

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

GUSTAVO SIMÃO MORAES

**VALIDAÇÃO DE MODELO DE INDUÇÃO DE CANDIDOSE BUCAL E AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE SISTÊMICA AGUDA À CLOREXIDINA EM RATOS WISTAR**

PONTA GROSSA

2018

GUSTAVO SIMÃO MORAES

**VALIDAÇÃO DE MODELO DE INDUÇÃO DE CANDIDOSE BUCAL E AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE SISTÊMICA AGUDA À CLOREXIDINA EM RATOS WISTAR**

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
Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M827 Moraes, Gustavo Simão
Validação de modelo de indução de candidose bucal e avaliação da toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar/ Gustavo Simão Moraes. Ponta Grossa, 2018.
158f.

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

Orientadora: Profª Drª Vanessa Migliorini Urban.

Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso.

1.Estomatite sob prótese. 2.Candida albicans. 3.Clorexidina. 4.Testes de toxicidade aguda. 5.Ratos Wistar. I.Urban, Vanessa Migliorini. II. Velloso, José Carlos Rebuglio. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

GUSTAVO SIMÃO MORAES

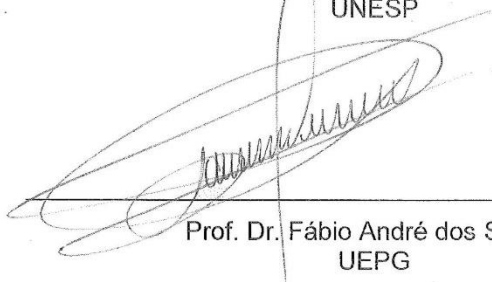
Estudos de validação de indução de candidose bucal e de toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar.

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 de Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Ponta Grossa, 08 de fevereiro de 2018.



Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima
UNESP



Prof. Dr. Fábio André dos Santos
UEPG



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

DADOS CURRICULARES

Gustavo Simão Moraes

NASCIMENTO	22.04.1992	Guarapuava – Paraná
FILIAÇÃO		Marilda Lopes Simão Moraes João Maria Moraes
2010-2014		Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - Ponta Grossa - Paraná
2015-2016		Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial – Regional de Guarapuava - Seção Paraná (ABO-PR)
2016-2018		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

À minha mãe, **Marilda**, aos meus irmãos, **Henrique** e **Daniela**, e também ao **Fabio** e à **Laís**. Obrigado por serem a minha base e meu refúgio, por sempre estarem de braços abertos e por todo o amor e carinho. Obrigado por compreenderem a minha ausência e por sempre me encorajarem a buscar mais. Não importa o quão difícil seja o momento que eu esteja passando, a ideia de poder vê-los aos fins de semana me acalma e me dá forças para continuar em frente.

Ao meu pai, **João**, que mesmo não estando mais conosco fisicamente, eu sei que se faz presente e me acompanha na minha jornada. Não importa quanto tempo passe, você está em meus pensamentos diariamente e a sua falta ainda é sentida com muita dor. Obrigado por tudo que fez por mim e obrigado pelo exemplo deixado. Eu espero de todo coração que possamos nos encontrar novamente um dia.

"Pena que as palavras sejam tão áridas e insuficientes para retratar a dimensão de certos sentimentos."

Idalberto Chiavenato

"Quão sortudo eu sou por ter algo que torna o adeus tão difícil."

A. A. Milne

Agradecimentos especiais

À minha orientadora, **Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban**. Só eu sei o quão grato sou pelos acasos que te tornaram minha orientadora. Não existem palavras que me ajudem a expressar a gratidão que eu sinto por ter recebido essa oportunidade. Muito obrigado por acreditar em mim e por me confiar esse trabalho. Muito obrigado pelo exemplo de profissional, pesquisadora, orientadora, professora, e principalmente, de pessoa que você é. Muito obrigado por sempre me encorajar a ser e a fazer o meu melhor. Se hoje eu sinto orgulho da pessoa que estou me tornando, boa parte eu devo a você.

Agradecimentos

A **Deus**, por nunca me desamparar e sempre me guiar em todos os momentos da minha vida. Obrigado por permitir a realização de mais um sonho.

Aos professores da **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, por ajudarem no meu crescimento profissional e pessoal. Em especial:

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso**, por todos os ensinamentos durante a realização desse trabalho. Obrigado por ter aceito ser meu coorientador, pela paciência e pela disposição na realização das análises bioquímicas. Estendo meus agradecimentos ao **Prof. Anderson José de Melo e Silva** pelo auxílio nas análises e pelas sugestões durante a realização da pesquisa.

À **Profa. Dra. Regina de Sordi**, por todo auxílio na execução desse trabalho. Sua ajuda foi essencial para torná-lo realidade. Obrigado pela paciência, pela disponibilidade e por suas valiosas sugestões.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli**, por todos os ensinamentos e por todas as dúvidas esclarecidas. Obrigado por ser tão paciente e por sempre se dispor a me ajudar, desde a época da graduação.

À **Profa. Dra. Shelon Cristina Souza Pinto**, por sempre me incentivar a continuar estudando e por ter me encorajado a fazer o Mestrado. Obrigado pelo seu carinho e amizade.

Ao **Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais**, por todo o auxílio no manuseio do microscópio confocal e na análise estatística. Obrigado pela paciência e disponibilidade.

Ao **Prof. Dr. Fabio André dos Santos** e à **Profa. Dra. Márcia Thaís Pochapski**, por todas as dúvidas esclarecidas e sugestões dadas no decorrer do trabalho, principalmente quanto à manipulação de animais de laboratório.

À **Profa. Dra. Marcela Claudino da Silva**, por gentilmente ter aceito analisar as lâminas histológicas.

Ao **Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco** e ao **Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski** por todos os ensinamentos relacionados à manipulação de animais de laboratório. Obrigado pela paciência e disponibilidade.

Ao **Prof. Dr. Luís Antônio Esmerino**, pelas sugestões relacionadas à parte microbiológica do experimento.

Tenho todos como exemplos a serem seguidos.

À **Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek**, que mesmo de longe, sempre se fez muito presente. Obrigado por todo auxílio na obtenção dos materiais, que foram essenciais para a realização desse estudo.

Ao **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima** e ao **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, pelas valiosas sugestões no decorrer da realização desse trabalho.

Aos meus amigos e colegas de Pós-Graduação, **Daniela, Fernanda, Ana Cláudia, Mariane, Francine, Leomar, Evelyn, Luisa e Letícia**, por todos os momentos compartilhados ao longo dessa caminhada. Obrigado por todo auxílio no laboratório, pelos momentos de desabafo e também de descontração.

Às alunas de iniciação científica **Isabella, Mariana e Victoria**, por todo o auxílio no laboratório. Obrigado por se disporem a me ajudar mesmo nos fins de semana e feriados. Também agradeço ao **Júnior** e à **Priscila**, por terem me ajudado nos momentos finais do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcos Pileggi** e ao **Prof. Dr. Rafael Mazer Etto** por permitirem a utilização de seus laboratórios e equipamentos. Estendo meus agradecimentos à **Eliz, Marília e Lígia**, por se disporem a me ajudar.

A todos os funcionários da UEPG. Em especial, às funcionárias do Núcleo Avançado de Estudos da Vida, **Marilene, Marlene e Maria**, que sempre me atenderam com muito carinho e disposição.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, e à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPG **Profa. Dra. Denise Stadler Wambier**, 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.

Moraes, G. S. **Validação de modelo de indução de candidose bucal e avaliação da toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar** [Dissertação]
Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.

RESUMO

Objetivo: Esta Dissertação foi composta por dois estudos. O primeiro avaliou métodos de esterilização de dispositivos palatais acrílicos para uso animal, bem como realizou a contaminação dos mesmos com *Candida albicans*. Ademais, verificou-se a duração da candidose bucal induzida por diferentes protocolos em ratos Wistar imunocompetentes e a efetividade da indução da estomatite protética em ratos imunocompetentes sob antibioticoterapia. O segundo avaliou parâmetros histológicos e bioquímicos como marcadores da toxicidade aguda hepática, renal, pulmonar e gástrica causada pela administração via gavagem de doses tóxicas de clorexidina (Clx) nesses animais. **Material e métodos:** No Estudo I, dispositivos acrílicos foram confeccionados a partir de moldagens dos palatos dos animais utilizando moldeiras individuais e poliéster. Verificou-se a esterilização dos dispositivos (n=5) por meio do uso de micro-ondas (MO), luz ultravioleta (UV), ultrassom (US) ou nenhum método (CN), a partir de análises da viabilidade das colônias e em espectrofotômetro. Então, realizou-se a contaminação dos aparatos com um biofilme de *C. albicans*, a qual foi confirmada por meio de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL (n=6) e microscopia confocal a laser (n=5). Posteriormente, 20 animais foram divididos em cinco grupos (n=4): Cn=nenhum protocolo; Di=cimentação de dispositivo estéril; In=inoculação de suspensão de *C. albicans* no palato, sem a utilização de dispositivos; Dc=cimentação de dispositivo contaminado com *C. albicans*; In+Dc=junção dos grupos In e Dc. Os ratos foram monitorados durante uma semana para verificar a presença de sinais clínicos de candidose bucal por meio de fotografias dos palatos e línguas. Foi realizada a contagem de UFC/mL a partir de coletas feitas nos palatos utilizando swabs. Ao final dos sete dias, realizou-se a eutanásia e os palatos e línguas foram removidos para análise histopatológica. Finalmente, outros animais submetidos aos grupos Cn (n=2), Di (n=6) ou In+Dc (n=6) receberam tetraciclina na água de beber 7 dias antes de serem submetidos aos protocolos. Após o período de instalação da infecção (4 dias utilizando os dispositivos), as mesmas análises foram realizadas. No Estudo II, dois grupos foram avaliados (n=9): CN=administração de 1,5 mL de água destilada (veículo) via gavagem ou Clx=1,5 g/Kg de Clx diluída no veículo. Após 24 h, os animais tiveram seu sangue coletado e órgãos removidos. No plasma, foram analisados os níveis de ureia, creatinina e ácido úrico (para análise do funcionamento renal), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina (FA) (para análise do funcionamento hepático), glicemia e lactato desidrogenase. Os órgãos foram avaliados por meio de análise histopatológica. **Resultados:** No Estudo I, o MO foi o único método que esterilizou os dispositivos ($p<0,05$; ANOVA 1-fator/Tukey HSD) e o protocolo de contaminação foi considerado adequado, com formação de biofilme composto por hifas e leveduras viáveis ($1,2 \times 10^6$ UFC/mL). Não foram observadas alterações clínicas nos palatos dos animais. Foram observadas regiões despapiladas nas línguas dos animais dos grupos In, Dc e In+Dc em até quatro dias após a indução da

infecção. A recuperação de *C. albicans* a partir das coletas foi considerada baixa e os maiores valores foram obtidos no grupo In+Dc. Histologicamente, os tecidos apresentaram-se sem alterações epiteliais e no conjuntivo. Estando os animais sob antibioticoterapia, o valor recuperado de *C. albicans* foi 10 vezes superior para o grupo In+Dc após a instalação da infecção ($1,3 \times 10^4$ UFC/mL). Foram observados eritema puntiforme e edema tecidual no palato e despilação na língua desses animais. Histologicamente, foram observados microabscessos e infiltrado inflamatório no palato, além de invasão fúngica no epitélio das línguas. No Estudo II, a Clx provocou perda de peso ($p=0,001$) e redução no consumo de ração ($p=0,008$; ANOVA 2-fatores de medidas repetidas/Tukey HSD) e aumento nos níveis de TGO ($p=0,026$) e TGP ($p=0,009$) e redução nos níveis de FA ($p=0,020$; teste T não-pareado). Histologicamente, foram encontradas maiores alterações hepáticas ($p=0,009$; teste Qui-quadrado) para os animais do grupo CN e maiores alterações gástricas ($p=0,05$), para o grupo Clx, os quais apresentaram danos moderados (escore 3). **Conclusão:** No Estudo I, o método MO esterilizou os dispositivos; biofilme de *C. albicans* foi formado sobre os mesmos e a estomatite protética em animais sob antibioticoterapia foi evidenciada macroscopicamente, microscopicamente e histologicamente. No estudo II, a Clx administrada por gavagem causou hepatotoxicidade e danos gástricos nos animais.

Palavras-chave*: Estomatite sob Prótese. *Candida albicans*. Clorexidina. Testes de Toxicidade Aguda. Ratos Wistar.

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

Moraes, G. S. **Validation of an oral candidosis induction model and evaluation of acute systemic toxicity of chlorhexidine in Wistar rats** [Dissertação] Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.

ABSTRACT

Purpose: This Dissertation was composed by two studies. The first study evaluated sterilization methods of acrylic palatal devices for animal use, as well as performed their contamination with *Candida albicans*. In addition, the duration of oral candidosis induced by different protocols in immunocompetent Wistar rats and the effectiveness of the induction of denture stomatitis in immunocompetent Wistar rats under antibiotic therapy was analyzed. The second one evaluated the effectiveness of histological and biochemical parameters as markers of acute hepatic, renal, pulmonary, and gastric toxicity caused by gavage administration of toxic doses of chlorhexidine (Chx) in Wistar rats. **Material and methods:** For the first study, acrylic devices were made from impressions of the animals' palate with individual trays and polyether. Sterilization of the devices (n=5) was verified after submission to microwave (MW), ultraviolet light (UV), ultrasonic bath (US), or none method (NC), and assessed by colony viability and spectrophotometric analyses. Then, devices' contamination with *C. albicans* was performed and confirmed by counting Colony Forming Units (CFU)/mL (n=6) and by laser confocal microscopy (n=5). Subsequently, 20 animals were divided into five groups (n=4): Nc=none protocol; Id=cementation of a sterile intraoral device; In=inoculation of a *C. albicans* suspension on the palate, without wearing a device; Cd=cementation of a device contaminated by *C. albicans*; In+Cd=junction of In and Cd groups. The rats were monitored for one week to verify the presence of clinical signs of oral candidosis by taking photographs of their palates and tongues. CFU/mL counts were determined from the collected material of their palates using swabs. After one week, euthanasia was performed and the palates and tongues were removed for histopathological analysis. Finally, other animals of Nc (n=2), Id (n=6), or In+Cd groups (n=6) received tetracycline in the drinking water 7 days before being submitted to the protocols. After the disease installation period (four days using the devices), the same analyzes were performed. For the second study, two groups were evaluated (n=9): NC=administration of 1.5 mL of distilled water (vehicle) via gavage or Chx=1.5 g/Kg of Chx diluted in the vehicle. After 24 h, the animals had their blood collected and organs removed. In the plasma, the levels of urea, creatinine and uric acid (for kidney assessment), glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphatase (AP) (for liver assessment), glycemia and lactate dehydrogenase were analyzed. The organs were evaluated by histopathological analysis. **Results:** In the first study, MW was the only method capable of sterilizing the devices ($p<0.05$; ANOVA 1-way/Tukey HSD), and the protocol used for contamination was considered satisfactory, developing a biofilm composed by viable hyphae and yeasts (1.2×10^6 CFU/mL). No clinical changes were observed in the palates of the animals. Areas of localized papillary atrophy were observed on the tongue dorsum of animals from In, Cd, and In+Cd groups until four days after the infection installation. The recovery of *C. albicans* was considered low and the highest values were obtained from the In+Cd group. Histologically, no alterations were observed. With the animals under antibiotic

therapy, the recovered values of *C. albicans* were 10 times higher for the In+Cd group after the infection installation (1.3×10^4 CFU/mL). It was observed localized erythema and tissue edema on the palatal mucosa and papillary atrophy on tongue dorsum of these animals. Histologically, microabscesses and inflammatory infiltrate in the palate, as well as fungal invasion in the tongue epithelium were also observed. In the second study, Clx caused weight loss ($p=0.001$), and reduction in food intake ($p=0.008$; ANOVA 2-way for the repeated measures/Tukey HSD), respiratory distress, and an increase in GOT ($p=0.026$) and GPT levels ($p = 0.009$), and decrease in AP levels ($p=0.020$; unpaired t-test). Microscopically, higher hepatic alterations ($p=0.009$; Chi-squared test) were found for NC group and higher gastric alterations ($p=0.05$), for Chx group, which showed moderate changes (score 3). **Conclusion:** In the first study, MW sterilized the devices; *C. albicans* biofilm was formed on their surfaces; denture stomatitis in animals under antibiotic therapy was evidenced macroscopically, microscopically, and histologically. In the second study, Chx gavage administration caused hepatotoxicity and gastric damage.

Keywords*: Denture Stomatitis. *Candida albicans*. Chlorhexidine. Acute Toxicity Tests. Wistar Rats.

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Confecção das moldeiras individuais.....	62
FIGURA 2 -	Moldagem, vazamento e enceramento dos modelos de trabalho.....	63
FIGURA 3 -	Inclusão em mufla e polimerização dos dispositivos acrílicos..	64
FIGURA 4 -	Acabamento e polimento dos dispositivos.....	65
FIGURA 5 -	Testes de esterilidade dos dispositivos.....	66
FIGURA 6 -	Preparo do inóculo.....	68
FIGURA 7 -	Placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e o crescimento fúngico resultante das diluições seriadas.....	69
FIGURA 8 -	Dispositivos imersos no meio de cultura após período de formação de biofilme.....	70
FIGURA 9 -	Fluxograma da primeira etapa do Estudo I, referente à esterilização e contaminação dos dispositivos.....	71
FIGURA 10 -	Cimentação do dispositivo nos molares superiores do rato.....	73
FIGURA 11 -	Dispositivo após remoção.....	73
FIGURA 12 -	Posicionamento dos animais em maca estabilizadora e utilização de mesa estativa para obtenção de fotografias padronizadas.....	75
FIGURA 13 -	Coleta de biofilme na mucosa palatal do animal.....	75
FIGURA 14 -	Fluxograma da segunda etapa do Estudo I, referente à indução de candidose bucal em animais imunocompetentes...	78
FIGURA 15 -	Fluxograma da terceira etapa do Estudo I, referente à indução de estomatite protética em animais imunocompetentes sob antibioticoterapia.....	80
FIGURA 16 -	Placas de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton e semeadas com material coletado da superfície dos dispositivos.....	82
FIGURA 17 -	Análise da esterilidade dos dispositivos em espectrofotômetro	84
FIGURA 18 -	Resultados da análise em espectrofotômetro (mAbs) dos caldos com e sem a presença do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio.....	85

FIGURA 19 -	Placas com diluições seriadas para contagem das UFC/mL a partir dos dispositivos contaminados.....	86
FIGURA 20 -	Fotomicrografias obtidas de diferentes dispositivos contaminados por meio de microscopia confocal laser (aumento de 63x).....	87
FIGURA 21 -	Fotomicrografias apresentando a aglomeração e morte dos microrganismos após 25 min de exposição ao laser (aumento de 63x).....	87
FIGURA 22 -	Placas de <i>Candida</i> CHROMagar® utilizadas na triagem dos animais.....	88
FIGURA 23 -	Resultados das pesagens (g) dos animais na segunda etapa do Estudo I.....	89
FIGURA 24 -	Imagens iniciais do palato dos animais.....	90
FIGURA 25 -	Imagens do palato dos animais no período T0.....	91
FIGURA 26 -	Imagens do palato dos animais no período T1.....	92
FIGURA 27 -	Imagens do palato dos animais no período T2.....	93
FIGURA 28 -	Imagens do palato dos animais no período T3.....	94
FIGURA 29 -	Imagens iniciais da língua dos animais.....	95
FIGURA 30 -	Imagens da língua dos animais no período T0.....	96
FIGURA 31 -	Imagens da língua dos animais no período T1.....	97
FIGURA 32 -	Imagens da língua dos animais no período T2.....	98
FIGURA 33 -	Imagens da língua dos animais no período T3.....	99
FIGURA 34 -	Lâminas dos palatos dos animais coradas em H.E. representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x).....	102
FIGURA 35 -	Lâminas dos palatos dos animais coradas em PAS representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x).....	103
FIGURA 36 -	Lâminas da região do dorso lingual dos animais coradas em H.E. representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x).....	104

