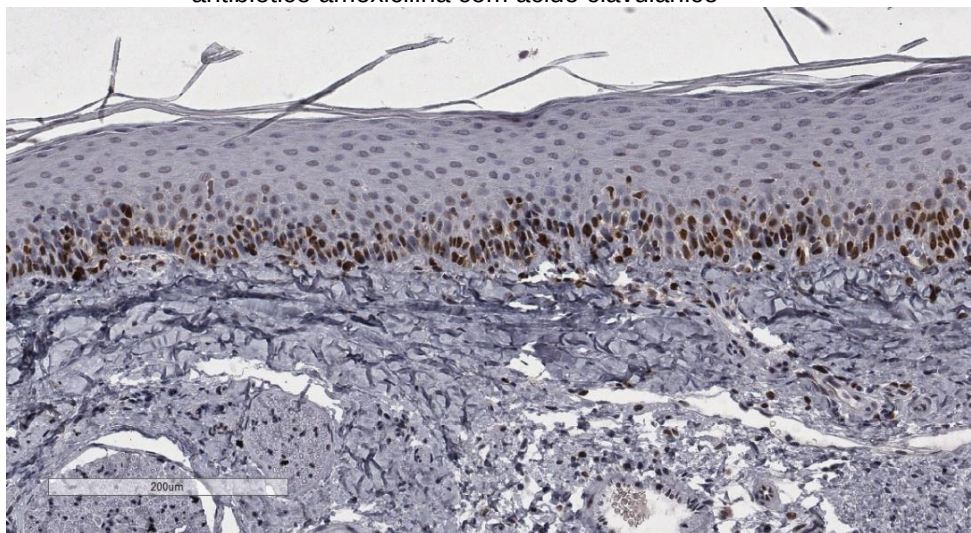
Fonte: O autor

FIGURA 62 – Fotomicrografia representativa de PCNA do palato com regime antibiótico tetraciclina



Fonte: O autor

FIGURA 63 – Fotomicrografia representativa de PCNA do palato com regime antibiótico amoxicilina com ácido clavulânico



Fonte: O autor

8. DISCUSSÃO

Ao menos em teoria, o desenvolvimento de um modelo animal ideal de candidose oral pode se tornar uma ferramenta padronizada, de forma controlada e manipulada, de modo a derivar dados universalmente comparáveis sobre etiopatogenia, diagnóstico e tratamento do processo infeccioso.⁷⁸ Estudos anteriores que induziram candidose em modelos animais ressaltaram semelhança entre lesões humanas e animais e, dessa forma, enfatizaram sua utilidade e importância.⁷⁸ Portanto, um modelo animal que se assemelha à candidose oral humana, além de possibilitar o estudo da patogênese da doença e da virulência do(s) micro-organismo(s) associado(s), também permite a avaliação de terapias alternativas ou novos antifúngicos que são introduzidos de tempos em tempos.⁷⁸

Especificamente para candidose bucal denominada estomatite protética, apesar da infecção por *Candida* ser o principal fator etiológico associado,^{65,79} sua etiologia é considerada multifatorial e relacionada à utilização de próteses removíveis, principalmente próteses totais.⁸⁰ Fatores considerados determinantes no desenvolvimento desta doença têm sido a presença de complexo biofilme em profundidade na resina acrílica^{81,82} associado ao uso contínuo dessas próteses⁸⁰ contaminadas, que traumatizam a mucosa de suporte,⁸³ tornando os tecidos subjacentes mais propensos a infecções por aumentar sua permeabilidade às toxinas microbianas.⁸⁴ Assim como em humanos, tem sido relatado não ser possível o desenvolvimento de alterações clínicas e histológicas no palato em modelos animais sem a utilização de um dispositivo acrílico.^{33,51}

Na literatura, a maioria dos modelos de estomatite protética induziu a doença por meio da utilização de dispositivos palatais que serviram apenas como um reservatório para suspensões ou pasta de *C. albicans*, que foram inoculadas diretamente no palato e/ou colocadas na superfície interna do dispositivo anteriormente à sua instalação.^{20,26,32,33,42} Apenas um estudo²¹ desenvolveu a doença com a utilização de um dispositivo palatal previamente contaminado, simulando mais adequadamente a condição clínica dos pacientes portadores dessa doença. Para tal, somente poderiam ser utilizados modelos de ratos Wistar ou Sprague-Dawley, devido ao tamanho apropriado de sua cavidade oral⁷⁸ que possibilita o uso de dispositivos palatais, além de permitir maior facilidade de inoculação e coleta de amostras.⁷⁸

Diferentemente do camundongo, ratos podem abrigar *C. albicans* na cavidade oral como micro-organismos de baixo nível comensal.⁷⁸ Esta condição poderia ser uma desvantagem para a compreensão da contribuição da resposta imune inata ao processo da doença,⁷⁸ ao passo que a prevalência de *Candida* aproxima mais este modelo da microbiota bucal dos pacientes. Apesar da recuperação fúngica inferior no animal, uma vez que 3 a 48% de humanos saudáveis⁸⁵ apresentam leveduras orais, é importante excluir a colonização oral natural por *Candida* antes da inoculação artificial para a utilização deste modelo.⁷⁸ Apenas um estudo anterior²¹ havia incluído ratos Wistar *C. albicans*-negativos por meio de triagem utilizando o meio cromogênico para identificação presuntiva de espécies de *Candida* (CHROMagar *Candida*). Além da triagem dos animais, os dispositivos acrílicos foram previamente esterilizados em micro-ondas conforme estudo prévio do nosso grupo de pesquisa.⁵¹ Também neste estudo prévio,⁵¹ de uma amostra de 32 animais, 18,75% haviam apresentado *C. albicans* na cavidade oral e foram substituídos. No presente estudo, nenhum animal possuía colonização oral natural por *Candida*.

Como relatado, para simular a condição clínica dos pacientes, os dispositivos foram previamente contaminados com um biofilme padronizado de *C. albicans* composto por pseudo-hifas e blastóporos viáveis.⁵¹ As características específicas do fungo que contribuem para o desenvolvimento da candidose oral incluem capacidade de aderir e colonizar a mucosa oral,⁸⁶ de formar tubos germinativos,⁸⁷ hidrofobicidade,⁸⁸ comutação genotípica,⁸⁹ secreção de proteinases⁹⁰ e produção de fosfolipase.⁹¹ Apesar da diversidade de *Candida* spp., espécies não-*albicans*⁹² são de baixa virulência e a manifestação da candidose é determinada principalmente pela saúde do hospedeiro.⁷⁸ Um modelo de estomatite protética em rato Wistar demonstrou a indução da doença utilizando *C. albicans*, tendo sido o sorotipo B mais virulento que o sorotipo A,³³ e outro estudo do mesmo grupo de pesquisa falhou em induzir alterações patológicas por meio da inoculação de uma cepa de *C. tropicalis* e uma de *C. glabrata*.³⁵ Desse modo, *C. albicans* é a espécie mais frequentemente associada a lesões orais,⁷⁸ infecções sistêmicas e a espécie mais estudada em modelos animais.⁹³ Dentre as cepas, *C. albicans* SC5314 é a mais comumente usada em estudos de patogênese e sua sequência de genoma encontra-se disponível.⁹³

O dispositivo palatal utilizado foi baseado nos resultados do estudo de Hotta et al.²⁹ que objetivou a padronização da dieta dos animais, da técnica de moldagem dos palatos e da fixação dos dispositivos. Estes pesquisadores observaram que a

melhor dieta a ser utilizada seria a pastosa pela menor retenção de debrís alimentares nos dispositivos, além do que menor número de animais apresentou perda de peso, escurecimento dos pêlos, prostração e morte. Em relação à técnica de moldagem do palato e tipo de retenção do dispositivo, melhores resultados foram obtidos com a moldagem utilizando moldeira individual e poliéter e com o dispositivo apresentando extensão posterior, apenas na região dos molares, sem a utilização de fios ortodônticos, devido ao menor número de dispositivos perdidos.

Ainda, o dispositivo apresentou as modificações sugeridas por Moraes,⁵¹ sendo a confecção em resina acrílica termopolimerizável transparente, que facilita a verificação da adaptação interna na mucosa subjacente e fixação nos molares por meio da utilização de cimento resinoso autoadesivo, que dispensa a necessidade de alívio interno, proporciona retenção micromecânica ao esmalte devido ao condicionamento ácido prévio e união química por quelação ao cálcio da hidroxiapatita,⁹⁴ além da retenção macromecânica devido à fidelidade de cópia de moldagem utilizando elastômero. A cimentação resinosa autoadesiva, além de propiciar uma fixação estável, proporciona uma fácil remoção do dispositivo e limpeza interna pelo operador, tornando mais fáceis procedimentos como avaliações, coletas e reinoculações, se necessárias, durante sua utilização. No presente estudo, os animais apresentaram-se saudáveis, apesar de terem sido observadas alterações no seu peso no decorrer do experimento. Em contrapartida, foi observada a decimentação de 35% dos dispositivos utilizados num total de 70 confeccionados e os animais foram, então, repostos. Mesmo sendo tomadas precauções como o corte das unhas dos animais para reduzir a possibilidade de remoção ou de ferimento durante a tentativa de retirada, além da administração da dieta pastosa, evitando a necessidade de roer o alimento convencional na forma de *pellet*.

De todos os animais utilizados, apenas 4 foram perdidos durante o procedimento anestésico. Segundo Costa e colaboradores,⁷² realizar a inoculação de *C. albicans* na cavidade oral dos animais sem o procedimento anestésico anterior, prejudica a colonização por *Candida* e posterior desenvolvimento da doença. Assim, essa etapa torna-se fundamental para que a infecção se instale e ocorra a invasão tecidual por *C. albicans* na cavidade oral, evitando que os animais deglutam o fungo, ocorrendo a colonização no esôfago e estômago.^{70,71} Neste sentido, foi importante a promoção do efeito anestésico prolongado pela injeção intraperitoneal de maleato de acepromazina 1%.

Moraes⁵¹ havia tentado induzir a estomatite protética em ratos Wistar imunocompetentes assim como o grupo In+DC do presente estudo, entretanto sem a administração de antibiótico como a maioria dos estudos relatados na literatura. Não foram observadas alterações clínicas nos palatos dos animais e foram observadas regiões despapiladas nas línguas em até quatro dias após a indução da doença. A recuperação fúngica foi considerada baixa e não foram encontradas alterações histológicas. Moraes⁵¹ ainda induziu a doença em animais imunocompetentes sob antibioticoterapia com tetraciclina da forma como empregada no presente estudo. Nessa sequência do estudo, os resultados foram mais promissores, uma vez que foi observado eritema puntiforme e edema tecidual no palato e despapilação na língua. A recuperação fúngica foi 10x superior à indução sem antibioticoterapia e histologicamente foram observados microabscessos e infiltrado inflamatório no palato, além de invasão fúngica no epitélio das línguas.