FIGURA 37 -	Lâminas da região do dorso lingual dos animais coradas em PAS representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x).....	105
FIGURA 38 -	Resultados das pesagens (g) dos animais na terceira etapa do Estudo I.....	106
FIGURA 39 -	Aspecto visual do palato dos animais no início do experimento e logo após o período de indução da estomatite protética para os grupos Cn (A e B), Di (C e D) e In+Dc (E e F), respectivamente.....	108
FIGURA 40 -	Aspecto visual da língua dos animais no início do experimento e logo após o período de indução da estomatite protética para os grupos Cn (A e B), Di (C e D) e In+Dc (E e F), respectivamente.....	109
FIGURA 41 -	Aspecto macroscópico das colônias encontradas nas placas de cultura após o período de indução da estomatite protética.	111
FIGURA 42 -	Placas de <i>Candida</i> CHROMagar utilizadas para identificação das colônias fúngicas.....	112
FIGURA 43 -	Lâminas histológicas representando o grupo Cn (aumento de 200x). A: Lâmina da mucosa palatal em H.E.; B: Lâmina da mucosa palatal em PAS; C: Lâmina do dorso lingual em H.E.; D: Lâmina do dorso lingual em PAS.....	113
FIGURA 44 -	Lâminas histológicas representando o grupo Di (aumento de 200x). A: Lâmina da mucosa palatal em H.E.; B: Lâmina da mucosa palatal em PAS; C: Lâmina do dorso lingual em H.E.; D: Lâmina do dorso lingual em PAS.....	114
FIGURA 45 -	Lâminas histológicas representando o grupo In+Dc (aumento de 400x). A: Lâmina da mucosa palatal em H.E.; B: Lâmina da mucosa palatal em PAS; C: Lâmina do dorso lingual em H.E.; D: Lâmina do dorso lingual em PAS.....	115
FIGURA 46 -	Fotomicroscopias obtidas dos palatos e dispositivos do grupo In+Dc após o período de indução da estomatite protética.....	116
FIGURA 47 -	Sonda esofágica utilizada para o procedimento de gavagem.....	129

FIGURA 48 - Resultados dos escores atribuídos às lâminas histológicas de cada órgão analisado.....	134
FIGURA 49 - Lâminas histológicas dos órgãos analisados coradas em H.E. (aumento de 200x).....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais características dos modelos de indução de estomatite protética descritos na Revisão de literatura.....	43
Tabela 2.	Principais características dos estudos em animais de toxicidade sistêmica à Clx descritos na Revisão de literatura.....	53
Tabela 3.	Relatos de casos de administração inadequada de Clx e seus efeitos adversos.....	56
Tabela 4.	Resultados da análise visual das placas de cultura.....	83
Tabela 5.	Recuperação de <i>C. albicans</i> a partir de coletas nos palatos dos animais (UFC/mL).....	101
Tabela 6.	Recuperação fúngica a partir de coletas nos palatos dos animais (UFC/mL).....	110
Tabela 7.	Média e desvio padrão (DP) dos pesos inicial e final (g) dos animais e do consumo de ração (g) três dias antes e 24 h após a gavagem.....	132
Tabela 8.	Valores bioquímicos plasmáticos médios após administração via gavagem de dose única de veículo (CN) ou de Clx em ratos Wistar.....	133

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	DISPOSITIVOS PALATAIS PARA RATOS.....	24
2.2	INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS.....	27
2.2.1	Em animais imunocompetentes.....	27
2.2.2	Em animais imunocompetentes sob antibioticoterapia.....	39
2.2.3	Em animais imunossuprimidos.....	41
2.3	TOXICIDADE SISTÊMICA CAUSADA PELA CLOREXIDINA.....	45
2.3.1	Estudos em animais.....	45
2.3.2	Relatos de casos em humanos.....	54
ESTUDO I – Validação de modelo de indução de candidose bucal em ratos		
Wistar imunocompetentes.....		57
3	OBJETIVOS.....	58
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	58
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
3.3	HIPÓTESES TESTADAS.....	58
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	59
4.2	CONFEÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS.....	61
4.3	ESTERILIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS.....	65
4.4	OBTENÇÃO DO INÓCULO DE <i>C. albicans</i>	67
4.5	CONTAMINAÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS.....	69
4.6	CONFIRMAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DOS DISPOSITIVOS.....	70
4.6.1	Contagem de UFC/mL.....	70
4.6.2	Análise em microscopia de varredura confocal a laser.....	70
4.7	AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DA CANDIDOSE BUCAL INDUZIDA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES.....	71
4.7.1	Análise visual.....	74
4.7.2	Contagem de UFC/mL.....	75
4.7.3	Análises histopatológicas.....	76
4.7.3.1	<i>Processamento das amostras histológicas.....</i>	<i>76</i>

4.7.3.2	<i>Obtenção das fotomicrografias e análise histopatológica descritiva.</i>	77
4.8	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA.....	78
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
5	RESULTADOS.....	82
5.1	ESTERILIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS.....	82
5.2	CONFIRMAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DOS DISPOSITIVOS.....	85
5.2.1	Contagem de UFC/mL.....	85
5.2.2	Análise em microscopia de varredura confocal a laser.....	86
5.3	AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DA CANDIDOSE BUCAL INDUZIDA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES.....	88
5.3.1	Triagem dos animais.....	88
5.3.2	Monitoramento dos animais.....	88
5.3.3	Análise visual.....	89
5.3.4	Contagem de UFC/mL.....	100
5.3.5	Análise histopatológica.....	101
5.4	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA.....	106
5.4.1	Triagem dos animais.....	106
5.4.2	Monitoramento dos animais.....	106
5.4.3	Análise visual.....	107
5.4.4	Contagem de UFC/mL.....	109
5.4.5	Análise histopatológica.....	112
5.4.6	Análise em microscopia confocal a laser.....	115
6	DISCUSSÃO.....	117
7	CONCLUSÃO.....	125
ESTUDO II – Avaliação de toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar.....		126
3	OBJETIVOS.....	127
3.1	OBJETIVO GERAL.....	127
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	127
3.3	HIPÓTESES TESTADAS.....	127
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	128

4.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	128
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	129
4.3	ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	129
4.4	OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	130
4.4.1	Processamento das amostras histológicas.....	130
4.4.2	Obtenção das fotomicrografias.....	130
4.4.3	Análise histopatológica.....	130
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	131
5	RESULTADOS.....	132
5.1	MONITORAMENTO DOS ANIMAIS.....	132
5.2	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	132
5.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	133
6	DISCUSSÃO.....	136
7	CONCLUSÃO.....	139
	REFERÊNCIAS.....	140
	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).....	153
	ANEXO B - Protocolo de processamento histológico (histotécnico) – UEPG	155
	ANEXO C - Protocolo de uso da máquina inclusora de parafina – UEPG.....	156
	ANEXO D - Protocolo de coloração Hematoxilina – Eosina (H.E.) (AFIP/USA) – UEPG.....	157
	ANEXO E - Protocolo de coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) - UEPG.....	158

1 INTRODUÇÃO

A candidose bucal é considerada a infecção fúngica mais frequente entre humanos¹ e quando associada à utilização de próteses removíveis é denominada estomatite protética;² lesão que apresenta altas taxas de recidiva.³ Sua etiologia compreende diversos fatores locais e sistêmicos, como má higienização e uso noturno das próteses, trauma local causado por próteses mal adaptadas, hipossalivação, deficiências nutricionais, quadros de imunossupressão, alterações endócrinas, dentre outros.³⁻⁷ Apesar da etiologia multifatorial, considera-se que seu principal fator causal é a infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*.^{4,8}

Clinicamente, a estomatite protética ou candidose crônica atrófica apresenta diferentes manifestações, classificadas por Newton⁹ como: hiperemia puntiforme ou inflamação localizada na região dos ductos das glândulas salivares palatinas menores (tipo I); hiperemia difusa e mucosa palatal lisa e atrófica envolvendo toda a região recoberta pela prótese (tipo II); e hiperplasia papilar na região central do palato (tipo III).^{4,5} Ainda que raramente cause dor ou desconforto, a sua progressão pode resultar em infecções sistêmicas,⁵ as quais podem dificultar ainda mais seu tratamento.¹⁰ Diversas modalidades terapêuticas têm sido propostas na literatura, incluindo melhoria na higiene bucal e na higienização das próteses, substituição, adequação e/ou reembasamento das próteses, interrupção do uso noturno, terapia antifúngica tópica e/ou sistêmica, laserterapia, terapia fotodinâmica e combinações desses tratamentos.^{3,5-7} Além de não haver evidências da superioridade de um método sobre o outro,⁷ algumas limitações estão relacionadas à necessidade de gastos com a medicação, sabor desagradável do medicamento,¹¹ rigor na administração da posologia¹² e principalmente o uso contínuo das próteses contaminadas. Ademais, é difícil manter a concentração efetiva dos fármacos nos tecidos infectados em decorrência do fluxo salivar, dos movimentos da língua¹³ e da deglutição, que rapidamente os dissolvem e os eliminam da cavidade bucal.¹⁴

Uma alternativa de tratamento que vem sendo proposta é a incorporação de fármacos antifúngicos em materiais condicionadores de tecidos e reembasadores resilientes.^{12,15,16} Tal modificação nesses materiais resultaria em diversos benefícios, como aumento na longevidade clínica, redução do trauma local e eliminação do contato da superfície interna contaminada das próteses com os tecidos bucais e, conseqüentemente, do ciclo de reinfecção, ação dos fármacos incorporados ao

material diretamente sobre os tecidos infectados, reduzida frequência de aplicação¹² e redução da necessidade de participação dos pacientes durante o tratamento.¹¹ Estudos anteriores avaliaram o efeito da incorporação de fármacos antifúngicos comumente utilizados no tratamento da estomatite protética, nistatina (Nis), miconazol, cetoconazol, itraconazol e diacetato de clorexidina (Clx), sobre algumas propriedades físicas e mecânicas de materiais macios temporários para base de prótese, um condicionador de tecido e um reembasador resiliente. Nestas avaliações, os fármacos Nis e Clx, liberados a partir destes materiais, foram altamente efetivos durante 14 dias na inibição do crescimento de biofilme de *C. albicans* em valores mais baixos de concentrações inibitórias mínimas¹⁵ em relação aos demais fármacos avaliados e, como consequência, não resultaram em alterações consideradas significantes nas propriedades de dureza e rugosidade,¹⁷ sorção de água e solubilidade,¹⁸ porosidade,¹⁹ resistência à tração²⁰ e resistência da união ao descolamento à resina acrílica para base de prótese.²¹

Anteriormente à realização de ensaios clínicos em humanos utilizando esses materiais modificados, faz-se necessário comprovar a efetividade e, principalmente, a segurança dos mesmos.²² No entanto, para isso seria necessário estabelecer um modelo in vivo de estomatite protética. Inúmeros protocolos utilizando ratos Wistar estão disponíveis na literatura,²³⁻³⁴ porém, não há consenso sobre um método que induza e mantenha a infecção durante um período suficiente para a avaliação da efetividade de novos materiais e fármacos. Alguns estudos induziram a candidose bucal por meio da inoculação do fungo diretamente na cavidade bucal dos animais,³⁵⁻³⁸ outros, via dispositivos intra-orais.^{25,34,39} Também não há consenso sobre a necessidade de induzir imunossupressão no animal previamente à inoculação da *Candida* spp. Visto que não há evidência científica de que a estomatite protética está associada com uma infecção invasiva em humanos, alguns modelos experimentais utilizam animais saudáveis, não imunossuprimidos, possibilitando a participação da resposta imune do hospedeiro durante a colonização da mucosa superficial do rato com *Candida*.^{25,29-34}

Outra dificuldade relacionada à determinação da segurança do material modificado é a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos sistêmicos provocados pela deglutição das doses liberadas dos antifúngicos, especialmente a Clx. A literatura descreve que a Clx é pobremente absorvida pelo trato gastrointestinal, muito bem tolerada quando administrada por via intravenosa e que sua absorção pela pele é

praticamente mínima.⁴⁰⁻⁴² Contudo, com base em estudos em animais, em determinadas concentrações, a Clx pode causar efeitos adversos como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade,⁴³ perda de peso e desidratação,⁴⁴ irritabilidade e alteração na fertilidade,⁴⁵ danos a nervos adrenérgicos,⁴⁰ problemas respiratórios, edema e hemorragia pulmonar⁴² e danos ao DNA.⁴⁶ Em humanos, as reações observadas devido ao uso indevido da Clx incluem choque anafilático, dermatites e estomatites,⁴⁷ edema faríngeo, lesões necróticas no esôfago e dano hepático agudo,⁴¹ gastrite,⁴⁸ síndrome do desconforto respiratório agudo,⁴⁹ e até mesmo parada cardíaca.⁵⁰ A preocupação acerca de sua toxicidade é recorrente, no entanto, a grande diversidade de metodologias empregadas para investigar seu potencial tóxico dificulta a determinação dos seus efeitos colaterais.

Dada a problemática exposta, esta Dissertação visou validar um modelo de indução de estomatite protética e avaliar a toxicidade sistêmica aguda provocada pela administração via gavagem de doses tóxicas de Clx em ratos Wistar, previamente à avaliação de tratamento alternativo para a estomatite protética utilizando dispositivos palatais reembasados com condicionador de tecido modificado pela adição dos fármacos Nis e Clx nas suas concentrações inibitórias mínimas ao biofilme de *C. albicans* (32 mg de Nis e 64 mg de Clx para cada g do material reembasador). Desta forma, esta Dissertação foi dividida em duas partes distintas: Estudo I – Validação de modelo de indução de candidose bucal em ratos Wistar imunocompetentes; e Estudo II - Avaliação da toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O levantamento bibliográfico deste trabalho teve como bases de dados o *Pubmed*, *Scielo*, *Lilacs*, *Bireme ProQuest* e o *ScienceDirect*. Para o Estudo I, foram selecionados trabalhos que descreveram o desenvolvimento de dispositivos palatais para ratos (item 2.1) e trabalhos de indução de estomatite protética em ratos imunocompetentes (item 2.2.1), imunocompetentes sob antibioticoterapia (item 2.2.2) e imunossuprimidos (item 2.2.3), utilizando os termos: *palate*, *rat* e *candidosis*. Para a revisão referente ao Estudo II, buscou-se artigos que avaliaram a toxicidade sistêmica da Clx em animais (item 2.3) e em humanos (item 2.4), utilizando as palavras chave: *toxicological*, *studies*, *chlorhexidine*, *hibitane*, *toxicity* e *safety*. Para ambos os levantamentos, as palavras chave foram empregadas isoladamente ou de forma cruzada, abrangendo o período de 1973 a 2016.

2.1 DISPOSITIVOS PALATAIS PARA RATOS

Jennings e MacDonald⁵¹ (1990) objetivaram confeccionar dispositivos palatais individualizados para avaliar a viabilidade de utilização dos mesmos para a realização de estudos in vivo em ratos Wistar. Para tal, nove animais foram divididos em dois grupos: controle (n=3) e experimental (n=6). Foram feitas moldagens dos palatos dos animais com polissulfeto e os dispositivos de resina acrílica termopolimerizável foram confeccionados a partir dos modelos vazados para cada animal. 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 dos dentes. A banda foi preenchida por resina acrílica autopolimerizável; o dispositivo foi posicionado nos incisivos e, então, pressionado contra o palato durante a polimerização do material. Os animais experimentais e controles utilizaram os dispositivos por 28 dias e, então, foram eutanasiados. Quando os dispositivos foram removidos, quantidade significativa de debris foi encontrada entre eles e o epitélio da mucosa palatal. As lâminas histológicas do palato dos ratos foram coradas com hematoxilina-eosina (H.E.). O exame microscópico revelou que o material acumulado sob os dispositivos era queratina descamada e debris alimentares. O epitélio dos palatos do grupo experimental apresentava-se mais espesso do que o do grupo controle. No entanto, houve considerável variação entre os cortes devido à angulação dos mesmos. Com isso, cinco animais controle adicionais foram eutanasiados e tiveram seus palatos

descalcificados e processados para análise histológica. Ao se padronizar o protocolo de inclusão e de microtomia dos blocos, foi possível realizar análise quantitativa com resultados consistentes. Os autores constataram que os dispositivos podem ser utilizados satisfatoriamente por 28 dias, mas que o acúmulo de restos alimentares entre eles e o palato poderia ser um problema.

Barclay e colaboradores⁵² (1997) examinaram as alterações histológicas na mucosa palatina de ratos Wistar decorrentes do uso de dispositivos acrílicos. Os 48 animais utilizados foram divididos em 3 grupos (n=16) com alimentação diversa; 1. ração sólida convencional; 2. ração pastosa, na qual foi adicionada água ao pó da ração; e 3. dieta líquida, na qual 20 g do pó da ração eram misturados a 80 mL de água. Dentro de cada grupo, cinco animais foram mantidos como controle sem o uso de dispositivos, dez tinham os dispositivos instalados e um era mantido como potencial substituto, caso algum animal viesse a ser excluído da amostra. Os animais que receberam os dispositivos ainda foram divididos em dois subgrupos, um utilizou os dispositivos por sete dias (n=5) e o outro, por 14 (n=5). Moldeiras individuais foram confeccionadas a partir de um modelo de gesso pedra obtido por meio da moldagem preliminar de um rato utilizado em um experimento prévio. A alimentação dos animais iniciou-se no dia 0 do experimento. No sétimo dia, realizou-se a moldagem do palato dos ratos com polissulfeto. Foi realizado um enceramento sobre os modelos de gesso obtidos, recobrando o palato duro e os molares superiores com extensão para suas faces vestibulares. Uma banda de 4 mm de espessura de aço inoxidável foi colocada na região dos incisivos superiores e fios de aço inoxidável de 0,5 mm de espessura foram soldados para unir essa porção ao resto do aparato. Os dispositivos foram, então, confeccionados com resina acrílica termopolimerizável e mantidos por 24 h em água para eliminação do monômero residual. No 14º dia do experimento, um desgaste na região disto-lingual dos incisivos foi realizado com broca de aço carbono e os dispositivos foram cimentados com resina acrílica autopolimerizável, a qual foi inserida na banda metálica. Passados os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados e tiveram seus palatos descalcificados e processados para análise histológica. As lâminas obtidas foram coradas com H.E. Os campos selecionados para análise padronizada foram correspondentes à região sobre o feixe vâsculo-nervoso do palato. Os animais que receberam dieta pastosa foram os que demonstraram menor acúmulo de debris

alimentares, sem variações significativas de peso entre aqueles que utilizaram os dispositivos e os animais 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 concluem sugerindo que a dieta pastosa seria mais indicada para estudos que envolvem o uso de dispositivos palatais em animais.

Visando confeccionar um dispositivo acrílico para roedores que fosse removível e de baixo custo, Lee et al.⁵³ (2011) desenvolveram um aparato composto por duas porções: uma fixa e uma removível. Sob anestesia, ratos Wistar foram moldados utilizando silicone polimerizado por adição de consistência leve, o qual foi dispensado diretamente sobre o palato e molares superiores. Os dispositivos foram confeccionados a partir dos modelos de gesso tipo III obtidos após a moldagem. A parte fixa do dispositivo foi confeccionada na região posterior do palato utilizando resina acrílica autopolimerizável, tomando-se o cuidado de não recobrir as superfícies oclusais dos molares. Dois ímãs foram incluídos na porção fixa, os quais foram ligados a tiras de aço que, por sua vez, foram incluídas na parte removível do dispositivo, formando uma única estrutura. Fios de ligadura ortodôntica foram colocados nos espaços interproximais entre os primeiros e segundos molares tanto do lado direito quanto do lado esquerdo, para fornecer mais estabilidade. A parte fixa foi, então, posicionada sobre o palato dos animais sedados e cimentada com resina acrílica autopolimerizável sobre as oclusais dos molares. A parte removível foi instalada em seguida, por meio do encaixe dos ímãs à parte fixa. Os animais permaneceram com os dispositivos por quatro semanas. Todos os ratos mantiveram o peso corporal durante esse período, sendo que o peso da maioria dos animais aumentou com o passar do tempo. Visando a redução do acúmulo de restos alimentares, os animais passaram a receber uma dieta gel e, mesmo assim, o peso manteve-se ou até mesmo aumentou. Os dispositivos mantiveram sua integridade e durabilidade por mais de oito semanas. Se algum fragmento da porção fixa fosse perdido, era reparado com resina acrílica autopolimerizável. Os autores também observaram que os dispositivos não comprometeram as atividades normais dos animais.