Apesar da administração de antibiótico na água potável diminuir o apetite do animal devido a um efeito tóxico inespecífico e justificar as alterações de peso observadas neste estudo,⁹⁵ torna-se um fator importante na transição do comensalismo para parasitismo,⁹⁶ o que facilitaria a infecção por *C. albicans*. A interação entre espécies de *Candida* e a microbiota microbiana comensal é um mecanismo modulador crítico da colonização fúngica.⁷⁸ A microbiota microbiana comensal regula o número de leveduras às superfícies orais por competição por sítios de adesão bem como por nutrientes disponíveis.⁷⁸ É provável que em animais inoculados sob antibioticoterapia, o grau e a gravidade da infecção estejam relacionados ao efeito sinérgico do antibiótico com a virulência da cepa de *C. albicans* infectante.⁹⁷

Até o estudo de Moraes,⁵¹ nenhum estudo anterior havia induzido candidose palatal por meio de dispositivo acrílico previamente contaminado associado à antibioticoterapia, que no caso foi feita com a administração de tetraciclina como a maioria dos estudos de candidose oral em modelo animal que utiliza antibioticoterapia. Diferentemente de Moraes,⁵¹ o presente estudo objetivou além de induzir a estomatite protética, também acompanhar a duração da infecção e comparar a efetividade de dois regimes antibióticos administrados na água de beber: cloridrato de tetraciclina na concentração de 0,83 mg/mL sete dias antes^{43,52,53} ou amoxicilina associada ao ácido clavulânico na concentração de 0,156 mg/mL quatro dias antes da contaminação fúngica.²⁶

A comparação entre regimes antibióticos com a finalidade de facilitar a infecção fúngica também não foi investigada previamente. Apesar da tetraciclina ser amplamente utilizada para tal finalidade, tetraciclinas semi-sintéticas de segunda geração, como a minociclina, apresentam efeito anti-inflamatório quando administradas em doses sub-terapêuticas. Com o intuito de esclarecer o efeito anti-inflamatório em acidentes vasculares cerebrais em ratos Sprague-Dawley, a minociclina foi administrada 12 horas antes e 4 horas após o início da isquemia cerebral e, como resultado, houve a inibição da produção de prostaglandinas e da expressão de ciclo-oxigenase-2.⁹⁸ Outro estudo administrou minociclina como tratamento em modelos animais de colite e foi observado efeito anti-inflamatório intestinal, que foi atribuído à associação das propriedades antibacterianas e imunomoduladoras do fármaco.⁹⁹

Foi comprovada a indução da estomatite protética (em T0) no modelo de rato Wistar testado sob a administração de ambos os regimes antibióticos. A indução foi verificada por meio de metodologias comumente utilizadas na literatura, análise visual, contagem de colônias viáveis e análise histopatológica. A partir da avaliação conjunta dos resultados, foi verificado que 100% dos palatos e das línguas dos animais do grupo In+DC foram acometidos pela infecção. Ao passo que os grupos CN e Di não desenvolveram a doença. Fisker et al.,³⁹ seguindo uma inoculação oral a curto prazo de *C. albicans* em ratos Wistar em dieta com tetraciclina sem a utilização de dispositivos, evidenciaram quatro áreas principais de colonização da mucosa pelo fungo. 98,8% dos focos infecciosos evidenciados pela penetração de pseudo-hifas no epitélio foram encontrados na mucosa bucal, sulcos bucais e linguais, crista da gengiva dos molares e áreas interpapilares do dorso da língua. Os demais focos (1,2%) estavam na mucosa do palato duro e das gengivas próximas. Apesar de não ter sido o objetivo principal deste estudo, a língua dos animais não recebeu inoculação direta do fungo, mas foi facilmente acometida pela infecção. Isto devido ao tipo de epitélio, visto que o epitélio da língua não é tão denso e ortoqueratinizado como o do palato duro.¹⁰⁰ Além disso, foi especulado anteriormente que a topografia da região cônica das papilas linguais pode favorecer a retenção de leveduras nas fendas interpapilares, permitindo maior oportunidade de invasão do epitélio.⁹⁷ Apesar de trabalhos reportarem que as lesões por *Candida* estão concentradas na região da linha média posterior do dorso da língua, o presente estudo observou acometimento de toda a extensão de seu dorso.

Deve-se ressaltar o curto período de indução da estomatite protética neste modelo animal. A doença apresentou sinais clínicos pronunciados em toda a extensão do palato em comparação com outro estudo²¹ que também induziu a doença no mesmo período em ratos imunocompetentes sem administração de antibióticos. No estudo de Tobouti et al.,²¹ as lesões clínicas foram classificadas como tipo I de Newton e não foi observada infecção da língua pelos autores. Shakir et al.³³ observaram que as alterações epiteliais foram intensificando com a duração do experimento e que, após 6 semanas, áreas focais da mucosa palatina foram atróficas e marcadamente hiperplásicas condizentes com o tipo III de Newton. No presente estudo, não foi utilizada a classificação de Newton, visto que, quando os palatos foram acometidos pela infecção, esta ocorreu em toda sua extensão. Este estudo propôs, então, outros escores para a classificação dos palatos e escores de despapilação. Inicialmente, pensou-se que isolando os sinais clínicos observados para as alterações facilitaria a categorização dos palatos. Entretanto, foi mencionada dificuldade na avaliação do critério Eritema pelos examinadores, que resultou em algumas categorizações diferentes do esperado. Neste sentido, propõe-se uma nova classificação levando-se em consideração apenas a associação Edema+Eritema em grau e extensão, uma vez que Erosão não foi um aspecto relevante e frequente nas avaliações.