O estudo realizado por Hotta et al.^{54,55} (2017) avaliou a biocompatibilidade in vivo de um material reembasador provisório para próteses removíveis (Trusoft)

modificado pela adição de fármacos antifúngicos em suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) ao biofilme de *C. albicans*. Ratos machos Wistar (n=60) foram divididos em seis grupos: PC (controle positivo, sem dispositivo intra-oral); IOD (com dispositivo, sem material reembasador); Tru (com dispositivo e material reembasador, sem adição de fármaco); Chx; Ny e Ke (com dispositivo e material reembasador modificado com as CIMs da clorexidina, nistatina e cetoconazol, respectivamente). Os ratos foram eutanasiados e avaliados após 7 e 14 dias de experimento. Para a avaliação da biocompatibilidade, a análise histológica foi realizada avaliando de forma quantitativa e qualitativa parâmetros do epitélio, tecido conjuntivo e tecido ósseo dos palatos dos ratos. A análise quantitativa mostrou que os animais dos grupos Chx e Ny não apresentaram alterações significativas nos parâmetros avaliados em comparação ao grupo Controle Positivo. No entanto, para o grupo Ke, houve redução significativa da espessura da queratina, sendo esses dados confirmados pela análise qualitativa. Apesar das limitações do estudo, os resultados sugerem a biocompatibilidade do material reembasador modificado por clorexidina ou nistatina em suas CIMs ao biofilme de *C. albicans*.

2.2 INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS

2.2.1 Em animais imunocompetentes

Com a intenção de investigar o padrão inflamatório causado pelo uso de dispositivos maxilares com e sem a inoculação de *C. albicans*, Olsen e Bondevik²⁹ (1978) utilizaram 38 ratos Wistar, os quais foram divididos em dois experimentos. Cada experimento teve duração de duas semanas e contou com um grupo controle e três experimentais, sendo que em um deles os animais receberiam dispositivos palatais acrílicos, no outro, os animais seriam inoculados com 30 mg de uma suspensão de *C. albicans* e, no último, os animais receberiam dispositivos com o inóculo aplicado sobre a sua porção interna. Todos os dispositivos foram removidos ao final da primeira semana e reinstalados logo em seguida. No início do experimento e no momento de retirada para recimentação dos aparatos, esfregaços foram realizados com uma espátula metálica sobre os palatos dos animais e superfície interna dos dispositivos. O material coletado foi fixado imediatamente e corado com PAS para a verificação de leveduras. O aspecto clínico foi avaliado com a atribuição de escores e, ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e tiveram a mucosa palatal removida e dividida ao meio, sendo uma metade corada

com H.E. e a outra com PAS. Antes do experimento propriamente dito, 30 dos 38 animais utilizados apresentavam *C. albicans* em seus palatos. No início do experimento, pequenas quantidades de blastóporos puderam ser observadas ao se realizar o esfregaço. No decorrer do estudo, pôde-se observar a transformação desses blastóporos em hifas, achado mais pronunciado no grupo dispositivo com inoculação. Discreta inflamação generalizada foi observada ao final da primeira semana, sendo mais intensa e persistente nos animais que receberam o dispositivo com a inoculação de *Candida*. As alterações histológicas também foram mais notáveis nesse grupo, incluindo 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.³⁰ (1981) realizaram dois experimentos objetivando desenvolver um modelo de estomatite protética em ratos Wistar. O primeiro contou com a utilização de 53 animais, os quais foram divididos em 4 grupos: 1. instalação de um dispositivo acrílico e inoculação de uma suspensão de 30 mg de *C. albicans* sorotipo A sobre o palato dos animais e sobre a superfície interna dos dispositivos antes da cimentação (n=25); 2. instalação de dispositivo acrílico sem a inoculação de *C. albicans* (n=12); 3. inoculação de 30 mg de uma suspensão de *C. albicans*, sem a instalação de dispositivo (n=8); 4. controle, nenhum procedimento realizado (n=8). Os animais de cada grupo foram divididos e eutanasiados 1, 2, 4 e 6 semanas após a realização dos procedimentos. No segundo experimento, vinte e quatro animais foram divididos em dois grupos, sendo que um deles correspondia ao grupo 1 do primeiro experimento e o outro correspondia ao grupo 2. Os animais permaneceram com os dispositivos em posição por 4 semanas e, então, nove animais (5 inoculados e 4 não inoculados) foram eutanasiados. Após duas semanas, realizou-se a eutanásia dos 11 animais remanescentes. Imediatamente após a eutanásia, material do palato dos animais foi coletado com *swabs* estéreis e semeado em ágar Sabouraud. Os cortes histológicos foram corados com H.E. e PAS. O palato dos animais dos grupos 2, 3 e 4 do primeiro experimento apresentaram aspecto clínico e histológico de normalidade. Os animais pertencentes ao grupo 1 exibiram eritema localizado na região intermolares ao final da primeira semana. Microscopicamente, infiltrado inflamatório difuso composto principalmente por neutrófilos e áreas de colonização por blastóporos na superfície do epitélio foram observados. 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, mas também havia 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. Durante as quatro primeiras semanas do segundo experimento, três animais perderam os dispositivos, sendo que dois deles pertenciam ao grupo inoculado com *Candida*. Os animais eutanasiados ao final da quarta semana apresentavam as mesmas características dos animais utilizados no primeiro experimento. Não foram encontradas alterações clínicas e histológicas nos palatos dos animais que permaneceram duas semanas sem os dispositivos, apesar de ainda ter sido possível recuperar *C. albicans*.

Em outro trabalho, Shakir et al.³¹ (1983) compararam a efetividade de *C. glabrata*, duas cepas diferentes de *C. tropicalis* e dos sorotipos A e B de *C. albicans* na indução de candidose palatal em ratos Wistar. Os 35 animais foram divididos em 5 grupos (n=7), sendo que cada um deles recebeu aproximadamente 30 mg de uma suspensão aquosa de uma das cinco cepas. A concentração da suspensão era de aproximadamente 3×10^{20} blastóporos/mg. Cinco animais de cada grupo tiveram um dispositivo palatal instalado assim como descrito por Shakir et al.³⁰ (1981), enquanto os outros dois mantiveram-se sem o aparato. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Duas semanas após a inoculação, os animais foram eutanasiados e tiveram seus palatos removidos para análise histológica. As amostras de tecido foram examinadas verificando a presença de invasão fúngica superficial no epitélio, hiperplasia ou atrofia epitelial e inflamação. Antes do experimento e imediatamente após a eutanásia, swabs estéreis foram esfregados nos palatos dos animais e inoculados em ágar Sabouraud e as placas de cultura foram incubadas a 37°C por 36 h. Não foram notadas alterações no palato dos animais que não utilizaram os dispositivos. Resultados semelhantes a esse foram observados nos animais que foram inoculados com as duas cepas de *C. tropicalis* e com *C. glabrata* e que receberam os dispositivos. Em contraste, 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 dos animais que foram 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. Em contraste, *C. tropicalis* e *C. glabrata* só foram recuperadas de animais que utilizaram os dispositivos. Os autores sugerem uma maior patogenia do sorotipo A em relação ao B de *C. albicans*.

Buscando desenvolver uma modalidade de tratamento para a estomatite protética, Lamb e Martin²⁷ (1983) incorporaram acetato de Clx a uma resina acrílica autopolimerizável, a qual foi utilizada para confeccionar dispositivos palatais para ratos Wistar. Os autores optaram por seguir o protocolo proposto por Shakir et al.³⁰ para a indução da doença nos animais. Primeiramente, verificou-se a capacidade de liberação do fármaco após a incorporação ao polímero da resina nas concentrações de 2,5%, 5%, 7,5% e 10%. Corpos de prova foram confeccionados, imersos em 20 mL de água e incubados a 37°C por 3 dias. Passado esse período, os discos foram removidos, secos com papel filtro e imersos novamente em água, dessa vez, por 4 dias. Na sequência, o processo foi repetido e os corpos de prova foram imersos em água por 7 dias, até o período total de 21 dias. A água na qual os corpos de prova ficaram imersos foi utilizada para a verificação da atividade antifúngica pelo teste de difusão em ágar. Cerca de 1×10^6 de blastóporos de *C. albicans* foram inoculados em placas com meio de cultura ágar *Yeast Nitrogen Base* (YNB), nas quais foram confeccionados poços de 10 mm de diâmetro. O interior dos poços foi preenchido com a água residual dos discos de resina acrílica e as placas foram incubadas por 72 h a 30°C. A média de três mensurações dos halos de inibição formados foi calculada para cada amostra de água, e a concentração inibitória mínima da Clx foi determinada a partir desses resultados. Com isso, passou-se para o experimento in vivo, que contou com duas etapas. A primeira tinha como objetivo verificar o potencial preventivo dos dispositivos com Clx incorporada. Foram utilizados 10 ratos Wistar, sendo que cinco receberam os dispositivos com e cinco, sem Clx. Todos os animais foram inoculados com *C. albicans* e eutanasiados após quatro semanas. A segunda etapa analisou a capacidade curativa da Clx. Para tal, dez animais

receberam dispositivos acrílicos sem Clx e foram, então, inoculados com *C. albicans*. Depois de 4 semanas, quando a estomatite protética estava estabelecida, cinco desses animais tiveram os dispositivos substituídos por outros, os quais possuíam Clx incorporada. Os animais permaneceram com os aparatos por mais quatro semanas, quando todos foram eutanasiados. Em ambas as etapas, lâminas dos palatos foram coradas com H.E. e PAS. Antes da instalação dos dispositivos e ao final do experimento, *swabs* estéreis foram esfregados nos palatos dos animais e o conteúdo foi semeado em ágar Sabouraud por 48 h a 37°C. As únicas concentrações de Clx que apresentaram atividade antifúngica após o período de 3 semanas de imersão em água foram as de 7,5% e 10%. Com isso, a concentração de 7,5% foi selecionada para o experimento in vivo. Na avaliação da ação profilática da Clx, não foi possível recuperar *C. albicans* dos animais que receberam os dispositivos com o fármaco incorporado. Histologicamente, o palato desses animais apresentava-se normal. No entanto, os animais desse grupo apresentaram perda de peso e redução no consumo de ração. O grupo que recebeu os dispositivos convencionais apresentou epitélio hiperplásico e infiltrado inflamatório, além da penetração de hifas. Resultados similares foram encontrados na verificação da capacidade curativa da Clx. Assim que os dispositivos com o fármaco adicionado foram instalados, os animais pararam de comer e começaram a perder peso. Ao terem os dispositivos substituídos, esses animais não apresentaram alterações histológicas nos palatos e não foi possível recuperar colônias de *C. albicans*. Os animais que permaneceram com os dispositivos convencionais apresentaram as mesmas características do mesmo grupo no experimento da avaliação preventiva. Os autores consideraram adequado o modelo de estomatite protética utilizado e atribuíram a perda de peso e redução no consumo de ração ao gosto desagradável da Clx.

Também objetivando encontrar uma alternativa terapêutica para a estomatite protética, Norris e colaboradores²⁸ (1985) incorporaram nitrato de miconazol 10% a uma resina acrílica autopolimerizável utilizada para confecção de dispositivos palatais para ratos Wistar. A indução de estomatite protética deu-se seguindo o modelo proposto por Shakir et al.,³⁰ no qual 30 mg de uma suspensão de 5×10^8 de blastóporos de *C. albicans* foram aplicados na superfície interna dos dispositivos antes da instalação dos mesmos. Assim como no estudo de Lamb e Martin,²⁷ esse

trabalho avaliou a capacidade preventiva e curativa do uso dos dispositivos com miconazol incorporado. Para a análise do potencial preventivo, vinte e seis ratos Wistar receberam dispositivos com o inóculo de *C. albicans*, sendo 14 dispositivos com e 12 sem miconazol adicionado. Os animais permaneceram com os dispositivos na cavidade bucal por 4 semanas. Após esse período, os aparatos foram removidos e *swabs* estéreis foram esfregados nos palatos dos animais, que em seguida foram eutanasiados. Para a avaliação do efeito curativo dos dispositivos com miconazol, trinta e sete animais utilizaram dispositivos convencionais com o inóculo de *Candida* por 4 semanas, até o desenvolvimento da estomatite protética. Na sequência, cinco animais foram eutanasiados como controles e os remanescentes receberam novos dispositivos com o inóculo de *C. albicans*, sendo que 16 deles possuíam miconazol incorporado e 14 não. Após 4 semanas, os dispositivos foram removidos; foi coletado material dos palatos utilizando *swabs* estéreis e os animais foram então eutanasiados. O conteúdo coletado pelos *swabs* foi semeado em placas com ágar Sabouraud, que foram mantidas em estufa por 72 h a 37°C. As lâminas dos palatos foram coradas com H.E. e PAS. Ao total, treze dispositivos foram perdidos, sendo 9 com miconazol adicionado (5 na análise preventiva e 4 na curativa) e 4 convencionais (1 na avaliação preventiva e 3 na curativa). No estudo da prevenção da estomatite protética, os animais que utilizaram os dispositivos com miconazol não apresentaram sinais da doença, enquanto aqueles que receberam os dispositivos convencionais mostraram evidências nítidas de candidose. Na avaliação da capacidade curativa dos dispositivos com miconazol, nenhum dos animais que utilizou os dispositivos modificados apresentou sinais de estomatite protética, apesar de ter sido possível recuperar *C. albicans* de um deles. Quase metade dos animais que recebeu os dispositivos convencionais mostrou sinais da doença.

Visando verificar a capacidade de *C. albicans* em mudar da forma comensal para a patogênica, Shakir e colaboradores³² (1986) utilizaram 20 ratos Wistar, os quais foram divididos em dois grupos (n=10), sendo que ambos receberam um dispositivo acrílico. No grupo I, a mucosa palatal e a superfície interna do aparato foram inoculadas com aproximadamente 30 mg de uma suspensão de *C. albicans* 3091 (sorotipo A), a qual continha aproximadamente 3×10^{20} blastóporos/mg; no grupo II, os animais receberam dispositivos sem a inoculação do fungo. Os animais utilizaram os dispositivos por 2 semanas e, então, ficaram sem os mesmos por mais

2 semanas. Ao final desse período, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados. Dois animais foram retirados da amostra, visto que um morreu durante o procedimento anestésico e outro perdeu o dispositivo. Os 10 animais restantes (5 de cada grupo) tiveram os dispositivos novamente instalados, no entanto, sem nova inoculação de *Candida*. Os dispositivos permaneceram em posição por mais 2 semanas. Passado esse intervalo, os animais foram eutanasiados e tiveram seus palatos examinados macroscopicamente, microscopicamente e microbiologicamente. Após 2 semanas, o palato dos animais do grupo I apresentavam evidências macroscópicas de candidose, consistindo de áreas eritematosas difusas na região intermolares. Os quatro animais que não foram inoculados não apresentavam sinais inflamatórios duas semanas depois da remoção dos dispositivos. Contrariamente, os cinco 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. A mucosa palatal dos animais que receberam os dispositivos sem a inoculação de *Candida* não apresentou alterações, em nenhum dos períodos estudados. Foi possível recuperar *C. albicans* dos animais que foram inoculados, tanto no grupo que teve os dispositivos removidos, quanto no grupo no qual os dispositivos foram reinstalados. Tais dados sugerem que *C. albicans* foi capaz de mudar da forma comensal para a patogênica ao ocorrer a readaptação do dispositivo.

Em outro estudo publicado no mesmo ano, Shakir et al.³³ (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*. Foram utilizados 35 animais, dos quais 15 receberam os dispositivos e foram inoculados com *C. albicans* da mesma forma descrita por Shakir et al.,³⁰ quinze tiveram dispositivos instalados sem a inoculação do microrganismo e cinco serviram como controle, sendo eutanasiados no início do experimento. Cinco animais de cada grupo experimental foram eutanasiados 1, 2 e 4 semanas após a instalação dos aparatos, sendo que todos foram injetados intraperitonealmente com uma solução aquosa de sulfato de vimblastina na concentração de 1 mg/Kg horas antes da eutanásia. A mucosa palatal foi removida e a região entre a primeira e a segunda rugas menores foi utilizada para contagem de células. Os tecidos removidos foram brevemente imersos

em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9%, colocados sobre papel filtro para remoção da umidade e então fixados por 2 h em uma mistura de 10% de formaldeído, 5% de ácido acético e 85% de metanol antes de serem submetidos à análise em microscópio de luz. Para a contagem de células, dez cortes de cada animal foram corados com H.E., sendo que dois campos de cada foram aleatoriamente selecionados para a quantificação. Após uma semana de uso dos dispositivos, a espessura do epitélio palatal reduziu em ambos os grupos experimentais, sem diferenças significativas entre eles. Com 4 semanas de uso, a espessura do epitélio dos animais que foram inoculados estava maior do que a dos animais controle. Ao final da primeira semana, a atividade mitótica reduziu significativamente nos dois grupos que receberam dispositivos, sem diferenças entre ambos. 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 o padrão elevado de atividade mitótica.

O efeito da *C. albicans* sobre a permeabilidade do tecido palatal de ratos Wistar foi investigado por Martin e colaboradores (1987).⁵⁶ Para a realização do experimento, os animais receberam dispositivos palatais acrílicos, os quais cobriam os palatos e eram fixados sobre os incisivos superiores utilizando resina acrílica autopolimerizável. Anteriormente à instalação dos aparatos, alguns animais foram inoculados com aproximadamente 30 mg de *C. albicans* diretamente sobre o palato e superfície interna dos dispositivos. Os grupos experimentais consistiram de animais que foram contaminados apenas uma vez com o inóculo (n=5), dispositivos inoculados por duas semanas e mantidos em posição até o fim do experimento (n=2), dispositivos inoculados por duas semanas e então desinstalados por 2 (n=3), 4 (n=3) ou 8 semanas (n=2) até a eutanásia. Previamente à realização da eutanásia, os ratos foram anestesiados e, caso o dispositivo ainda estivesse presente, este era removido. Em seguida, a veia jugular dos animais era exposta e uma cânula era inserida e mantida em posição. A partir dessa cânula, os animais foram perfundidos com 0,15 M de cloreto de sódio por 5 minutos. Passado esse tempo, 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 por mais 15 minutos. Feito isso, a mucosa palatal era removida e fixada em glutaraldeído e tampão cacodilato por 2 h para posterior preparo para análise em microscopia eletrônica de

varredura (MEV). Animais adicionais foram submetidos aos mesmos procedimentos de indução de estomatite protética para a determinação das proteínas capazes de transudar o epitélio palatal por meio de eletroforese em gel. 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.

Martin⁵⁷ (1989) avaliou a eficácia do fluconazol e cetoconazol no tratamento da estomatite protética induzida em ratos Wistar. O estudo consistiu de 16 grupos contendo 14 animais cada, sendo 8 grupos utilizados para avaliar a efetividade dos fármacos e 8 para verificar a ocorrência de recidivas duas semanas após o fim do tratamento. Em cada grupo, o palato de 3 animais foi inoculado com 30 mg de *C. albicans*, enquanto outros 2 animais também foram inoculados e serviram como controles; sendo um deles tratado com o antifúngico e o outro sem receber nenhum tratamento. Os 9 animais remanescentes receberam dispositivos acrílicos que cobriam a mucosa palatal, sendo que desses, seis foram inoculados com 30 mg de *Candida* anteriormente à instalação dos aparatos e três não. Os animais permaneceram com os dispositivos em posição por 14 dias, até o desenvolvimento da infecção, quando então se deu início o tratamento. Cinco dos seis animais que utilizaram os dispositivos com *Candida* foram tratados diariamente com um dos antifúngicos administrados via gavagem. O animal remanescente foi tratado apenas com o veículo dos fármacos. O fluconazol foi administrado nas concentrações de 0,1, 0,5, 0,75 e 1 mg/Kg, enquanto as concentrações de cetoconazol foram de 3, 5, 6 e 7 mg/Kg. Após 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram a quantidade de colônias/cm² do tecido palatal calculada. Na sequência, o palato, rins, fígado, pulmões e baço dos animais foram removidos e analisados histologicamente nas colorações de H.E. e PAS. Os palatos dos animais que receberam as doses de 0,75 e 1 mg/Kg de fluconazol apresentaram espessura epitelial semelhante à dos

animais controle. Nessas concentrações, não se observaram alterações histológicas e nem foi possível recuperar colônias de *C. albicans*. Para o tratamento com cetoconazol, somente a dose de 7 mg/Kg foi capaz de eliminar sinais clínicos e histológicos da doença. Apenas as doses de 0,75 e 1 mg/Kg de fluconazol e de 7 mg/Kg de cetoconazol foram eficazes na prevenção da ocorrência de recidivas. A administração de ambos os fármacos não causou alterações nos órgãos avaliados.

Jennings e MacDonald (1992)²⁴ realizaram análises histológicas quantitativas das alterações no epitélio palatal de ratos com e sem a inoculação de *C. albicans* anteriormente à instalação de dispositivos acrílicos. Para tal, trinta e sete ratos Wistar foram divididos em um grupo controle (n=7) e dois grupos experimentais (n=15). O primeiro grupo experimental recebeu dispositivos mucossuportados, enquanto os dispositivos do segundo grupo tiveram sua extensão aumentada, cobrindo os molares pelas faces oclusal e vestibular. Os palatos dos animais foram moldados com polissulfeto e os dispositivos foram confeccionados com resina acrílica termopolimerizável e apresentavam uma banda metálica ao redor dos incisivos superiores. Metade dos animais de cada grupo experimental recebeu um inóculo de 60 mg de *C. albicans*, o qual foi aplicado sobre a superfície interna dos dispositivos. Para a inserção dos dispositivos, os animais foram sedados, receberam um desgaste na face distal dos incisivos para melhorar a sua retenção e a banda metálica foi, então, cimentada com resina acrílica autopolimerizável. Um total de sete animais dos grupos experimentais não se recuperou da anestesia ou morreu dentro de 24 h após o procedimento. Os dispositivos de 13 animais desadaptaram nos primeiros dias após a instalação e foram reinstalados. Os animais receberam dieta sólida convencional e água *ad libitum*. Passado o período de 28 dias, os animais foram eutanasiados e tiveram seus palatos processados para análise histológica. As lâminas foram coradas com H.E. e PAS para os animais que receberam o inóculo de *C. albicans*. Quantidade significativa de debris alimentares foi encontrada após a remoção dos dispositivos, porém, tal achado foi nitidamente menor no grupo dentossuportado. Os ratos perderam peso durante as duas primeiras semanas do experimento, mas depois ganharam peso e apresentaram peso superior ao inicial no momento da eutanásia. A coloração de 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 da 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*.

Propondo desenvolver um modelo animal para estudar a imunopatogênese da estomatite protética, Johnson e colaboradores (2012)²⁵ utilizaram dispositivos intra-orais com porções fixas e removíveis, obtidos por meio de moldagens individuais de ratos Wistar machos imunocompetentes. Para induzir a infecção, os animais foram inoculados com *C. albicans* na forma de suspensão líquida e também na forma de pasta, com leveduras sedimentadas. Os grupos controles consistiram de animais não inoculados e sem dispositivo; animais não inoculados e com dispositivo; e animais inoculados e sem dispositivo. Para quantificar o crescimento fúngico, os animais eram anestesiados e as porções removíveis dos dispositivos eram retiradas para coleta de material entre o palato e o dispositivo. A análise do crescimento fúngico se deu de forma quantitativa, em meio de cultura (log UFC/swab), e também qualitativamente, utilizando escores visuais (0: sem inflamação; 1: eritema localizado; 2: eritema difuso e edema e 3: eritema ou edema difuso com hiperplasia papilar). Os palatos dos animais foram analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de varredura confocal a laser e em microscopia de luz, utilizando a coloração H.E. Para isso, os dispositivos eram removidos e grupos de animais eram eutanasiados a cada duas semanas, durante oito semanas. As suspensões líquidas de *Candida* nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC em 100 μ L mostraram-se insuficientes para a colonização dos palatos, tendo as pastas de leveduras sedimentadas de 25 mg ($\cong 5 \times 10^9$ UFC) e 50 mg ($\cong 1 \times 10^{10}$ UFC) mostrado os níveis mais altos de colonização ($\cong \log 7$ UFC/swab) após 14 dias da inoculação. Os ratos dos grupos controle que não receberam inoculações não apresentaram sinais clínicos e histológicos de colonização, independente de utilizarem ou não os dispositivos. Aqueles que receberam as inoculações e não utilizavam os dispositivos apresentaram níveis de colonização mais baixos ($< \log 3$ UFC/swab). Após determinarem as condições ideais para colonização fúngica, passou-se a estudar a formação de biofilme e sinais

clínicos de estomatite protética. Amostras dos dispositivos e palatos dos animais que receberam 50 mg da pasta foram coletadas e analisadas 2, 4, 6 e 8 semanas pós-inoculação. As análises em MEV e microscopia confocal revelaram que 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. Histologicamente, inflamação mais severa foi observada nos períodos de 6 e 8 semanas pós-inoculação, sem diferença estatística entre esses períodos. Os animais pertencentes aos grupos controle não apresentaram sinais de inflamação após 8 semanas. 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.

Tobouti e colaboradores (2016)³⁴ desenvolveram um modelo experimental in vivo de estomatite protética associada a *Candida* para análise da expressão das aspartil proteases secretadas (SAPs) 2, 5 e 9 por *C. albicans* a partir de biofilme formado na superfície de prótese. Para tal, 35 ratos machos Wistar imunocompetentes foram utilizados. Como critério de inclusão, os animais não deveriam apresentar *C. albicans* antes da instalação dos dispositivos. Os animais foram divididos nos grupos Controle (n=5), que não utilizaram dispositivos; Dispositivo (n=15), que utilizaram dispositivo acrílico, sem a contaminação por *C. albicans*; e Dispositivo/*Candida* (n=15), os quais receberam os dispositivos contaminados. Os dois últimos grupos permaneceram com os dispositivos por 2, 4 e 6 dias (n=5 para cada período). Os dispositivos foram confeccionados a partir da moldagem individual de cada animal, utilizando moldeiras individuais confeccionadas previamente. 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 termopolimerizável. Durante a instalação dos aparatos, os fios foram inseridos entre os primeiros e segundos molares superiores e foram passados pelos orifícios confeccionados nos dispositivos. Ao final, as pontas foram unidas e cobertas por resina autopolimerizável para proteger a língua dos animais. Anteriormente à adesão na superfície interna dos dispositivos, as células fúngicas cresceram a 30°C em caldo *Trypticase Soy Broth* (TSB) sob agitação orbital a 180 rpm *overnight*, para obter células numa fase estacionária. As leveduras foram

lavadas com solução PBS, contadas com um hemocítmetro e ressuspensas em meio RPMI1640 na concentração de 1×10^7 células/mL. Para permitir a adesão de *C. albicans* na superfície interna, os dispositivos do grupo Dispositivo/*Candida* foram colocados em placas de cultura de 6 poços, contendo 1×10^7 leveduras/mL da suspensão em meio RPMI1640. Posteriormente à incubação a 37°C por 90 minutos com agitação a 75 rpm, os dispositivos foram lavados com PBS para remover as células que não se aderiram. Após a permanência dos dispositivos em boca durante os períodos experimentais, os mesmos foram removidos e imediatamente congelados para posterior análise da expressão das SAPs. Nestes períodos, todos os animais tiveram suas línguas e palatos avaliados clinicamente. A escala de Newton foi utilizada para classificar a estomatite protética, na qual petéquias dispersas pela mucosa palatal são classificadas como tipo I; eritema macular como tipo II; e eritema difuso com hiperplasia papilar como tipo III. Para contagem de leucócitos, amostras de sangue de cada animal também foram coletadas. Após a eutanásia em cada período experimental, os ratos tiveram seus palatos removidos para análise microscópica utilizando as colorações H.E. e PAS. O grupo Dispositivo/*Candida* 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 também no grupo Dispositivo/*Candida* no quarto dia. Microscopicamente, o grupo Dispositivo/*Candida* apresentou epitélio escamoso estratificado hiperplásico, com hiperortoqueratinização e projeções papilares exofíticas, principalmente ao quarto e sexto dia. As maiores expressões relativas de SAPs 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 pode ser utilizado em futuros experimentos.

2.2.2 Em animais imunocompetentes sob antibioticoterapia

Yano et al.⁵⁸ (2016) tiveram como objetivo determinar o papel da formação do biofilme no dano à mucosa utilizando cepas de *C. albicans* DAY185 e cepas mutantes e reconstituídas (*efg1^{-/-}* e *bcr1^{-/-}*). Para o estudo da formação do biofilme in vitro, amostras de resina acrílica autopolimerizável foram confeccionadas e

colocadas em placas de 6 ou 12 poços. Um volume de 100 μ L das diferentes cepas de *Candida* na concentração de 1×10^7 UFC/mL foi inoculado nos corpos de prova, os quais foram incubados por 3 h a 37°C e então gentilmente lavados em PBS 1x. Em seguida, as amostras foram imersas em saliva por 24 h a 37°C antes de serem processadas para análise microscópica. Para análise da formação de biofilme na mucosa ex vivo, ratos foram eutanasiados e tiveram a mucosa do palato removida e colocada em placas de 12 poços. O tecido foi lavado 1x em PBS e, na sequência, ficou exposto ao ar. Um inóculo de 100 μ L das diferentes cepas de *Candida* na concentração de 1×10^7 UFC/mL foi adicionado à superfície do tecido palatal. As amostras foram então incubadas da mesma forma descrita no experimento in vitro. Para o modelo in vivo, ratos eutímicos sem pelos foram mantidos em gaiolas individuais e receberam dieta gel uma semana antes da instalação dos dispositivos, os quais foram confeccionados da mesma forma descrita por Lee et al.⁵³ 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 entre eles. Para a quantificação do crescimento fúngico, swabs estéreis foram esfregados de maneira delicada sobre a parte removível do dispositivo e o palato. Essa coleta foi realizada semanalmente até o fim do experimento. Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados e os palatos foram removidos cirurgicamente e designados para diferentes análises. Os níveis de lactato desidrogenase no tecido palatal foram determinados colorimetricamente utilizando um kit específico e seguindo as instruções do fabricante. A mucosa do palato e os dispositivos também foram analisados em microscopia confocal a laser e MEV. Apenas a cepa DAY185 exibiu formação de arquitetura típica de biofilme, tanto no estudo in vitro, como no estudo ex vivo, a qual foi confirmada por ambas as técnicas de microscopia citadas. No estudo in vivo, 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

Nett e colaboradores³⁹ (2010) tiveram como objetivo estudar o processo de formação do biofilme de *C. albicans*. Para tal, utilizaram ratos Sprague-Dawley livres de patógenos específicos, os quais foram mantidos em gaiolas metabólicas e alimentados com dieta líquida. Anteriormente à instalação dos dispositivos intra-orais, os animais foram imunossuprimidos com uma dose única de cortisona, administrada subcutaneamente na concentração de 200 mg/Kg. Para a confecção dos dispositivos, um fio ortodôntico foi colocado sobre o palato duro e introduzido entre os molares superiores para servir como âncora para o material. Microrretenções foram criadas ao se aplicar um gel de cloreto de benzalcônio sobre os molares. Uma espátula metálica foi colocada sobre o palato para criar um espaço com cerca de 1 mm entre o tecido e o material do dispositivo, que seria utilizado para inoculação da *Candida*. Resina acrílica autopolimerizável foi manipulada e aplicada sobre os molares e o fio ortodôntico para criar uma superfície com aproximadamente 2 mm de espessura. Após a remoção da espátula, cem μL de uma suspensão de *C. albicans* na concentração de 1×10^8 UFC/mL foram inoculados sobre o palato duro. Os animais foram eutanasiados 6, 24, 48 ou 72 h depois para análise histopatológica ou para remoção dos dispositivos e posteriores análises. Para determinar a concentração de microrganismos viáveis nos dispositivos, foi realizada a contagem de UFC. Após a remoção, os dispositivos também foram analisados em MEV e microscopia de varredura confocal a laser. As línguas e palatos foram removidos cirurgicamente e processados para análise histopatológica, empregando as colorações H.E. e metenamina de prata de Gomori (GMS). Também se avaliou a resistência fúngica ao tratamento com a administração por via tópica e sistêmica de triazol e equinocandina. Os fármacos foram aplicados sobre o biofilme maduro e o tratamento continuou por 48 h, até a remoção dos dispositivos. Nenhum animal apresentou-se doente durante o experimento e o consumo de água e ração continuou normal. A cavidade bucal não apresentou sinais de inflamação ou supuração. 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. Tais achados foram corroborados pelas análises em MEV e microscopia confocal, as quais mostraram a presença de um biofilme de *C. albicans* com bactérias aderidas, além de células do hospedeiro e uma matriz extracelular. A aplicação de triazol, fluconazol e micafungina não reduziu de forma efetiva a carga viável de *C. albicans* nos dispositivos. Em H.E., 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.

A Tabela 1 apresenta um resumo com as principais características dos estudos de indução de estomatite protética mencionados.

Tabela 1. Principais características dos modelos de indução de estomatite protética descritos na Revisão de literatura

AUTORES	INÓCULO	TEMPO DE USO DOS DISPOSITIVOS	ANTIBIÓTICO/IMUNOSSUPRESSOR	MÉTODOS DE ANÁLISE	TEMPO DE AVALIAÇÃO	ACHADOS CLÍNICOS	DEMAIS ACHADOS
Olsen e Boldevik (1978)²⁹	30 mg – concentração não informada – aplicados sobre a parte interna do dispositivo	2 semanas	Não	Análise visual e histológica	Ao final de cada semana de uso dos dispositivos	Inflamação intensa generalizada	Hiperplasia e atrofia epitelial, eventuais abscessos, paraqueratose, sem penetração de hifas
Shakir et al. (1981)³⁰	30 mg – 3×10^{20} blastóporos/mL – aplicados sobre o palato e parte interna do dispositivo	1, 2, 4 ou 6 semanas	Não	Análise visual e histológica	Após remoção dos dispositivos ou após 2 semanas sem o uso dos mesmos	Eritema difuso, mais evidente após 4-6 semanas de uso	Invasão de hifas, formação de microabscessos, infiltrado inflamatório difuso. Ausência de sinais após 2 semanas sem o uso dos dispositivos
Shakir et al. (1983)³¹	30 mg – 3×10^{20} blastóporos/mL – aplicados sobre o palato	2 semanas	Não	Análise visual e histológica	Ao fim do período experimental	Não citados	Hiperplasia epitelial, formação de microabscessos, invasão de hifas
Lamb e Martin (1983)²⁷	30 mg – 3×10^{20} blastóporos/mL – aplicados sobre o palato	4 semanas	Não	Análise visual e histológica, contagem de UFC/mL	Após remoção dos dispositivos ou após 4 semanas de tratamento	Não citados	Epitélio hiperplásico, infiltrado inflamatório, invasão de hifas
Norris et al. (1985)²⁸	30 mg – 5×10^8 blastóporos – aplicados sobre a parte interna do dispositivo	4-8 semanas	Não	Análise visual e histológica, contagem de UFC/mL	Após remoção dos dispositivos ou após 4 semanas de tratamento	Não citados	Sinais clínicos e histológicos de estomatite protética
Shakir et al. (1986)³²	30 mg – 3×10^{20} blastóporos/mL – aplicados sobre o palato e parte interna do dispositivo	2-4 semanas	Não	Análise visual e histológica, contagem de UFC/mL	Após 2 semanas sem o uso dos dispositivos ou após 2 semanas da reinstalação	Áreas eritematosas difusas após 2 semanas de uso	Hiperplasia e atrofia epitelial, microabscessos. Ausência de sinais após 2 semanas sem o uso dos dispositivos

Shakir et al. (1986)³³	30 mg – 3×10^{20} blastóporos/mL – aplicados sobre o palato	1, 2 ou 4 semanas	Não	Análise histológica e da atividade mitótica	Ao fim dos períodos experimentais	Não citados	Aumento da espessura do epitélio e da atividade mitótica (4ª semana)
Martin et al. (1987)⁵⁶	30 mg – concentração não informada – aplicados sobre o palato	2 semanas	Não	MEV e eletroforese em gel	Após a remoção dos dispositivos, ao final do tratamento ou 14 dias após o tratamento	Não citados	Desorganização da barreira de permeabilidade do epitélio palatal (após remoção dos dispositivos)
Martin (1989)⁵⁷	30 mg - 3×10^{20} blastóporos/mL – aplicados sobre o palato	2 semanas	Não	Análise histológica e contagem de colônias/cm ²	Ao fim do tratamento ou após 14 dias do seu término	Não citados	Hiperplasia epitelial, inflamação tecidual (H.E.), crescimento de leveduras
Jennings e MacDonald (1992)²⁴	60 mg – concentração não informada - aplicados sobre a parte interna do dispositivo	4 semanas	Não	Análise histológica	Ao fim do período experimental	Não citados	Hiperplasia epitelial, invasão de hifas e formação de microabscessos
Nett et al. (2010)³⁹	100 µL – 1×10^8 UFC/mL – aplicados sobre o palato	6, 24, 48 ou 72 h	Cortisona dose única 200 mg/Kg – no dia da inoculação	Análise visual, histológica, MEV, confocal e contagem UFC/mL	Ao fim dos períodos experimentais ou após 48 h de tratamento	Ausência de inflamação ou purulência	Formação de biofilme de <i>Candida</i> (MEV e confocal), inflamação tecidual, invasão de hifas (H.E. e GMS)
Johnson et al. (2012)²⁵	Pasta de 50 mg – 1×10^{10} UFC/mL – aplicada sobre o palato	2, 4, 6 ou 8 semanas	Não	Análise visual, histológica, MEV, confocal e contagem UFC/mL	Ao fim dos períodos experimentais	Eritema difuso e edema	Formação de biofilme (MEV e confocal), severa inflamação tecidual (H.E.) – 6 a 8 semanas
Tobouti et al. (2016)³⁴	1×10^7 UFC/mL – dispositivos contaminados com biofilme	2, 4 ou 6 dias	Não	Análise visual, histológica, hematológica e de expressão das SAPs	Ao fim dos períodos experimentais	Petéquias dispersas pela mucosa palatal	Aumento dos neutrófilos, hiperplasia epitelial, maior expressão de SAPs – 4 a 6 dias
Yano et al. (2016)⁵⁸	1×10^9 UFC/mL – aplicada sobre o palato	4 semanas	Amoxicilina e ácido clavulânico na água de beber – 4 dias antes da inoculação (31,25 mg em 200 mL)	Dosagem de lactato desidrogenase, MEV, confocal a laser	Ao final de cada semana	Edema e eritema da mucosa palatal	Formação de biofilme espesso (MEV, confocal) – cepa DAY185

Fonte: O autor.