Com relação ao acompanhamento da doença, foram observadas alterações clínicas e histológicas importantes nos palatos dos animais sob ambos os regimes antibióticos no grupo In+DC em até seis dias de avaliação (T6). Histologicamente, foram observados microabscessos, edema intracelular, infiltrado inflamatório e alterações na camada basal nos palatos. Para a contagem de colônias viáveis, foi possível recuperar *C. albicans* na grandeza de 10^3 UFC/mL após 2 dias de avaliação e, apesar de ainda ser possível a recuperação fúngica, houve redução significativa após 4 dias da remoção do dispositivo contaminado. Ratos adultos são resistentes à colonização fúngica e entre três a quatro dias após sua inoculação oral não é mais possível a recuperação fúngica.²⁵ De acordo com Junqueira et al.,²³ as lesões desaparecem e as hifas de *Candida* são eliminadas do organismo pelo sistema imune do hospedeiro nesse mesmo período. Vários mecanismos de defesa protetora do hospedeiro explicam modelos com ratos, que incluem imunidade humoral protetora via vários isótipos de anticorpos,¹⁰¹ resposta protetora das células T CD4⁺,¹⁰² papel das células dendríticas¹⁰³ e proteção através de vacina antigênica Sap2 administrada por virossomas.¹⁰⁴ Tobouti et al.²¹ observaram maiores expressões relativas de

aspartil proteinases (Sap) 2, 5 e 9, aumento da porcentagem de neutrófilos e diminuição na porcentagem de linfócitos no quarto dia após a remoção do dispositivo contaminado. Os autores sugeriram que a concordância dos achados moleculares com os aspectos clínicos, microscópicos e séricos observados ao quarto dia de seu experimento mostrou que esse modelo poderia ser utilizado.

Não houve diferença significativa entre os regimes antibióticos administrados na primeira etapa deste estudo para o grupo In+DC, exceto pela maior despapilação da língua dos animais submetidos à ingestão de amoxicilina. Para a segunda etapa deste estudo, isolou-se, então, o fator antibiótico; foram eliminados os grupos CN e Di e análises mais específicas foram realizadas ao quarto dia após a remoção do dispositivo contaminado.

Para a avaliação clínica, não foram observadas diferenças entre os regimes antibióticos. Entretanto, maiores escores de Edema foram obtidos para o grupo sob administração de amoxicilina após quatro dias da remoção do dispositivo em relação ao período inicial e para o grupo sob tetraciclina imediatamente após a indução da doença em relação ao período inicial. Maiores escores de Eritema foram observados apenas para o grupo sob administração de tetraciclina no T4 em relação ao período inicial. E, novamente, maior despapilação da língua dos animais foi observada para o grupo submetido à amoxicilina após o período de indução da doença.

Na contagem de UFC/mL desta etapa, foi utilizado o meio de cultura *Candida* CHROMagar®, assim, foi possível a identificação presuntiva de colônias de *Candida* de outra espécie, com coloração rosa, indicativas de *C. krusei*. Não foram observadas diferenças entre os antibióticos para a recuperação fúngica de *C. albicans*. Entretanto, maiores valores de contagem de, possivelmente, *C. krusei* foram observados para a recuperação tanto das coletas do palato como do dispositivo contaminado para o grupo de animais sob ingestão de tetraciclina. Sob antibioticoterapia, os animais ficam mais suscetíveis a infecção por fungos não-*albicans* e esse efeito foi mais evidente para o regime de tetraciclina. Fisker e colaboradores³⁹ também encontraram esta espécie na cavidade oral de um animal sob antibioticoterapia, como em amostras coletadas da ração.

Nesta etapa, foi feita a padronização histológica sugerida por Hotta et al.²⁹ e selecionada a faixa entre primeiro e segundo molares para análises histométricas de nove variáveis do tecido epitelial do palato. Ainda foi quantificada por análise imunohistoquímica, a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

nas lâminas dos palatos para a comparação entre os antibióticos. Para estas análises, não houve diferença entre os regimes de antibioticoterapia avaliados. Ao passo que, as análises enzimáticas mostraram diferença significativa. Maior dosagem de mieloperoxidase produzida por neutrófilos foi obtida tanto para a quantificação do tecido palatal como da língua dos animais sob tetraciclina. Por outro lado, maiores níveis de N-glucosaminidase produzida por macrófagos foram observados nas dosagens das línguas dos animais sob amoxicilina.

Existe uma forte correlação entre a condição sintomática (candidose), em oposição a colonização assintomática de *C. albicans* (comensalismo), e o recrutamento de polimorfonucleares.¹⁰⁵ A resposta dos neutrófilos é iniciada por interações hifas de *C. albicans*-células epiteliais, incluindo a produção de candidalisina e reconhecimento de fungos mediado via receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que interagem com padrões moleculares presentes nos microrganismos patogênicos. Eventos de sinalização levam à produção de substâncias inflamatórias mediadoras, incluindo alarmina S100A8 e IL-1 β através do inflamassoma NLRP3. Estes mediadores iniciam a quimiotaxia vigorosa de neutrófilos, que seu estado de ativação amplifica a resposta inflamatória pelo aumento de sua produção local e de outras células efectoras (*feedback* positivo).¹⁰⁶ As células fagocíticas, por sua vez, desempenham um papel fundamental na imunidade inata contra *C. albicans*, na captura, morte e processamento do patógeno para apresentação às células T.¹⁰⁷ Apesar de ambos os regimes antibióticos terem sido fundamentais no desenvolvimento da doença tanto no palato como na língua dos animais, a partir dos resultados das análises enzimáticas somados aos dados anteriormente discutidos, pode-se inferir que, no modelo estudado, a antibioticoterapia com tetraciclina desempenhou um papel superior para a infecção por *C. albicans* no palato e a antibioticoterapia com amoxicilina mostrou mais evidências para a infecção fúngica na língua dos ratos Wistar.

9 CONCLUSÃO

A partir das condições experimentais utilizadas neste estudo, foi possível concluir que o modelo de rato Wistar utilizando durante 4 dias dispositivo acrílico previamente contaminado com *C. albicans* sob antibioticoterapia com tetraciclina resultou em alterações clínicas, enzimáticas e histológicas significantes compatíveis com estomatite protética, condição que perdurou por 4 dias após a remoção do dispositivo.

REFERÊNCIAS

1. Mima, EG, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clin Microbiol Infect.** v. 18, n. 10, p. E380-8. 2012.
2. Webb, BC, et al. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. **Aust Dent J.** v. 43, n. 4, p. 244-9. 1998.
3. Ercalik-Yalcinkaya, S , Ozcan, M. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. **J Prosthodont.** v. 24, n. 4, p. 271-8. 2015.
4. Emami, E, et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. **Int J Prosthodont.** v. 25, n. 2, p. 113-9. 2012.
5. Yarborough, A, et al. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. **J Prosthodont.** v. 25, n. 4, p. 288-301. 2016.
6. Arendorf, TM , Walker, DM. Denture stomatitis: a review. **J Oral Rehabil.** v. 14, n. 3, p. 217-27. 1987.
7. Budtz-Jorgensen, E. Clinical aspects of Candida infection in denture wearers. **J Am Dent Assoc.** v. 96, n. 3, p. 474-9. 1978.
8. Jeganathan, S , Lin, CC. Denture stomatitis--a review of the aetiology, diagnosis and management. **Aust Dent J.** v. 37, n. 2, p. 107-14. 1992.
9. Skupien, JA, et al. Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: a systematic review. **J Prosthet Dent.** v. 110, n. 5, p. 356-62. 2013.
10. Hilgert, JB, et al. Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Am Geriatr Soc.** v. 64, n. 12, p. 2539-45. 2016.
11. Banting, DW, et al. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. **J Can Dent Assoc.** v. 61, n. 3, p. 199-200, 3-5. 1995.
12. Newton, AV. Denture sore mouth as possible etiology. **Br Dent J.** v. 1, n. p. 357-60. 1962.
13. Semlali, A, et al. Cigarette smoke condensate increases C. albicans adhesion, growth, biofilm formation, and EAP1, HWP1 and SAP2 gene expression. **BMC microbiology.** v. 14, n. p. 61. 2014.
14. Loster, BW, et al. Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures. **Gastroenterology research and practice.** v. 2012, n. p. 951572. 2012.

15. Ghani, F, et al. Biochemically assessed pathological activity of oral *Candida* in denture and non denture wearers. **J Postgrad Med Inst.** v. 25, n. p. 188-98. 2011.
16. Lombardi, T , Budtz-Jorgensen, E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. **Eur J Prosthodont Restor Dent.** v. 2, n. 1, p. 17-22. 1993.
17. Mathaba, LT, et al. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. **J Med Microbiol.** v. 42, n. 5, p. 372-9. 1995.
18. Sato, M, et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. **Aust Dent J.** v. 42, n. 5, p. 343-6. 1997.
19. Parasuraman, S. Toxicological screening. **J Pharmacol Pharmacother.** v. 2, n. 2, p. 74-9. 2011.
20. Nett, JE, et al. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. **Infect Immun.** v. 78, n. 9, p. 3650-9. 2010.
21. Tobouti, PL, et al. Expression of Secreted Aspartyl Proteinases in an Experimental Model of *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. **J Prosthodont.** v. 25, n. 2, p. 127-34. 2016.
22. Lee, H, et al. Fabrication of a multi-applicable removable intraoral denture system for rodent research. **J Oral Rehabil.** v. 38, n. 9, p. 686-90. 2011.
23. Junqueira, JC, et al. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Lasers Med Sci.** v. 24, n. 6, p. 877-84. 2009.
24. Martinez, A, et al. Antifungal efficacy of GM237354, a sordarin derivative, in experimental oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 45, n. 4, p. 1008-13. 2001.
25. Conti, HR, et al. Animal models for candidiasis. **Curr Protoc Immunol.** v. 105, n. p. 19 6 1-7. 2014.
26. Yano, J, et al. Transcription Factors Efg1 and Bcr1 Regulate Biofilm Formation and Virulence during *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. **PLoS One.** v. 11, n. 7, p. e0159692. 2016.
27. Jennings, KJ , MacDonald, DG. A quantitative method for assessing changes in rat palatal histology under denture-like appliances. **Arch Oral Biol.** v. 35, n. 7, p. 557-9. 1990.
28. Barclay, SC, et al. The effect of diet on palatal prosthetic coverage in rats. **J Dent.** v. 25, n. 1, p. 71-8. 1997.
29. Hotta, J, et al. Intraoral Device for Optimal Antifungal Delivery in a Rat Model. **Curr Drug Deliv.** v. 14, n. 5, p. 658-67. 2017.