2.3 TOXICIDADE SISTÊMICA CAUSADA PELA CLOREXIDINA

2.3.1 Estudos em animais

Com o intuito de verificar o potencial cariostático da Clx em modelo animal, Kornman et al.⁴⁴ (1973) forneceram dieta cariogênica e concentrações variáveis de Clx na água de beber de ratos albinos Charles River. Inicialmente, os animais foram divididos em 4 grupos (n=24), sendo eles: 1: apenas água destilada; 2: 0,2% de Clx; 3: 0,1% de Clx; e 4: 0,05% de Clx. Essas soluções foram dadas *ad libitum* e seu consumo foi verificado a cada 2 dias. Tendo em vista que os grupos das concentrações mais altas de Clx apresentaram menor ingestão das soluções, optou-se por realizar um segundo experimento com 5 grupos (n=35), adicionando um novo grupo, o qual recebeu Clx a 0,2% com 25 g de sacarose adicionados à água, visando mascarar o gosto indesejável da Clx e melhorar a aceitação por parte dos animais. Os grupos 3 e 4, com menor concentração de Clx, apresentaram consumo de água semelhante ao grupo 1. Os ratos do grupo 2 apresentaram redução na sua massa corpórea no início do experimento, mas voltaram a ganhar peso a partir do quinto dia. Os animais que tiveram sacarose adicionada à água terminaram o experimento com peso superior ao grupo da mesma concentração sem o açúcar. Apesar de ter reduzido significativamente a incidência de lesões cariosas, foi possível observar perda de pêlos, sendo a maior perda observada no grupo submetido à maior dose de Clx.

Chow, Hirsch & Buttar⁴³ (1977) compararam a toxicidade sistêmica induzida pela administração de Clx ou do triclosan por via oral ou por via percutânea. Ratos machos adultos e filhotes com quatro semanas foram randomizados nos grupos controle ou de tratamento. Os grupos de tratamento receberam uma única dose via oral de 10 mL/kg de triclosan ou Clx, enquanto o grupo controle recebeu o mesmo volume, porém, apenas com o veículo. Após 24 h, os ratos eram anestesiados, eutanasiados e seus rins eram excisados e colocados em solução salina gelada. Os rins de diversos filhotes foram reunidos, a fim de se obter tecido suficiente para análise. O tecido coletado era colocado em béqueres contendo 2,7 mL de meio tampão de fosfato com os metabólitos ácido para-amino-hipúrico (PAH) e N-metil-nicotinamida (NMN). Antes da eutanásia dos animais, foi realizada a coleta de sangue para avaliação do nitrogênio uréico sanguíneo (BUN) e também da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).

A administração da Clx por via oral produziu uma depressão dose-dependente no acúmulo de PAH e NMN. Nos ratos adultos, o acúmulo de PAH era mais suscetível ao efeito inibitório da Clx. Por outro lado, o acúmulo de NMN foi significativamente reduzido tanto em adultos quanto em filhotes a partir da concentração de 0,5 g/kg. Nos ratos adultos, a TGO e a TGP apresentaram-se significativamente elevadas com a administração da Clx nas concentrações de 1 g/kg e 2 g/kg. Para os filhotes, essas alterações foram observadas para a concentração de 1,5 g/kg. As concentrações de BUN estavam significativamente mais altas tanto para os ratos adultos quanto filhotes, a partir da concentração de 1 g/kg de Clx. Os ratos que receberam 2 g/kg de Clx apresentaram mortalidade de 20%, enquanto que concentrações inferiores a essa não causaram morte nem para ratos adultos, nem para filhotes. Para a análise da toxicidade dos fármacos administrados por via percutânea, fatias dos rins de animais que não receberam nenhum tratamento foram coletadas e colocadas em béqueres contendo o meio tampão de fosfato e os metabólitos PAH e NMN, e nele eram adicionados triclosan ou Clx nas concentrações 10^{-5} e 10^{-4} M. A adição dessas substâncias ao meio de incubação contendo as fatias de rins produziu uma depressão dose-dependente no acúmulo de PAH e NMN. A Clx na concentração 10^{-5} não produziu redução significativa no acúmulo de PAH, já em 10^{-4} houve redução de mais de 28%. Em contraste, os valores do NMN reduziram notavelmente: 54% e 81% nas concentrações 10^{-5} e 10^{-4} , respectivamente. Os resultados obtidos sugeriram que a Clx promove alterações hepáticas e renais.

Case⁴⁵ (1977) reuniu diversos estudos sobre a toxicidade sistêmica da Clx em diferentes espécies de animais. Em um deles, cães receberam doses por via oral que variavam entre 50 e 150 mg/Kg de Clx por 7 semanas. Com exceção de vômitos, nenhum outro sinal clínico foi detectado. Lesões nas córneas de coelhos foram provocadas com concentrações de Clx iguais ou superiores a 1%, porém, em doses inferiores a 0,5% essas reações não ocorreram. Em uma pesquisa de teratologia, sessenta ratas gestantes receberam gluconato de Clx nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/Kg por via oral. O tamanho da ninhada e o desenvolvimento embrionário e fetal não foram alterados após a administração da Clx em comparação ao grupo controle. Durante 2 anos, ratos receberam doses de até 50 mg/Kg de Clx na água de beber, com animais eutanasiados nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 18

meses. O gosto desagradável da Clx na concentração de 50 mg/Kg inibiu o consumo de água por parte dos animais, o que levou à desidratação de alguns deles. Com isso, a dose máxima foi alterada para 40 mg/Kg. O consumo de comida não foi prejudicado no decorrer do estudo. Nenhuma alteração hematológica ou clínica foi encontrada, sendo que a única diferença detectada foi com relação à proporção do peso dos órgãos e o peso corpóreo no grupo de maior dosagem. O exame histológico de 30 tecidos revelou apenas uma alteração significativa, o aparecimento de células gigantes em linfonodos mesentéricos. O autor ainda relata que não existe evidência de qualquer tipo de efeito tumorigênico relacionado ao uso da Clx.

Henschen e Olson⁴⁰ (1984) utilizaram 69 ratos albinos Sprague-Dawley para verificar a degeneração aguda de terminações nervosas adrenérgicas após aplicação local de Clx. Os animais receberam soluções de 0,05%, 0,1%, 1%, ou 1,5% de acetato de Clx, as quais foram injetadas na câmara anterior de seus olhos. Realizou-se a eutanásia 2, 6, 15, 51 e 59 dias após a administração. O fluido da câmara anterior dos olhos ficou opaco imediatamente após a injeção das soluções com concentração acima de 0,1%. Dois dias depois do experimento, as veias da íris apresentaram-se dilatadas e cheias de sangue. No grupo que recebeu a concentração de 1,5%, as íris estavam rígidas e frágeis no 59º dia. A Clx apresentou uma pronunciada degeneração dose-dependente dos nervos adrenérgicos da íris. Foi observado que 95% dos nervos degeneraram dois dias após a injeção das doses mais altas de Clx. Os autores concluíram que a Clx aplicada em tecidos desprotegidos pode causar degeneração das fibras nervosas autônomas.

A ação aguda direta da Clx nos pulmões de ratos Sprague-Dawley foi investigada por Orito et al.⁵⁹ (2006). Os animais foram divididos em 4 grupos: solução salina (controle), gluconato de Clx a 0,01%, 0,1% e 1%. Sob anestesia, os ratos foram colocados em posição supina, e um tubo guia foi inserido na traqueia. Outro tubo mais fino foi inserido no interior do tubo guia e sua ponta foi colocada na porção distal da primeira ramificação esquerda da traqueia. As substâncias foram injetadas vagarosamente no volume de 300 µL/Kg. Um minuto após a administração, ambos os tubos foram retirados cuidadosamente. Três animais de cada grupo foram sacrificados 1, 7, 28 e 84 dias após o procedimento para análise histopatológica. Os pulmões foram removidos, perfundidos, fixados, processados e corados com Azan.

Nenhum animal apresentou dispneia, cianose ou qualquer alteração respiratória em nenhum dos períodos avaliados. Nenhuma alteração histopatológica foi encontrada no pulmão direito. Não foram encontradas alterações significativas no pulmão esquerdo do grupo controle sacrificado 1 dia após a administração, com exceção de discreto edema intersticial e congestão dos capilares. Essas alterações começaram a diminuir após 7 dias e não foram detectadas 28 dias depois da exposição à solução salina. Um dia depois da administração de Clx a 0,1% ou 1%, congestão severa dos alvéolos e capilares foi observada. Exsudato foi encontrado principalmente na periferia dos focos hemorrágicos. As alterações inflamatórias foram mais severas no grupo de maior concentração. Infiltração de macrófagos intra-alveolares ainda se fazia presente 28 e 84 dias após o experimento nas concentrações de 0,1% e 1%.

Faria e colaboradores⁶⁰ (2007) caracterizaram lesões induzidas por injeções de Clx na pata de camundongos em intervalos de tempo determinados (24 e 48 h, 7 e 14 dias). Para tal, 120 camundongos Balb/c pesando cerca de 20 g foram divididos em 5 grupos (n=24): controle (água destilada), 0,125%, 0,25%, 0,5%, e 1% de digluconato de Clx 20% diluído em água destilada. Sob anestesia, as soluções foram injetadas na pata traseira direita dos animais subplantarmente. Utilizando um paquímetro, o aumento de volume causado foi determinado ao se comparar com a espessura inicial das patas nos intervalos de tempo estabelecidos. Três mensurações consecutivas de cada pata foram realizadas por um avaliador cego, e a média foi considerada o valor final para cada animal. Lâminas com amostras da pele foram coradas com H.E. e observadas em microscópio de luz. A avaliação qualitativa considerou a presença de necrose tecidual e/ou inflamação, e a intensidade e natureza da resposta inflamatória. A Clx induziu edema de maneira dose-dependente. A resposta máxima foi observada 24 h após a injeção de Clx. A espessura das patas voltou ao normal 7 dias depois das injeções nas concentrações de 0,125% e 0,25%. Para as concentrações de 0,5% e 1%, a espessura das patas reduziu ao longo do tempo, mas ainda se apresentou significativamente elevada quando comparada ao grupo controle 14 dias após as injeções. Histologicamente, as concentrações de 0,5% e 1% provocaram necrose por coagulação na epiderme, derme e tecido subcutâneo, associada a infiltrado inflamatório composto principalmente por neutrófilos. A concentração de 0,125% não teve efeito

necrotizante, mas ainda assim induziu uma resposta inflamatória moderada. Completo reparo tecidual foi observado 14 dias após as injeções de Clx nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1%, mas algumas células mononucleares e discreto edema ainda persistiam nas concentrações de 0,5% e 1%.

Propondo investigar o potencial da Clx em causar danos em nível de DNA nos leucócitos, fígado, rins e bexiga, Grassi et al.⁴⁶ (2007) utilizaram 10 ratos Wistar pesando cerca de 250 g, os quais foram divididos em dois grupos (n=5): controle negativo e experimental. O grupo experimental recebeu diariamente 3 mL de digluconato de Clx a 0,12% via gavage, durante 8 dias. Todos os animais foram eutanasiados após esse período. Depois da eutanásia, cerca de 1 mL de sangue foi coletado via punção cardíaca. Fragmentos centrais do rim e do fígado foram coletados e colocados em NaCl a 0,9%. O sobrenadante foi descartado e suspensões celulares de cerca de 10 µL foram utilizadas para o ensaio cometa. A bexiga foi aberta e enxaguada em NaCl a 0,9%. A mucosa foi removida utilizando lâminas descartáveis e transferida para tubos contendo 100 µL de PBS. Cerca de 10 µL da suspensão celular também foram utilizados para o ensaio cometa. Diferenças significativas foram encontradas nas células do sangue e rins ao se comparar com os animais do grupo controle, sugerindo que esses são sítios particularmente suscetíveis a danos ao DNA após exposição à Clx. Os autores sugerem que tais resultados poderiam servir como alerta para uma correta avaliação de pacientes em casos de ingestão acidental, visto que danos ao DNA são um importante passo em direção ao desenvolvimento de câncer.

Monteiro et al.⁶¹ (2011) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar histologicamente e histomorfometricamente a resposta do tecido conjuntivo frente ao implante de um *chip* de Clx no subcutâneo de ratos. Sob anestesia, trinta e cinco ratos Wistar receberam implantes de um *chip* de Clx no subcutâneo do lado direito e de uma membrana de politetrafluoro etileno no lado esquerdo, como controle. Os animais foram sacrificados 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21 dias após a colocação dos implantes e as amostras contendo os materiais testados foram fixadas em formalina a 10% e processadas para análise histológica. As lâminas obtidas foram coradas com H.E. e analisadas em microscópio de luz. Foram analisados 8 campos histológicos referentes à área cirúrgica para análise histomorfométrica, os quais

foram selecionados de maneira randomizada. Escores foram atribuídos para caracterizar qualitativamente os parâmetros da reação inflamatória, considerando a presença de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e macrófagos. As lâminas também foram classificadas de acordo com a severidade da inflamação. As imagens histológicas do material controle mostraram infiltrado inflamatório inicial moderado, com predominância de células polimorfonucleares, edema e tecido de granulação. Algumas células gigantes multinucleadas foram encontradas na região da interface do material ao 3º dia e persistiram até o 21º dia. Os animais sacrificados 1 dia após o implante do *chip* de Clx apresentaram hemorragia, edema e intenso infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos adjacentes ao material. Durante a análise do 3º dia e períodos subsequentes, tecido de granulação foi encontrado fora do infiltrado. Ao 10º dia, detectou-se degradação do material, caracterizada principalmente por lacunas preenchidas por neutrófilos e macrófagos. O processo de degradação aumentou com o tempo. Diferenças foram encontradas ao analisar a resposta inflamatória causada pelos materiais testados, sendo que o processo de inflamação não reduziu com o passar do tempo no grupo da Clx. Os autores concluem que o *chip* de Clx comportou-se de maneira citotóxica e que mais estudos seriam necessários para avaliar a citotoxicidade e biocompatibilidade desse material.

Xue e colaboradores⁴² (2011) investigaram os efeitos tóxicos pulmonares agudos da Clx posteriormente à sua administração via intratraqueal em ratos Sprague-Dawley. Os animais foram divididos em 3 grupos (n=10): controle (administração de água destilada), grupo de baixa dose (0,02% de digluconato de Clx) e grupo de alta dose (0,2% de digluconato de Clx). Sob anestesia, as soluções foram instiladas intratraquealmente em um volume de 500 µL/Kg. Cinco ratos de cada grupo foram eutanasiados para necropsia 1 e 7 dias após o procedimento. Coletou-se o sangue e órgãos para realização de análise hematológica, bioquímica, histopatológica e para determinação da concentração da Clx pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Macroscopicamente, edema e hemorragia pulmonar foram encontrados em 3 dos 5 ratos pertencentes ao grupo de alta dose 1 dia após a administração de Clx. Em ambos os períodos experimentais, houve aumento estatisticamente significativo da contagem de leucócitos no grupo de alta dose quando comparado ao grupo controle. Notou-se aumento significativo dos níveis de proteínas totais, nitrogênio úrico sanguíneo (BUN) e creatinina nos animais

do grupo de alta dose sacrificados 1 dia após a injeção de Clx. Detectou-se redução significativa nos níveis de proteínas totais e albumina para ambos os grupos experimentais após 7 dias da administração da Clx e aumento significativo das concentrações de creatinina e lactato desidrogenase no grupo de alta dose sacrificado após 7 dias. Os pulmões do grupo de alta dose sacrificados após 1 dia apresentaram edema severo, congestão dos alvéolos e capilares e infiltrado inflamatório, porém, tais alterações regrediram no grupo de 7 dias. Discreto edema intersticial e infiltrado inflamatório foram constatados nos pulmões do grupo de baixa dose. Leve edema dos hepatócitos foi identificado em ambos os grupos experimentais. A concentração de Clx presente nos pulmões era 10 vezes maior do que nos rins e 20 vezes maior do que no fígado, especialmente nos ratos do grupo de maior dose. No período de 7 dias, a concentração de Clx nos pulmões estava ainda mais alta e era 30 vezes superior a dos rins. Os autores sugerem que os efeitos citotóxicos da Clx provocaram essas reações nos animais.

Em outro trabalho, Xue et al.⁶² (2012) compararam os efeitos tóxicos provocados pela ingestão ou injeção de diferentes surfactantes e desinfetantes iônicos. As substâncias testadas foram: cloreto de benzalcônio (BZK) e de benzetônio (BZT), cloridrato de alquildiaminoetilglicina (AEG), sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS), éter de poli oxietileno (PEC), Clx (CHX) e como controle, solução salina. As drogas foram administradas em ratos Sprague-Dawley sob anestesia por via oral ou intravascular. Diferentes doses foram analisadas para cada substância, variando entre 15 e 150 mg/Kg na via intravascular e entre 250 e 1250 mg/Kg na administração via oral. As concentrações utilizadas para análise em HPLC do sangue, pulmões, fígado e rins foram de 15 mg/Kg intravascularmente ou 250 e 1250 mg/Kg via oral. Três animais receberam cada concentração e as manifestações tóxicas foram avaliadas por 24 h após o experimento. Em seguida, realizou-se a coleta de sangue por punção cardíaca e, então, a eutanásia. A resposta dos animais frente às diferentes vias de administração variou bastante entre os químicos testados. Os animais que receberam Clx nas doses de 15 a 20 mg/Kg intravascularmente morreram. Na administração via oral, todos os animais que receberam a dose de 250 mg/Kg sobreviveram por 24 h, porém, ao se administrar a Clx na concentração de 1250 mg/Kg, os ratos encontraram-se em pobres condições, sem consumo de água ou ração. Os níveis de Clx estavam mais

elevados nos pulmões e rins do que no fígado e sangue. Quase todos os animais que receberam Clx morreram de dispneia durante ou logo após a injeção. O exame patológico detectou a presença de erosão, petéquias hemorrágicas, necrose e congestão no trato gastrointestinal e danos severos nos pulmões. Alguns animais que receberam a Clx por via intra-arterial praticamente não urinaram e outros apresentaram severa hematúria. O efeito tóxico primário considerado nesse caso foi insuficiência renal. Tais resultados sugerem que os pulmões e rins possam ser órgãos-alvo para esse tipo de substância. Ao se ranquear a toxicidade dos produtos testados, a Clx igualou-se ao BZK e BZT, e estes foram mais tóxicos do que as outras substâncias avaliadas.

A Tabela 2 apresenta um resumo com as principais características dos estudos em animais de toxicidade sistêmica à clorexidina mencionados anteriormente.

Tabela 2. Principais características dos estudos em animais de toxicidade sistêmica à Clx descritos na Revisão de literatura

AUTOR	ESPÉCIE	n AMOSTRAL	CONCENTRAÇÃO DA CLX	DOSE E VIA DE ADMINISTRAÇÃO	MÉTODOS DE ANÁLISE	PRINCIPAIS ACHADOS
Kornman 1973⁴⁴	Ratos albinos Charles River	59	Gluconato de Clx (0,2%, 0,1% e 0,05%)	Água de beber (durante 13 dias)	Avaliação visual	Perda de pelos, redução no peso
Chow 1977⁴³	Ratos Wistar	51 adultos e 24 filhotes	Gluconato de Clx (0,25 g/Kg, 0,5 g/Kg, 1 g/Kg e 2 g/Kg)	Via oral (dose única de 10 mL/Kg)	Análise bioquímica	Aumento nas dosagens de TGO, TGP e ureia
Henschen 1984⁴⁰	Ratos albinos Sprague-Dawley	69	Acetato de Clx (0,05%, 0,1%, 1,0% e 1,5%)	Injeções nos olhos (5 µL)	Fluorescência	Dilatação das veias oculares, degeneração dos nervos oculares
Orito 2006⁵⁹	Ratos Sprague-Dawley	42	Gluconato de Clx (0,01%, 0,1% e 1%)	Intrapulmonar (300 µL/Kg)	Análise histológica	Congestão dos alvéolos e capilares
Faria 2007⁶⁰	Camundongos Balb/c	120	Digluconato de Clx (0,125%, 0,25%, 0,5% e 1%)	Injeção subplantar (0,01 mL)	Mensuração da espessura da pata e histológica	Edema, necrose na epiderme, derme e tecido subcutâneo
Grassi 2007⁴⁶	Ratos Wistar	10	Digluconato de Clx (0,12%)	Gavage (3 mL, 1 vez ao dia por 8 dias)	Teste cometa	Dano no DNA das células do sangue periférico e rins
Monteiro 2011⁶¹	Ratos Wistar	35	Média de 150 ppm	Chip reabsorvível de Clx instalado subcutaneamente	Análise histológica	Hemorragia, edema, intenso infiltrado inflamatório
Xue 2011⁴²	Ratos Sprague-Dawley	30	Digluconato de Clx (0,2% e 0,02%)	Intratraqueal (500 µL/Kg)	Análise bioquímica, hematológica, histológica e HPLC	Dificuldades respiratórias, edema pulmonar e hemorragia, aumento dos leucócitos e creatinina, congestão dos alvéolos
Xue 2012⁶²	Ratos Sprague-Dawley	3 ratos para cada dose de Clx	Gluconato de Clx (15 a 150 mg/Kg ou 250 a 1250 mg/Kg)	Intravascular ou via oral	Análise visual e HPLC	Danos severos nos pulmões e trato gastrointestinal. Níveis elevados de Clx nos pulmões e rins

Fonte: O autor.

2.3.2 Relatos de casos em humanos

Rushton⁶³ (1977) conduziu dois estudos a fim de verificar a absorção sistêmica da Clx. O primeiro envolveu 3 voluntários, sendo que 2 deles receberam a substância dosada em cápsulas de gelatina, enquanto o terceiro recebeu a Clx a 0,2% na forma de enxaguatório bucal. Os participantes tiveram seu sangue coletado em intervalos frequentes durante as primeiras 24 h e sua urina e fezes coletados por até 10 dias após a administração. No segundo experimento, dez voluntários fizeram bochechos duas vezes por dia com 1 mL de gluconato de Clx a 0,2%. Ao final de 6 semanas, amostras do sangue foram coletadas. Os achados indicaram que a absorção sistêmica da Clx foi mínima e não resultou em níveis sanguíneos detectáveis.

Existem poucos relatos na literatura de ingestão da Clx por humanos. Um deles foi publicado por Massano et al.⁴¹ (1982), no qual um paciente tentou cometer suicídio ao ingerir 150 mL de gluconato de Clx. O paciente apresentou edema faríngeo e lesões necróticas no esôfago, além de altos níveis de aminotransferase, que só foram estabilizados após seis meses do ocorrido. Realizou-se uma biópsia por agulha no fígado, revelando degeneração gordurosa e hepatite lobular. Apesar da Clx ser pobremente absorvida pelo trato gastrointestinal, os autores justificam tais achados devido à alta dose ingerida da substância, que resultou em necrose da mucosa intestinal, favorecendo a sua absorção.

Roche, Chinn & Webb⁴⁸ (1991) relataram um caso de um paciente que possuía o hábito de bochechar e deglutir diariamente uma solução de 4% de gluconato de Clx (Hydrex). Após apresentar vômitos intermitentemente durante dez dias, foi realizada uma endoscopia, a qual revelou múltiplas erosões na parte inferior do estômago e primeira parte do duodeno. O esôfago apresentava-se normal. Histologicamente, verificou-se gastrite atrófica ativa, e os parâmetros hematológicos e bioquímicos não estavam alterados. Ao ser descoberta a causa da gastrite, o paciente foi orientado a interromper o hábito. Após seis semanas, nova endoscopia foi realizada, mostrando recuperação das erosões da mucosa, com alguns resquícios de gastrite.

Ishigami et al.⁴⁹ (2001) apresentaram o relato de um paciente de 67 anos que se queixava de constipação e desconforto anal. Ele foi diagnosticado com câncer colorretal e, pouco antes da cirurgia sob anestesia geral, recebeu por engano 4 mL de gluconato de Clx a 20% (0,8 g, 13 mg/Kg) via intravenosa, ao invés de um relaxante muscular. Durante as 3 h seguintes, o paciente desenvolveu um estado pré-choque, com pressão arterial de 70/35 mmHg e infiltração alveolar bilateral, observada radiograficamente. No segundo dia, o edema pulmonar piorou, e no terceiro, a condição respiratória ainda não havia melhorado. A esta altura, o paciente apresentava síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e só demonstrou melhora do quadro após ter sido canulado percutaneamente para receber oxigenação por membrana extracorpórea. O paciente se recuperou e pôde realizar a colectomia, sem apresentar sequelas neurológicas dentro de um período de 2 anos de acompanhamento.

Hirata e Kurokawa⁶⁴ (2002) relataram o caso de uma paciente de 80 anos de idade que apresentava demência e que ingeriu 200 mL de Maskin (gluconato de Clx a 5%). A paciente apresentou hipotensão e rápida perda de consciência. Apesar do tratamento intensivo, ela faleceu 12 h após o ocorrido e a concentração de Clx encontrada no seu soro estava notavelmente alta.

Outra ocorrência, descrita por Kudo et al.⁵⁰ (2002), envolveu uma paciente de 58 anos com reumatismo articular que foi submetida a uma sinovectomia no seu dedo médio da mão esquerda. Na manhã seguinte à operação, ela deveria receber uma injeção de antibióticos via cateter venoso, seguida por 10 mL de solução salina contendo anticoagulante. Imediatamente após a injeção, ela relatou desconforto e 20 min depois sofreu uma parada cardíaca. A paciente foi a óbito 101 min depois da injeção. Durante a investigação da causa *mortis*, foi levantada a suspeita da paciente ter recebido por engano uma solução de gluconato de Clx a 20%, que era destinada a outro paciente. A hipótese foi confirmada por meio da determinação da concentração de Clx no soro da paciente utilizando HPLC.

Balit et al.⁶⁵ (2006) acompanharam por dois anos duas centrais de informação de envenenamento da Austrália, para observação da ocorrência de ingestão de um medicamento composto por 20 mg/mL de lidocaína e 0,5 mg/mL de

Clx. Esse medicamento era indicado para aplicação tópica na gengiva de dentes em erupção, porém, notou-se com frequência a ocorrência de administração incorreta, devido à semelhança de sua embalagem com a embalagem de um preparo pediátrico de Paracetamol. Das 198 ligações realizadas durante o período do estudo, apenas dois pacientes relataram efeitos adversos, um deles envolvendo angústia, perturbação e dificuldade na deglutição de alimentos sólidos após 20 min da administração, e o outro, a ocorrência de dois vômitos. Essas alterações surgiram e resolveram-se dentro de 1-2 h após a administração do medicamento.

Abdallah⁴⁷ (2015) organizou um artigo de revisão de literatura com trabalhos publicados entre 1980 e 2014 usando os descritores “anafilactoide”, “anafilaxia” e “clorexidina”. O autor concluiu que as reações de hipersensibilidade à Clx incluem dermatites de contato, prurido, formação de vesículas, urticária, dispneia e choque anafilático. A incidência dessas reações e a morbidade e mortalidade relacionadas a elas permanece desconhecida. A maior parte dos casos encontrados pelo autor envolve pacientes em situações cirúrgicas, visto que a Clx é um agente desinfetante padrão, utilizado para a antisepsia da pele durante o preparo cirúrgico.

Os principais relatos destes casos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Relatos de casos de administração inadequada de Clx e seus efeitos adversos

AUTORES	CONCENTRAÇÃO DA CLX	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	MÉTODOS DE ANÁLISE	PRINCIPAIS ACHADOS
Rushton (1977)⁶³	0,2%	Via oral e uso externo (bochechos com 1 mL)	Exame hematológico e de urina e fezes	Absorção sistêmica mínima
Massano et al. (1982)⁴¹	Não informada	Via oral (150 mL)	Análise bioquímica e patológica	Aumento da TGO e TGP, edema faríngeo, lesões no esôfago, hepatite lobular
Roche, Chinn e Webb (1991)⁴⁸	4%	Via oral	Endoscopia, análise histológica e bioquímica	Erosões no estômago e duodeno, gastrite atrófica ativa
Ishigami et al. (2001)⁴⁹	20%	Intravenosa (4 mL)	Exame clínico e radiográfico	Estado pré-choque, edema pulmonar, SDRA
Hirata e Kurokawa (2002)⁶⁴	5%	Via oral (200 mL)	Não informado	Óbito após 12 h
Kudo et al. (2002)⁵⁰	20%	Intravenosa (10 mL)	HPLC	Clx no soro e óbito após 101 min

Fonte: O autor.

ESTUDO I

**Validação de modelo de indução de candidose bucal em ratos
imunocompetentes**

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

1. Avaliar diferentes métodos de descontaminação de dispositivos palatais acrílicos para uso animal, bem como realizar e confirmar a contaminação dos mesmos com biofilme padronizado de *C. albicans*;
2. Avaliar a duração da candidose bucal induzida por meio de diferentes protocolos em ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) imunocompetentes;
3. Avaliar a efetividade da indução da estomatite protética em ratos Wistar imunocompetentes sob antibioticoterapia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a efetividade da irradiação com energia de micro-ondas, da exposição à luz ultravioleta e do banho em ultrassom na descontaminação de dispositivos palatais acrílicos para uso animal por meio da análise visual de crescimento e da avaliação espectrofotométrica do crescimento microbiano;
2. Avaliar a contaminação dos dispositivos com biofilme maduro de *C. albicans* por meio de contagem de UFC/mL e microscopia de varredura confocal a laser;
3. Avaliar a longevidade da candidose bucal induzida utilizando diferentes protocolos em ratos machos Wistar imunocompetentes por meio de análise visual, contagem de UFC/mL e análise histopatológica (H.E. e PAS).
4. Avaliar a efetividade da indução da estomatite protética utilizando um protocolo selecionado a partir do item anterior, em ratos Wistar imunocompetentes sob antibioticoterapia, utilizando os mesmos métodos mencionados anteriormente.

3.3 HIPÓTESES TESTADAS

1. Os dispositivos intra-orais seriam esterilizados por meio da irradiação com energia de micro-ondas, exposição à luz ultravioleta e/ou do banho em ultrassom e o protocolo de contaminação permitiria a formação de um biofilme maduro de *C. albicans* na superfície dos dispositivos;
2. A candidose bucal induzida por meio de inoculação oral e/ou do dispositivo intra-oral contaminado nos animais imunocompetentes duraria até quatro dias após a indução, sendo o fungo então eliminado pelo hospedeiro;
3. Os sinais de indução da estomatite protética seriam mais evidentes nos animais imunocompetentes sob antibioticoterapia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a execução do Estudo I, foram utilizados 53 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), sendo cinco para a avaliação da efetividade da esterilização e contaminação dos dispositivos acrílicos, vinte para a avaliação da longevidade da candidose bucal em ratos imunocompetentes e vinte e oito para a avaliação da indução da estomatite protética em ratos imunocompetentes sob antibioticoterapia. Os animais apresentavam aproximadamente 90 dias de idade e pesavam em torno de 300 g^{55,66} 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 de alojamento e alimentação dos animais foram 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 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° e 24°C e taxa de umidade relativa entre 45 e 55%.

Para a primeira etapa do estudo (esterilização e contaminação dos dispositivos), os animais receberam dieta sólida convencional proveniente do NAEVI/UEPG e água *ad libitum*.

Para a segunda etapa (duração da candidose bucal em imunocompetentes), os animais receberam água *ad libitum* durante todo o experimento e uma dieta pastosa três dias antes do período de indução da doença.⁵⁵ Após esse período, os animais foram alimentados com ração sólida convencional. Para o preparo da ração pastosa, o pó da ração convencional foi peneirado e armazenado em um recipiente hermeticamente fechado, ao qual foi adicionado água diariamente até se obter uma mistura homogênea de consistência pastosa. Cada rato recebeu uma quantidade diária aproximada de 30 g dessa mistura. A água foi trocada diariamente. Os animais não foram, em nenhum momento, mantidos em jejum. Os animais

contaminados eram mantidos em ambientes diferentes dos animais controles não contaminados, evitando assim a ocorrência de infecção cruzada.

Para a terceira etapa (indução de estomatite protética em imunocompetentes sob antibioticoterapia), os animais receberam os mesmos cuidados da segunda etapa, com a diferença que foi adicionada tetraciclina (Amanda Manipulações Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR) na água de beber na concentração de 0,83 mg/mL.⁶⁷⁻⁶⁹ Os animais receberam a água com antibiótico sete dias antes da inoculação de *Candida* e instalação de dispositivos contaminados e durante o período de indução da estomatite protética.³⁶ O consumo de água era verificado diariamente e o líquido era repostado antes de acabar.

Para a manipulação dos animais, 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.

Os animais foram submetidos à anestesia geral através da administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina 75 mg/Kg (Ketalex; Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, 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 condições como a quantidade de água e ração consumidas e 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.^{70,71}

Como critério de inclusão, os ratos não deveriam apresentar *C. albicans* em suas cavidades bucais anteriormente ao início do experimento.³⁴ Com os animais sedados, 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.³⁴ As placas foram, então, incubadas em estufa 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* em placas de *Candida* CHROMagar®. Os animais que apresentaram inicialmente *Candida* foram substituídos. Neste método, as colônias de *C. albicans* e *C. dubliniensis* aparecem com coloração verde.⁷²

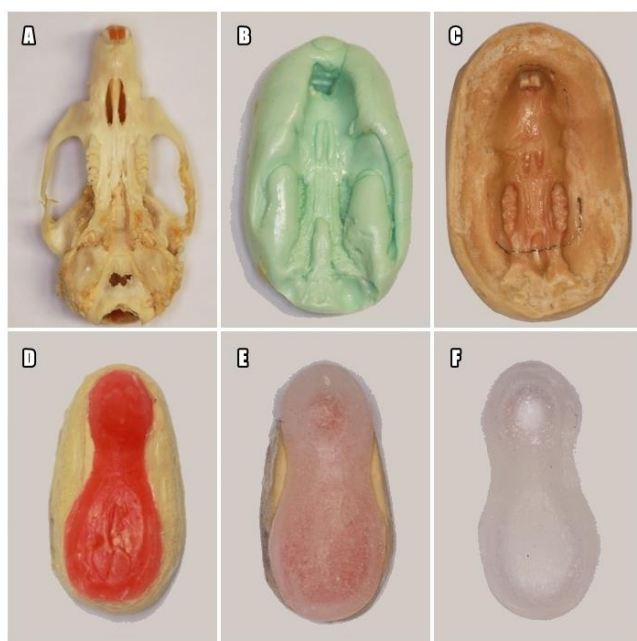
4.2 CONFECÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS

A partir de um crânio seco de um rato, utilizado durante o estudo piloto, com tamanho compatível aos dos animais que seriam 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 (Figura 1A) foi moldada utilizando silicone por condensação de consistência pesada (Zetaplus; Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália) e o molde obtido (Figura 1B) foi vazado com gesso pedra especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ) (Figura 1C). 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 (Figura 1D). A resina acrílica autopolimerizável foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante e, então, acomodada sobre o modelo (Figura 1E). Após a polimerização, foi realizado o acabamento e o polimento das bordas da moldeira (Figura 1F) com brocas de tungstênio maxi-cutt e mini-cutt (Dhpro, Rhadartrade, Paraguá, PR).

Após sedação, os animais eram mantidos estabilizados em um suporte de isopor envolto por papel alumínio e moldados utilizando poliéter (Impregum F; 3M do Brasil, Campinas, SP) (Figura 2A). Após os procedimentos de moldagem, os ratos eram alojados em caixas e monitorados quanto à recuperação pós-anestésica, observando os padrões respiratório e cardiovascular.⁷³ Os moldes obtidos (Figura 2B) foram, então, vazados com gesso pedra tipo IV.⁵⁵

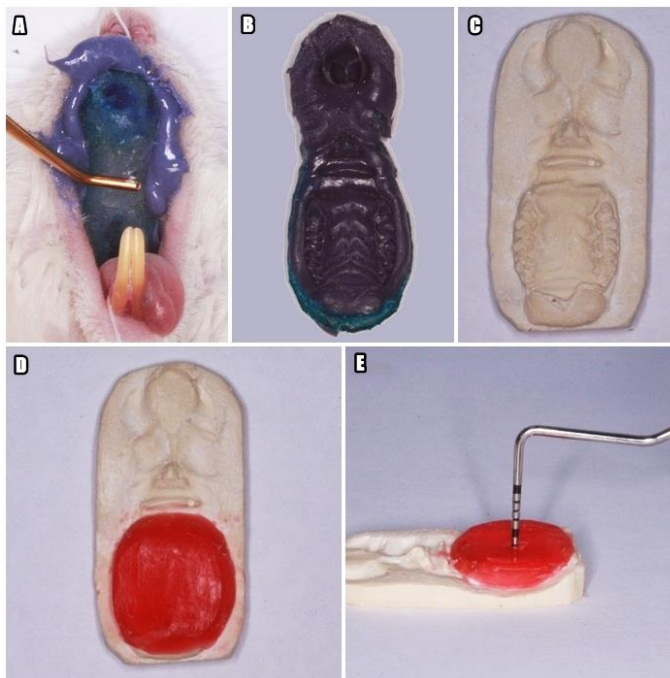
A extensão do dispositivo foi delimitada no modelo de trabalho (Figura 2C) e seu enceramento foi feito de maneira que se apresentasse liso e plano (Figura 2D), com 3 mm de espessura⁷⁴ na região do palato e com 2 mm nas faces vestibulares dos molares. A espessura da cera era conferida utilizando sonda periodontal milimetrada (Figura 2E).

FIGURA 1 – Confecção das moldeiras individuais. A: Crânio seco de um rato; B: Molde e C: Modelo anatômico da maxila; D: Modelo aliviado com cera; E: Resina acrílica sobre o modelo aliviado; F: Moldeira individual após acabamento e polimento



Fonte: O autor.

FIGURA 2 – Moldagem, vazamento e enceramento dos modelos de trabalho. A: Moldagem de trabalho; B: Molde e C: Modelo de trabalho; D: Enceramento e E: Conferência da espessura da cera



Fonte: O autor.

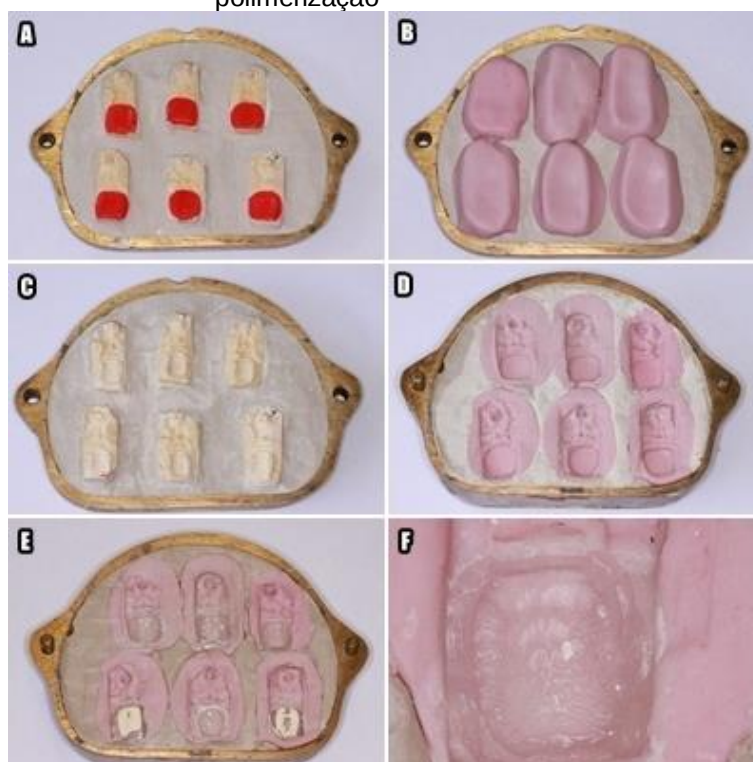
Os modelos de trabalho encerados foram incluídos convencionalmente com gesso pedra tipo III (Herodent; Vigodent S.A. Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP) em mufla metálica nº 6 (OGP Prod. Odontol. Ltda., São Paulo, SP) (Figura 3A), sendo confeccionada uma muralha de silicone por condensação de consistência densa para uso laboratorial (Zetalabor; Zhermack) ao redor do modelo (Figura 3B).⁵⁵

Após a eliminação da cera (Figura 3C), 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 3D). 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) de acordo com as recomendações do fabricante.