30. Shakir, BS, et al. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the Wistar rat. **J Oral Pathol.** v. 15, n. 7, p. 375-80. 1986.
31. Martin, MV, et al. The effect of *Candida albicans* on the permeability of rat palatal epithelium: an ultrastructural and biochemical study. **J Med Vet Mycol.** v. 25, n. 1, p. 19-28. 1987.
32. Olsen, I , Bondevik, O. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. **Scand J Dent Res.** v. 86, n. 5, p. 392-8. 1978.
33. Shakir, BS, et al. Induced palatal candidosis in the wistar rat. **Arch Oral Biol.** v. 26, n. 10, p. 787-93. 1981.
34. Jennings, KJ , MacDonald, DG. Rat palatal histology related to denture-like appliances. **J Dent.** v. 20, n. 4, p. 250-4. 1992.
35. Shakir, BS, et al. Relative effectiveness of various yeasts, *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the Wistar rat. **Arch Oral Biol.** v. 28, n. 11, p. 1069-71. 1983.
36. Yano, J, et al. *Candida glabrata* Has No Enhancing Role in the Pathogenesis of *Candida*-Associated Denture Stomatitis in a Rat Model. **mSphere.** v. 4, n. 2, p. 2019.
37. Johnson, CC, et al. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. **Infect Immun.** v. 80, n. 5, p. 1736-43. 2012.
38. Shakir, BS, et al. Effect on experimental palatal candidosis in the Wistar rat of removal and re-insertion of acrylic appliances. **Arch Oral Biol.** v. 31, n. 9, p. 617-21. 1986.
39. Fisker, AV, et al. Short-term oral candidosis in rats, with special reference to the site of infection. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.** v. 90, n. 1, p. 49-57. 1982.
40. Rennie, JS, et al. The role of iron deficiency in experimentally-induced oral candidosis in the rat. **J Med Microbiol.** v. 16, n. 3, p. 363-9. 1983.
41. Lamb, DJ , Martin, MV. An in vitro and in vivo study of the effect of incorporation of chlorhexidine into autopolymerizing acrylic resin plates upon the growth of *Candida albicans*. **Biomaterials.** v. 4, n. 3, p. 205-9. 1983.
42. Norris, MM, et al. The effect of miconazole on palatal candidosis induced in the Wistar rat. **J Dent.** v. 13, n. 4, p. 288-94. 1985.
43. Takakura, N, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. **J Med Microbiol.** v. 53, n. Pt 6, p. 495-500. 2004.

44. Camacho-Alonso, F, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. **J Oral Pathol Med**. v. n. p. 1-7. 2016.
45. Hotta, J, et al. In vivo biocompatibility of a temporary soft denture liner containing antifungal drugs. **J Prosthet Dent**. v. In Press, n. p. 2019.
46. Kumar, S, et al. Evaluation of safety margins of *Chenopodium album* seed decoction: 14-day subacute toxicity and microbicidal activity studies. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**. v. 9, n. p. 102. 2011.
47. Cross, AS, et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **J Biol Chem**. v. 278, n. 6, p. 4112-20. 2003.
48. Bradley, PP, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**. v. 78, n. 3, p. 206-9. 1982.
49. Suzuki, K, et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Anal Biochem**. v. 132, n. 2, p. 345-52. 1983.
50. Bailey, PJ. Sponge implants as models. **Meth Immunol**. v. 162, n. p. 327-34. 1988.
51. Moraes, GS. **Validação de modelo de indução de candidose bucal e avaliação da toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar**. 2018, 158 f, (Mestrado) - Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.
52. Takakura, N, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. **Microbiol Immunol**. v. 47, n. 5, p. 321-6. 2003.
53. Wong, SS, et al. In vitro and in vivo activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. **PLoS One**. v. 9, n. 1, p. e85836. 2014.
54. Close, B, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. **Lab Anim**. v. 30, n. 4, p. 293-316. 1996.
55. Hawkins, P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. **Lab Anim**. v. 36, n. 4, p. 378-95. 2002.
56. Alves, HN, et al. Anesthesia with intraperitoneal propofol, medetomidine, and fentanyl in rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**. v. 49, n. 4, p. 454-9. 2010.
57. Seo, RS, et al. Influence of thermal and mechanical stresses on the strength of intact and relined denture bases. **J Prosthet Dent**. v. 96, n. 1, p. 59-67. 2006.
58. ISO. **International Organization for Standardization: Specification 1567: denture base polymers**. ISO: Switzerland, 1998.

59. Silva, PMB. **Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilme de C. albicans em resinas acrílicas termopolimerizáveis.** 2009, 140 f, (Mestrado) - Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.
60. Ribeiro, DG, et al. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. **J Dent.** v. 37, n. 9, p. 666-72. 2009.
61. Bueno, M, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the Candida albicans biofilm. **Oral Dis.** v. 21, n. 1, p. 57-65. 2015.
62. Catalan, A, et al. 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.** v. 105, n. 3, p. 327-32. 2008.
63. Zamperini, CA, et al. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. **Mycoses.** v. 54, n. 5, p. e344-51. 2010.
64. Ellepola, AN , Samaranayake, LP. Adhesion of oral Candida albicans isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. **Arch Oral Biol.** v. 43, n. 12, p. 999-1007. 1998.
65. Ramage, G, et al. Characteristics of biofilm formation by Candida albicans. **Rev Iberoam Micol.** v. 18, n. 4, p. 163-70. 2001.
66. Chandra, J, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J Dent Res.** v. 80, n. 3, p. 903-8. 2001.
67. Delben, JA, et al. Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium. **PLoS One.** v. 11, n. 5, p. e0155427. 2016.
68. Thein, ZM, et al. Effect of oral bacteria on growth and survival of Candida albicans biofilms. **Arch Oral Biol.** v. 51, n. 8, p. 672-80. 2006.
69. Sakima, VT. **Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por curcumina nanoparticulada em modelo murino de candidose oral.** 2017, 74 f, (Mestrado) - Reabilitação Oral - Área de Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Araraquara, 2017.
70. Ishijima, SA, et al. Effect of Streptococcus salivarius K12 on the in vitro growth of Candida albicans and its protective effect in an oral candidiasis model. **Appl Environ Microbiol.** v. 78, n. 7, p. 2190-9. 2012.
71. Takakura, N, et al. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 47, n. 8, p. 2619-23. 2003.
72. Costa, AC, et al. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. **Virulence.** v. 4, n. 5, p. 391-9. 2013.