As muflas foram resfriadas em bancada por 30 min e em água corrente por 15 min.⁷⁵ Após demuflagem (Figuras 3E e 3F), os dispositivos foram removidos cuidadosamente dos modelos e seu acabamento foi feito com broca de tungstênio cilíndrica do tipo mini-cut (Dhpro) (Figura 4A). A fim de reproduzir a rugosidade da

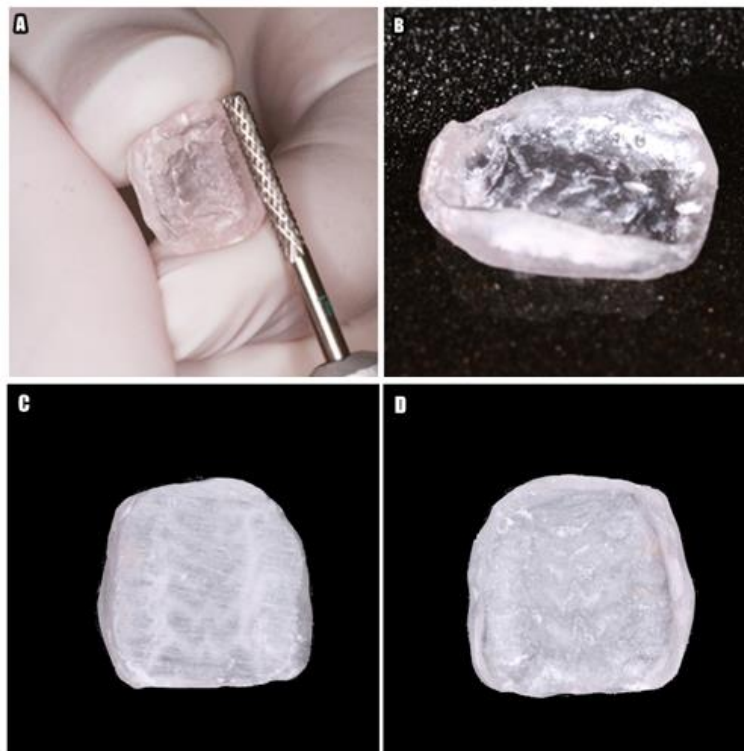
superfície das próteses totais, os dispositivos tiveram sua superfície externa polida utilizando lixas d'água (Figura 4D) de granulação 100 e 200 (3M do Brasil) até que apresentassem rugosidade entre 1 a 2 μm ⁷⁶ confirmada por leitura em rugosímetro de bancada (Surfcorder SE 1700; Kozaka Industry, Kozaja, Japão) de diâmetro de ponta ativa 2 μm e precisão de 0,01 μm de resolução. O equipamento foi calibrado a um comprimento de 0,8 mm, 2,4 mm de percurso de medida, a uma velocidade de 0,5 mm/s de ida e 1 mm/s de volta. Foram realizadas três mensurações de rugosidade (Ra) em diferentes regiões da superfície externa dos dispositivos, obtendo-se uma média aritmética que equivaleu ao valor médio de rugosidade de superfície para cada dispositivo.⁷⁷

FIGURA 3 – Inclusão em mufla e polimerização dos dispositivos acrílicos. 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



Fonte: O autor.

FIGURA 4 – Acabamento e planificação dos dispositivos. 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



Fonte: O autor.

Em seguida, os dispositivos intra-orais foram lavados com escova dental de cerdas macias (Tek® 30; Johnson & Johnson do Brasil, São Paulo, SP) e sabão de coco a fim de se promover a limpeza da superfície acrílica, simulando condições clínicas.⁷⁸ Os dispositivos acrílicos foram, então, mantidos em água destilada a 37°C em estufa por 48 h.⁷⁵

4.3 ESTERILIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS

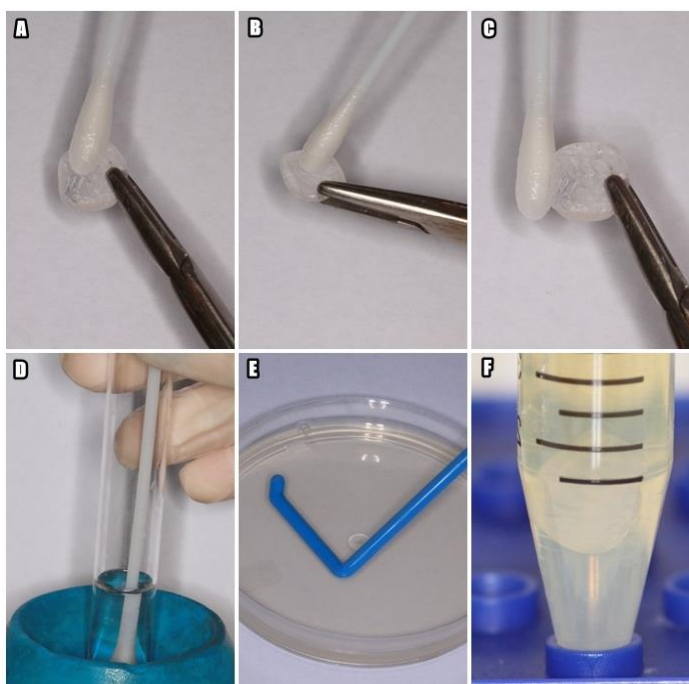
Dispositivos acrílicos palatais (n=5) foram confeccionados e submetidos a um dos grupos experimentais a seguir:

1. Micro-ondas (MO): irradiação com energia de micro-ondas (MEF 41; Electrolux, Manaus, AM) a 650 W por 3 min, estando o dispositivo imerso em 200 mL de água destilada estéril;⁷⁹
2. Luz ultravioleta (UV): exposição à luz ultravioleta (2400 J/cm², 60 Hz) durante 20 min em cada face do dispositivo, interna ou externa;⁸⁰

3. Ultrassom (US): imersão em banho de ultrassom (0,17 kW, 0,8 A, 42 kHz; Ultrasonic Cleaner 1440D, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP) com água destilada estéril durante 20 min;⁸¹
4. Controle negativo (CN): nenhum procedimento de esterilização testado.

Após submissão a um dos grupos experimentais, foram feitas coletas de todas as faces dos dispositivos utilizando *swabs* estéreis previamente embebidos em PBS estéril (Figuras 5A a 5C). Realizadas as coletas, os *swabs* foram novamente imersos em tubos de ensaio contendo 2 mL de PBS e, então, agitados em vórtex por 30 s para homogeneização (Figura 5D). Uma alíquota de 100 μ L foi removida dessa solução e semeada em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton (Difco®, Detroit, Michigan, EUA) (Figura 5E). Os dispositivos foram, então, imersos em tubos de Falcon (TPP®; Techno Plastic Prod., Trasadingen, SH, Suíça) contendo 5 mL de meio de cultura BHI (Figura 5F). As placas de Petri e os tubos de Falcon foram armazenados em estufa microbiológica a 37°C por 48 h.

FIGURA 5 – Testes de esterilidade dos dispositivos. A-C: Coletas do material da superfície dos dispositivos; D: Homogeneização em vórtex; E: Semeadura em placa de Petri; F: Imersão dos dispositivos em meio de cultura



Fonte: O autor.

Passado esse período, as placas de Petri foram avaliadas visualmente e uma alíquota de 150 µL dos caldos foi transferida para uma placa de 96 poços (TPP®) para análise em espectrofotômetro (mod. Ultrospec 1000a; Amersham Pharmacia Biotech Inc. - Molecular Dynamics Div., Piscataway, NJ, EUA) a 450 nm. Após essa primeira leitura, foram adicionados 50 µL do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ) em cada poço para verificação da viabilidade microbiana. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE *C. albicans*

Foi utilizada a cepa parental (*wild-type*) de *C. albicans* SC5314.¹⁵ As células foram mantidas a -80°C em solução de caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) contendo 20% de glicerol (Kasvi Imp. e Dist.).⁸² Previamente à confecção do inóculo, uma alçada da cepa descongelada (Figura 6A) foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura YEPD Agar (Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, EUA) que permaneceu incubada a 37°C durante 48 h em estufa bacteriológica.⁸³ Então, uma colônia de *C. albicans* foi removida da placa (Figura 6B), 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.

Para a lavagem das células, os tubos de Falcon foram centrifugados (mod. 5804 R; Eppendorf do Brazil Ltda., São Paulo, SP) a 4.000 rpm a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de PBS foram adicionados ao *pellet* (Figura 6D). O conteúdo foi homogeneizado em vórtex e então centrifugado nas mesmas condições. Esse processo repetiu-se mais uma vez^{84,85} e, ao *pellet* final obtido, foram adicionados 20 mL de PBS estéril (Figura 6E).

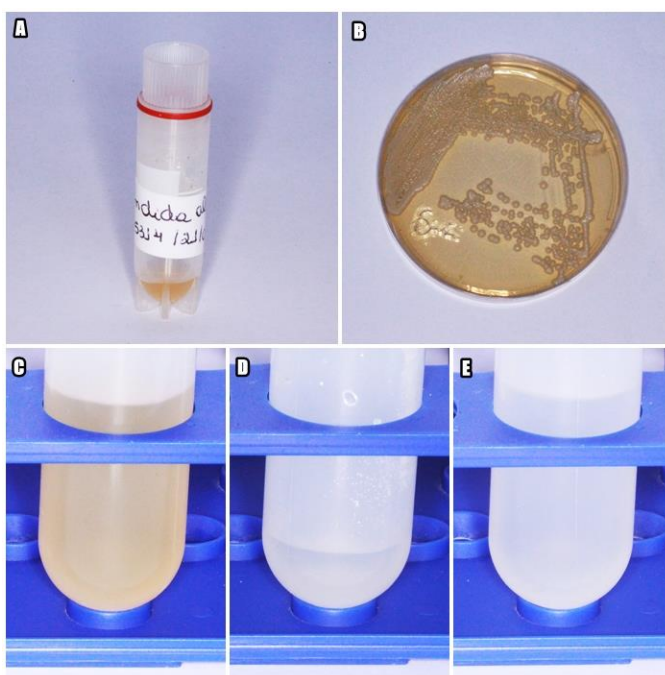
O conteúdo foi novamente homogeneizado em vórtex e, então, diluições seriadas foram feitas nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-4} . Semeou-se 25 µL dessas suspensões em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco®). Este procedimento foi feito em triplicata. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 h para a contagem das unidades formadoras de colônias de *C. albicans* (Figura 7). Em seguida, os resultados foram transformados para UFC/mL a partir da Equação 1:

$$UFC/mL = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

(1)

na qual, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição durante a semeadura das placas.

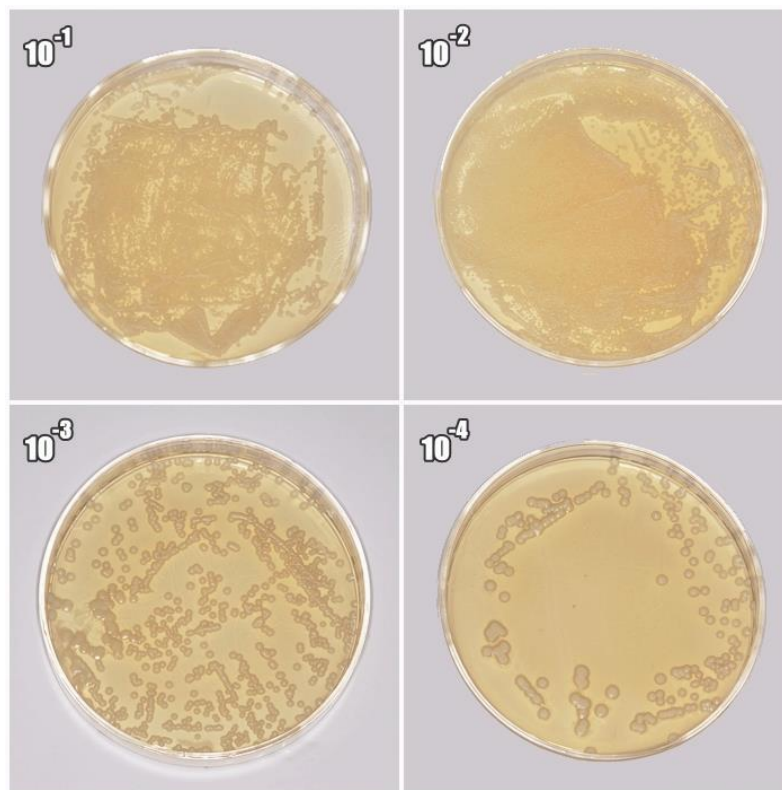
FIGURA 6 – Preparo do inóculo. A: Cepa descongelada; B: Crescimento fúngico em ágar YEPD; C: Transferência de uma colônia de *C. albicans* para 20 mL de caldo YEPD; D: Lavagem do *pellet* em PBS estéril; E: Inóculo



Fonte: O autor.

Com base nos resultados, determinou-se que a diluição 10^{-4} (Figura 7) foi a ideal para a contagem e cálculo das UFC/mL.

FIGURA 7 - Placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e o crescimento fúngico resultante das diluições seriadas



Fonte: O autor.

4.5 CONTAMINAÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAI

Após esterilização em forno micro-ondas a 650 W por 3 min, os dispositivos acrílicos foram contaminados com um biofilme de *C. albicans* visando reproduzir a condição clínica das próteses dos pacientes com estomatite protética.

Para a adesão celular, cada dispositivo foi colocado individualmente em um orifício de uma placa de cultura de 24 poços (TPP®), com sua superfície externa voltada para o fundo do poço, sendo imerso em 2 mL do inóculo. As placas de cultura foram colocadas em 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.^{86,87} Em seguida, as células não aderidas foram removidas por meio de imersão suave, em duplicata, dos dispositivos em 2 mL de PBS. Os dispositivos foram 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 24 h a 37°C. Na sequência, o meio de cultura foi removido e substituído por igual volume de meio RPMI-1640 novo para uma nova incubação por 24 h nas mesmas condições.^{88,89} Após as 48 h de

incubação, um biofilme maduro formou-se em cada dispositivo (Figura 8).⁹⁰ Finalmente, os dispositivos foram lavados gentilmente em 2 mL de PBS em duplicata.⁸⁸

FIGURA 8 – Dispositivos imersos no meio de cultura após período de formação de biofilme



Fonte: O autor.

4.6 CONFIRMAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DOS DISPOSITIVOS

4.6.1 Contagem de UFC/mL

Dispositivos contaminados (n=6) foram acondicionados em tubos de Falcon contendo 3 mL de PBS estéril.⁹¹ Em seguida, o biofilme formado foi disperso em banho com ultrassom (0,17 kW, 0,8 A, 42 kHz) por 2 min. Após homogeneização em vórtex, alíquotas com diluições seriadas até a concentração 10^{-5} foram plaqueadas em ágar Sabouraud Dextrose para determinação do número de UFC/mL após 48 h de incubação em estufa a 37°C,⁸⁸ utilizando a Equação 1.

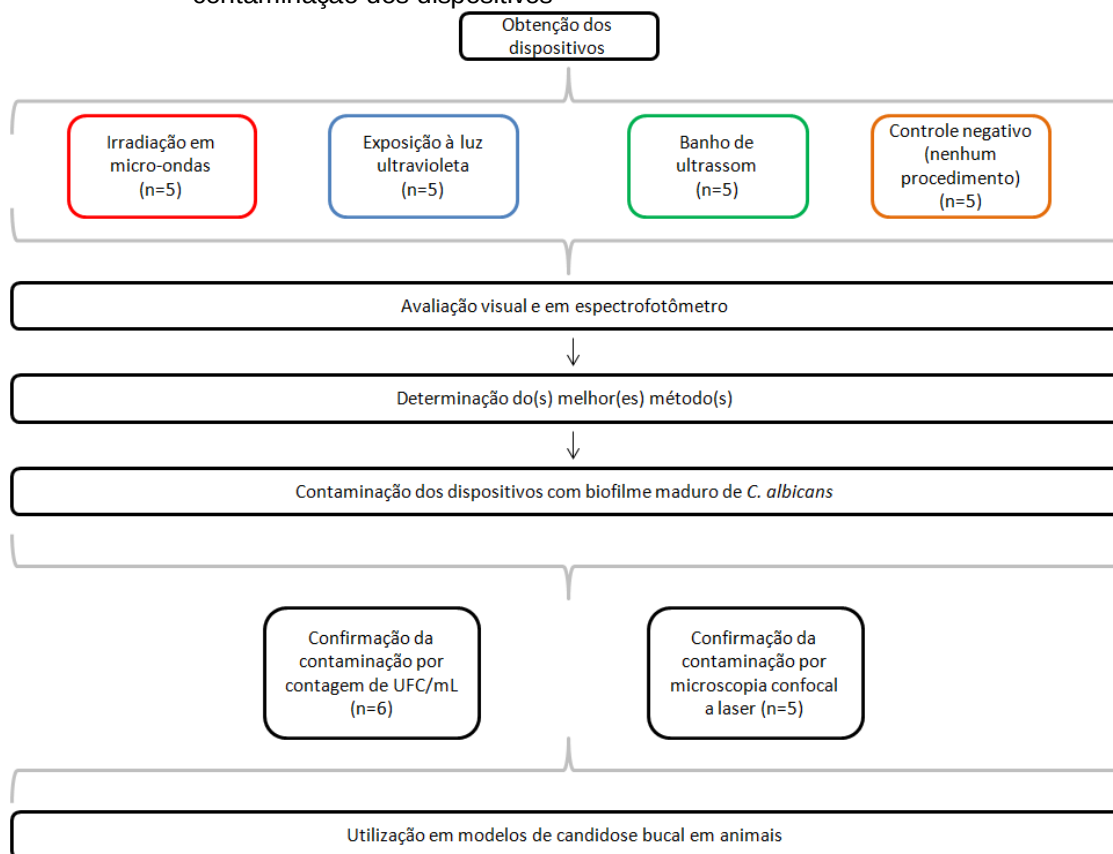
4.6.2 Análise em microscopia de varredura confocal a laser

Dispositivos contaminados adicionais (n=5) foram transferidos individualmente para um placa de cultura de 24 poços contendo 1 µL de SYTO-9 (Molecular Probes; Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo, SP) e 1 µL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) diluídos em 1 mL de PBS.⁹² Para permitir a difusão dos fluorocromos no biofilme, os espécimes foram mantidos em repouso na solução, na ausência de luz, durante 20 min em estufa a 37°C.¹⁵ Em seguida, cada dispositivo foi colocado sobre uma lamínula de vidro para análise do biofilme em microscópio confocal a laser (Leica LAS AF; Leica Microsystems GmbH), utilizando uma objetiva

(40x; abertura máxima de 1,15). As imagens foram obtidas usando um *software* (Leica LAS AF), padronizado em três campos diferentes. Duas imagens foram obtidas sequencialmente a partir de cada secção, com excitação de 488 nm para o SYTO-9 e 532 nm para o iodeto de propídio. Estas duas imagens foram combinadas e, então, células viáveis (fluorescência verde, comprimento de emissão = 500 nm) e não viáveis (fluorescência vermelha, comprimento de emissão = 635 nm) puderam ser observadas simultaneamente em cada campo de cada dispositivo.^{15,92}

O fluxograma da primeira etapa do Estudo I está exibido na Figura 9.

FIGURA 9 – Fluxograma da primeira etapa do Estudo I, referente à esterilização e contaminação dos dispositivos



Fonte: O autor.