73. Hotta, J. **Viabilidade do uso de dispositivo acrílico intra-oral reembasado por material resiliente temporário modificado por antimicrobianos: estudo preliminar em ratos**. 2013, 184 f, (Mestrado) - Ciências Odontológicas aplicadas - Área de Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.
74. de Vasconcelos, LC, et al. Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. **Braz Dent J**. v. 25, n. 4, p. 277-81. 2014.
75. Foldvari, M, et al. Efficacy of the antiadhesin octyl O-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-galactopyranosyl)-(1-4)-2-O-propyl-beta-D-galactopyranoside (Fimbrigel-P) in a rat oral candidiasis model. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 49, n. 7, p. 2887-94. 2005.
76. Landis, JR , Koch, GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v. 33, n. 1, p. 159-74. 1977.
77. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 72, n. p. 248-54. 1976.
78. Samaranayake, YH , Samaranayake, LP. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin Microbiol Rev**. v. 14, n. 2, p. 398-429. 2001.
79. Banting, DW , Hill, SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist**. v. 21, n. 1, p. 4-8. 2001.
80. Barbeau, J, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 95, n. 1, p. 51-9. 2003.
81. Pereira-Cenci, T, et al. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. **J Appl Oral Sci**. v. 16, n. 2, p. 86-94. 2008.
82. Salerno, C, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 16, n. 2, p. e139-43. 2011.
83. Zomorodian, K, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Med Mycol**. v. 49, n. 2, p. 208-11. 2011.
84. Richardson, A, et al. Persons with insulin-dependent diabetes mellitus: acceptance and coping ability. **J Adv Nurs**. v. 33, n. 6, p. 758-63. 2001.
85. Arendorf, TM , Walker, DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch Oral Biol**. v. 25, n. 1, p. 1-10. 1980.
86. Kennedy, MJ. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. **Current topics in medical mycology**. v. 2, n. p. 73-169. 1988.

87. Hazen, BW , Hazen, KC. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. **Infect Immun.** v. 56, n. 9, p. 2521-5. 1988.
88. Hazen, KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. **Infect Immun.** v. 57, n. 7, p. 1894-900. 1989.
89. Soll, DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev.** v. 5, n. 2, p. 183-203. 1992.
90. De Bernardis, F, et al. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. **Infect Immun.** v. 64, n. 2, p. 466-71. 1996.
91. Lane, T , Garcia, JR. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. **Mycoses.** v. 34, n. 5-6, p. 217-20. 1991.
92. Samaranayake, YH , Samaranayake, LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **J Med Microbiol.** v. 41, n. 5, p. 295-310. 1994.
93. Clancy, CJ, et al. Animal models of candidiasis. **Methods in molecular biology.** v. 499, n. p. 65-76. 2009.
94. Ferracane, JL, et al. Self-adhesive resin cements - chemistry, properties and clinical considerations. **J Oral Rehabil.** v. 38, n. 4, p. 295-314. 2011.
95. Wang, N, et al. Low dose doxycycline decreases systemic inflammation and improves glycemic control, lipid profiles, and islet morphology and function in db/db mice. **Scientific reports.** v. 7, n. 1, p. 14707. 2017.
96. Winner, HI. The transition from commensalism to parasitism. **Br J Dermatol.** v. 81, n. p. Suppl 1:62+. 1969.
97. Allen, CM, et al. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongues. **Infect Immun.** v. 47, n. 2, p. 480-3. 1985.
98. Yrjanheikki, J, et al. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 96, n. 23, p. 13496-500. 1999.
99. Garrido-Mesa, N, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of minocycline in experimental colitis involves both its immunomodulatory and antimicrobial properties. **Pharmacol Res.** v. 63, n. 4, p. 308-19. 2011.
100. Philipsen, HP, et al. Correlative light microscopic and scanning electron microscopic study of completely and incompletely orthokeratinized rat oral epithelium. **Scand J Dent Res.** v. 90, n. 4, p. 255-62. 1982.

101. Sandini, S, et al. A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine. **FEMS immunology and medical microbiology**. v. 62, n. 2, p. 215-24. 2011.
102. Santoni, G, et al. Immune cell-mediated protection against vaginal candidiasis: evidence for a major role of vaginal CD4(+) T cells and possible participation of other local lymphocyte effectors. **Infect Immun**. v. 70, n. 9, p. 4791-7. 2002.
103. De Bernardis, F, et al. Phenotypic and functional characterization of vaginal dendritic cells in a rat model of *Candida albicans* vaginitis. **Infect Immun**. v. 74, n. 7, p. 4282-94. 2006.
104. De Bernardis, F, et al. A virosomal vaccine against candidal vaginitis: immunogenicity, efficacy and safety profile in animal models. **Vaccine**. v. 30, n. 30, p. 4490-8. 2012.
105. Yano, J, et al. Epithelial cell-derived S100 calcium-binding proteins as key mediators in the hallmark acute neutrophil response during *Candida* vaginitis. **Infect Immun**. v. 78, n. 12, p. 5126-37. 2010.
106. Yano, J, et al. The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal *Candida* infections is independent of the Th17-pathway. **PLoS One**. v. 7, n. 9, p. e46311. 2012.
107. Reales-Calderon, JA, et al. Proteomic characterization of human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages and their response to *Candida albicans*. **Proteomics**. v. 14, n. 12, p. 1503-18. 2014.

ANEXO A – Autorização para uso de animais em pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) para o Estudo I



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**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)

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 à 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

ANEXO B - Protocolo de processamento histológico (histotécnico) - UEPG:

Formol 10% tamponado.....	5 min
Água.....	1 h
Álcool 70°.....	1 h 30 min
Álcool 80°.....	1 h 30 min
Álcool 95°.....	1 h 30 min
Álcool etílico absoluto.....	1 h 30 min
Álcool etílico absoluto.....	1 h 30 min
Álcool-xilol (1:1).....	1 h
Xilol.....	1 h 30 min
Xilol.....	1 h 30 min
Parafina fundida.....	2 h
Parafina fundida.....	2 h

Protocolo de uso da máquina inclusora de parafina – UEPG:

1. A inclusão deve ser realizada preferencialmente logo após as peças serem retiradas da máquina de processamento histotécnico;
2. Ligar a máquina inclusora no botão na parte de trás;
3. Ajustar a temperatura no botão rotatório para 60°C para o tanque (*Tank*) e para a mesa (*Plate*) aproximadamente 45-50°C;
4. Após retirar os cassetes do processamento histotécnico, posicioná-los sobre a mesa da inclusora para que a parafina não solidifique;
5. Colocar a forma na mesa e despejar uma pequena quantidade de parafina no fundo da forma antes de inserir a peça;
6. Posicionar a peça com auxílio de uma pinça e adicionar o restante de parafina ao redor para evitar que a peça saia da posição correta;
7. Desligar a máquina;
8. Realizar a limpeza retirando os excessos de parafina da mesa com uma gaze.

ANEXO C - Protocolo de coloração Hematoxilina – Eosina (H.E.) (AFIP/USA) –

UEPG:

Xilol.....	10 min
Xilol.....	10 min
Álcool absoluto.....	por e tirar
Álcool 90°.....	por e tirar
Álcool 70°.....	por e tirar
Álcool 50°.....	por e tirar
Água de torneira.....	2 trocas
Água destilada.....	2 trocas
Corar com Hematoxilina de Mayer.....	12-15 min
Lavar em água de torneira	
Diferenciar com água de torneira corrente.....	15 min
Álcool 80°.....	2 min
Corar com Eosina-Fluoxina.....	5 min
Álcool absoluto I.....	por e tirar
Álcool absoluto II.....	por e tirar
Álcool absoluto III.....	por e tirar
Diafanizar (xilol diaf. e xilol montagem)	3 min
Montagem em bálsamo-do-canadá	

ANEXO D – Autorização para uso de animais em pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) para o Estudo II



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 Thais 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

Data de Entrada – 20/08/2018

Resultado: Aprovado

Prezada Professora Dra. Vanessa Migliorini Urban e Mestranda Thais 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

Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin

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

ANEXO E - Protocolo de processamento histológico (histotécnico) - FOB-USP:

Retirar amostras do formol	
4 lavagens em água de torneira	
Álcool 70°.....	24h
Álcool I.....	4h
Álcool II.....	4h
Álcool III.....	4h
Xilol I.....	45 min
Xilol II.....	45 min
Xilol III.....	45 min
Parafina fundida.....	1 h
Parafina fundida.....	3 h

Protocolo de inclusão das peças em parafina – FOB-USP:

1. A inclusão deve ser realizada preferencialmente logo após o processamento das amostras;
2. Derreter a parafina;
3. Colocar a forma na mesa e despejar uma pequena quantidade de parafina no fundo da forma antes de inserir a peça;
4. Posicionar a peça com auxílio de uma pinça e adicionar o restante de parafina ao redor para evitar que a peça saia da posição correta;
5. Identificar a peça.

ANEXO F - Protocolo de coloração Hematoxilina – Eosina (H.E.) FOB-USP:

Lâminas na estufa.....	<i>Overnight</i>
Xilol.....	15 min
Xilol.....	15 min
Xilol.....	15 min
Álcool 70°.....	5 min
Água de torneira.....	10 min
Corar com Hematoxilina de Mayer.....	1 min
Lavar em água de torneira.....	10 min
Corar com Eosina-Fluoxina.....	1 min
Lavagem em água.....	por e tirar
Álcool 70°.....	por e tirar
Álcool absoluto	por e tirar
Álcool absoluto	3 min
Álcool absoluto	3 min
3 banhos em Xilol	3 min
Montagem em bálsamo-do-canadá	

ANEXO G - Protocolo de coloração para Imuno-histoquímica PCNA (FOB-USP):

Lâminas em estufa a 60 °C	<i>Overnight</i>
2 banhos de Xilol.....	10 min
2 banhos de Álcool absoluto.....	5 min
1 banho Álcool 70°.....	por e tirar
Água destilada.....	3 min
Recuperação antigênica com Citrato 110.....	5 min
2 lavagens com TBS.....	3min
Secagem com papel	
Bloqueio de Peroxidase Endógena em câmara úmida.....	10 min
Lavagem com TBS.....	por e tirar
Banho com TBS.....	5 min
Secagem com papel	
Pingar bloqueador de proteína sérica.....	15 min
Secagem com papel	
Encubação com anticorpo primário em câmara úmida.....	1 hora
2 banhos com TBS.....	3 min
Secagem com papel	
Encubação com anticorpo secundário.....	1 hora
Lavagem com TBS.....	3 min
Secagem com papel	
DAB 1 gota/mL de solução	
Lavagem em água destilada.....	por e tirar
Corar com Hematoxilina de Mayer.....	3 min
Lavagem em água corrente.....	3 min
Banho em água de torneira.....	3 min
Banho em álcool 70°.....	3 min
2 banhos em álcool absoluto.....	3 min
3 banhos de xilol.....	3 min
Montagem com entelam	