4.7 AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DA CANDIDOSE BUCAL INDUZIDA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES

A segunda etapa do Estudo I contou com cinco grupos experimentais (n=4):

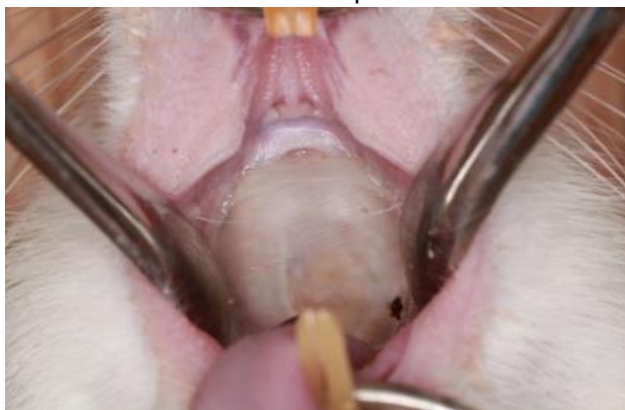
1. Controle negativo (Cn): animais saudáveis sem indução de candidose;

2. Dispositivo intra-oral (Di): animais submetidos à cimentação na região dos molares superiores do dispositivo intra-oral, o qual foi mantido em posição por 4 dias;
3. Inoculação (In): animais submetidos à inoculação oral de suspensão padronizada de *C. albicans* (média de $2,6 \times 10^7$ UFC/mL) no palato utilizando swabs estéreis por 3 dias consecutivos, sem a instalação do dispositivo;
4. Dispositivo intra-oral contaminado (Dc): animais submetidos à cimentação do dispositivo intra-oral contaminado com *C. albicans* (média de $2,6 \times 10^7$ UFC/mL), o qual foi mantido em posição por 4 dias;
5. Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado (In+Dc): junção dos protocolos aplicados nos grupos In e Dc.

Nesta etapa durante a indução da candidose bucal, a sedação dos animais foi complementada administrando intraperitonealmente maleato de acepromazina 1% (Apromazin 1%; Syntec, Santana de Parnaíba, SP) na dose de 0,01 mL para cada 100 g do animal, a fim de mantê-los sedados por pelo menos 2 h.

É importante ressaltar que, após sua obtenção, os dispositivos acrílicos intra-orais eram levados em posição na cavidade bucal dos animais sedados e sua adaptação era avaliada por meio de moldagem da sua superfície interna em contato com a mucosa palatal do animal utilizando silicone polimerizado por condensação de consistência leve (Oranwash L; Zhermack). Somente aqueles dispositivos que apresentassem um filme fino indicativo de contato total com a mucosa palatal eram contaminados e cimentados nos molares superiores do animal utilizando cimento resinoso autoadesivo RelyX™ U200 (3M ESPE; St. Paul, EUA) (Figura 10). Tal material foi selecionado baseando-se nos resultados do estudo piloto, que avaliou a estabilidade de dispositivos fixados com resina acrílica autopolimerizável Vipi Flash, resina acrílica autopolimerizável Duralay (Reliance Dental Mfg. Co., Alsip, IL, EUA) e com o cimento Relyx™ U200. Os dispositivos que foram fixados com a resina acrílica Duralay foram encontrados soltos nas cavidades bucais dos animais dois dias após sua fixação. Durante a fixação dos dispositivos com a resina acrílica Vipi Flash, foi notado seu escoamento para a região central dos dispositivos, o que viria a interferir no contato de *Candida* com o palato.

FIGURA 10 - Cimentação do dispositivo nos molares superiores do rato



Fonte: O autor.

Antes da recuperação da anestesia, os ratos tiveram suas unhas cortadas, a fim de evitar que os mesmos se machucassem ao tentar remover os dispositivos.⁹³

Para os animais que foram inoculados oralmente com blastóporos de *C. albicans* (grupos In e In + Dc), swabs estéreis foram embebidos na suspensão com o inóculo padronizado de *C. albicans* e esfregados sobre o palato dos animais por 30 s⁹⁴. No caso do grupo In, esse procedimento foi repetido por três dias consecutivos.^{35,37,38} Para o grupo In+Dc, a inoculação foi feita apenas uma vez, imediatamente antes da cimentação do dispositivo contaminado no palato dos animais.

Os animais permaneceram com o dispositivo em posição na cavidade bucal por 4 dias³⁴ e, então, os dispositivos foram removidos (Figura 11).

FIGURA 11 - Dispositivo após remoção



Fonte: O autor.

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

4.7.1 Análise visual

Os animais foram posicionados em uma maca estabilizadora 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 12). A mucosa palatal e a língua dos animais foram fotografadas no início do experimento, após o período de indução da candidose bucal em cada grupo (grupos Dc e In+DC: após quatro dias de uso dos dispositivos; grupo In: após inoculação da suspensão por três dias consecutivos) (T0), dois (T1) e quatro dias (T2) após a indução da candidose e antes da eutanásia (T3). Para a avaliação do palato, foram atribuídos escores para a severidade da inflamação de acordo com a classificação de Newton:⁹ 0 (sem inflamação); 1 (eritema puntiforme); 2 (eritema difuso); 3 (eritema difuso, edema e hiperplasia papilar).³⁴ Para a análise macroscópica da língua, a confirmação da presença de candidose foi feita pela observação de áreas localizadas de atrofia papilar.³⁷

FIGURA 12 - Posicionamento dos animais em maca estabilizadora e utilização de mesa estativa para obtenção de fotografias padronizadas



Fonte: O autor.

4.7.2 Contagem de UFC/mL

Para isso, foi coletado o biofilme da mucosa palatal dos animais utilizando swabs estéreis (Figura 13) e foram seguidos os mesmos procedimentos descritos no item 4.6.1, entretanto, o ágar Sabouraud Dextrose foi suplementado com cloranfenicol 0,1 mg/mL e a diluição utilizada para a contagem foi 10^{-1} . As coletas foram feitas nos mesmos períodos em que foram obtidas as fotografias.

FIGURA 13 - Coleta de biofilme na mucosa palatal do animal



Fonte: O autor.

4.7.3 Análise histopatológica

Após as coletas e fotografias no período experimental T3, a eutanásia foi realizada por deslocamento cervical e confirmada ao se verificar ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos dos animais.⁷⁰

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.⁵⁵

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

4.7.3.1 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 em parafina e a microtomia foram realizados conforme protocolos do Laboratório de Processamento Histológico da UEPG (ANEXOS B e C).

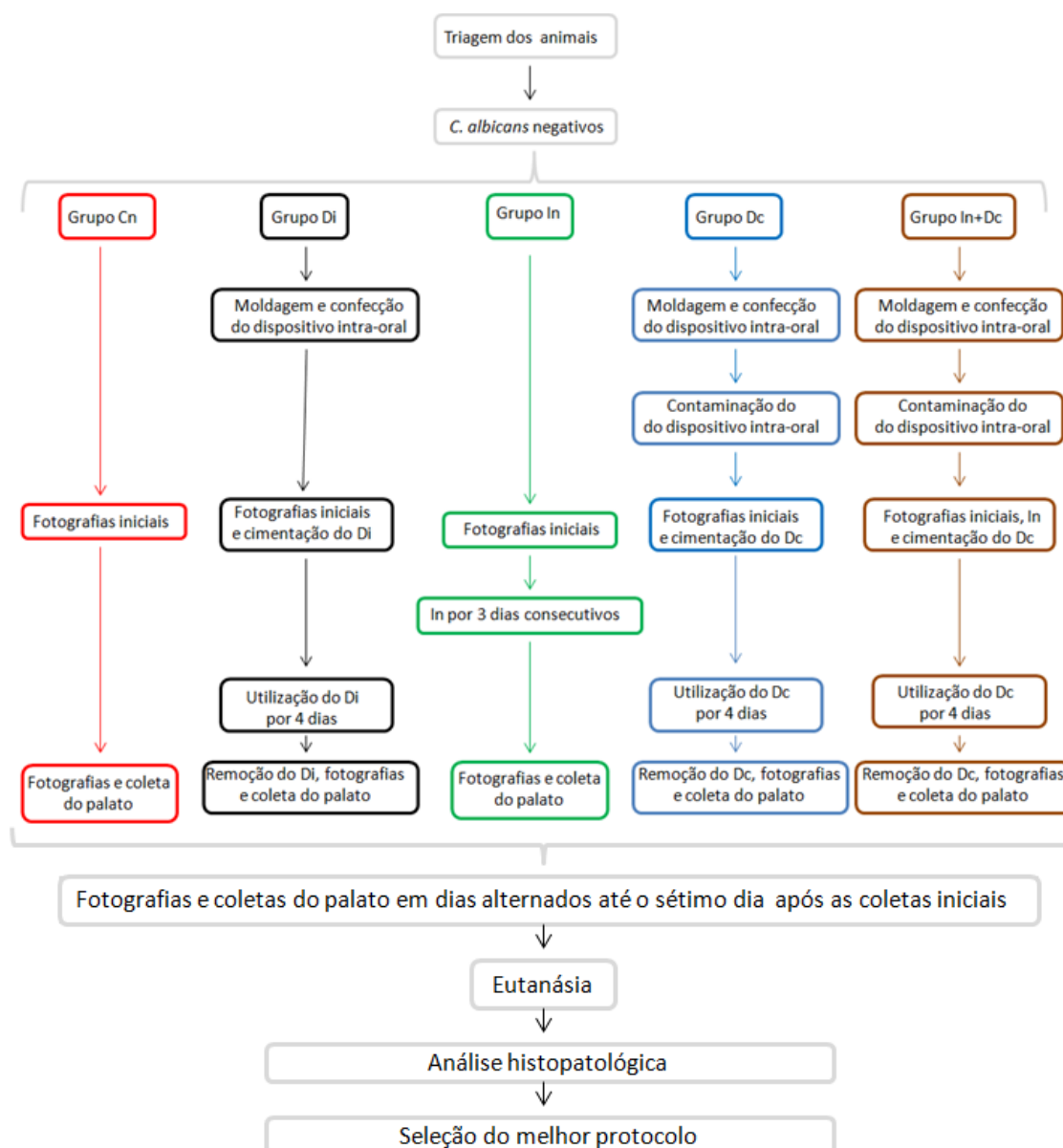
As lâminas com cortes de 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (H.E.; ANEXO D) (Nuclear, Diadema, SP) e ácido periódico de Schiff (PAS; ANEXO E) (Nuclear), também seguindo protocolo preconizado pelo laboratório.

4.7.3.2 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 as lentes objetivas de diferentes magnificações. Foi investigado 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 despilação na língua.^{36-38,95}

O fluxograma da segunda etapa do Estudo I pode ser visualizado na Figura 14.

FIGURA 14 - Fluxograma da segunda etapa do Estudo I, referente à indução de candidose bucal em animais imunocompetentes



Fonte: O autor.

Cn: Controle negativo; Di: Dispositivo intra-oral; In: Inoculação; Dc: Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

4.8 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA

A terceira etapa do Estudo I foi realizada apenas com os grupos experimentais: Cn (n=2), Di (n=6) e In+Dc (n=6).

Todos os protocolos descritos na etapa anterior foram reproduzidos da mesma forma nesta etapa, exceto que a suspensão de *C. albicans* para a inoculação oral foi preparada na concentração aproximada de 2×10^8 UFC/mL. Além disso, administrou-se 0,83 mg/mL de tetraciclina na água de beber dos animais. A

antibioticoterapia iniciou-se sete dias antes do experimento e continuou até o momento da eutanásia.

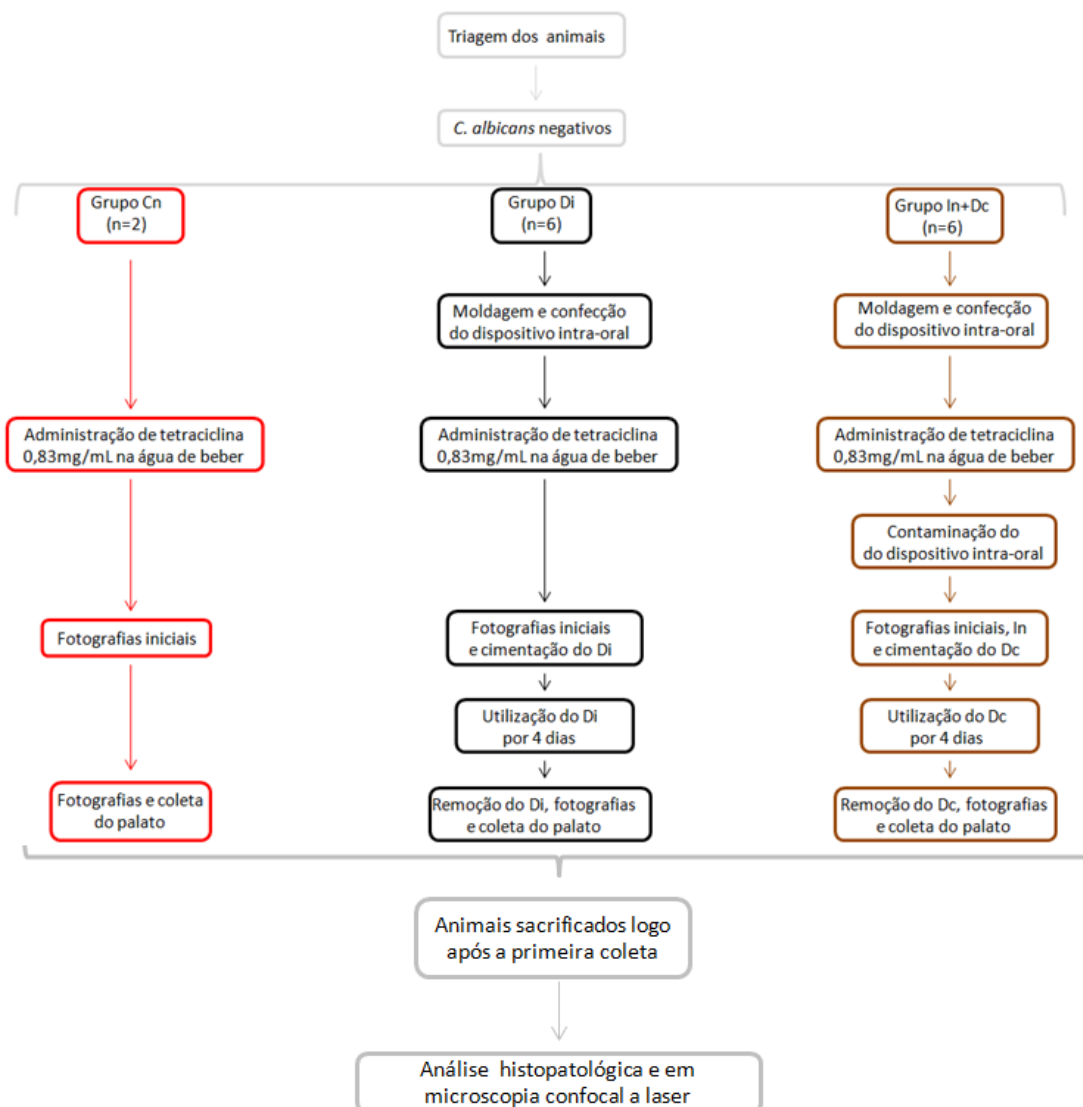
As fotografias padronizadas da mucosa palatal e da língua e as coletas de biofilme da mucosa palatal para contagem de UFC viáveis foram feitas após o período de indução da estomatite protética (após quatro dias de uso dos dispositivos) e os animais foram eutanasiados logo em seguida.

Para verificar a viabilidade de *C. albicans* após o período de permanência do dispositivo na cavidade bucal dos animais, amostras do tecido palatino também foram analisadas em microscópio confocal a laser, da mesma forma descrita no item 4.6.2. Nessa etapa, optou-se por remover apenas a mucosa palatina para análise histopatológica, sem o tecido ósseo subjacente.

Os dispositivos do grupo In+Dc foram utilizados para verificar a presença de *C. albicans* após terem permanecido na cavidade bucal dos animais por quatro dias, por meio de contagem de UFC viáveis e análise em microscopia confocal a laser conforme descrito nos itens 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente.

O fluxograma da terceira etapa do Estudo I pode ser visualizado na Figura 15.

FIGURA 15 - Fluxograma da terceira etapa do Estudo I, referente à indução de estomatite protética em animais imunocompetentes sob antibioticoterapia



Fonte: O autor.

Cn: Controle negativo; Di: Dispositivo intra-oral; In+Dc: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado; Dc: Dispositivo intra-oral contaminado

4.9 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 os resultados da primeira etapa do Estudo I, análises do poder da amostra foram realizadas utilizando o *software* GPower 3.1 (G*Power; Universität Düsseldorf, Düsseldorf, North Rhine-Westphalia, Alemanha). Os resultados das leituras dos caldos em espectrofotômetro (mAbs) foram submetidos à análise de

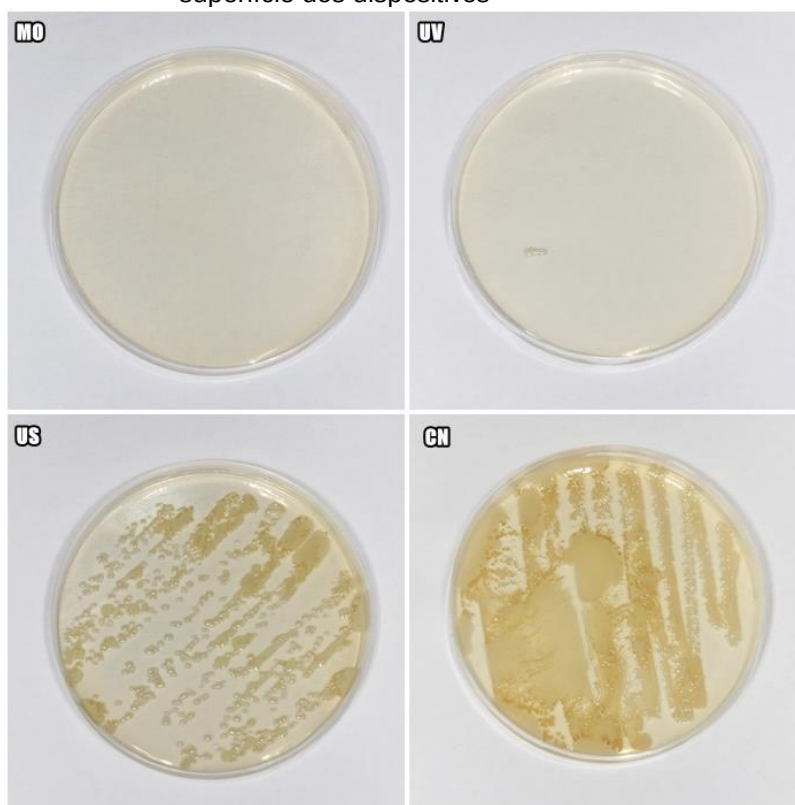
variância (ANOVA) fator único e teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$) (IBM SPSS 19; SPSS Inc.). Para a segunda etapa do Estudo I, o peso dos animais no início do experimento e antes da eutanásia foi comparado para cada grupo experimental utilizando a ANOVA 2-fatores com medidas repetidas ($\alpha=0,05$). Para os resultados da terceira etapa do Estudo I, o peso dos animais no início do experimento e antes da eutanásia foi comparado para cada grupo experimental utilizando a ANOVA 2-fatores com medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$). Para as segunda e terceira etapas do Estudo I, a recuperação de *C. albicans* a partir das coletas dos palatos e dispositivos foi apresentada na forma de estatística descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 ESTERILIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS

Os resultados da avaliação da viabilidade microbiana das placas de Petri podem ser observados na Figura 16 e Tabela 4. Os resultados da avaliação em espectrofotômetro podem ser visualizados nas Figuras 17 e 18.

FIGURA 16 - Placas de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton e semeadas com o material coletado da superfície dos dispositivos



Fonte: O autor.

MO: micro-ondas; UV: luz ultravioleta; US: ultrassom; CN: controle negativo

Tabela 4. Resultados da análise visual das placas de cultura

Grupo experimental	Crescimento microbiano				
	1° dispositivo	2° dispositivo	3° dispositivo	4° dispositivo	5° dispositivo
MO	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
UV	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + -
US	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
CN	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

Fonte: O autor.

MO: micro-ondas; UV: ultravioleta; US: ultrassom; CN: controle negativo

+: Presença de crescimento microbiano nas placas de Petri;

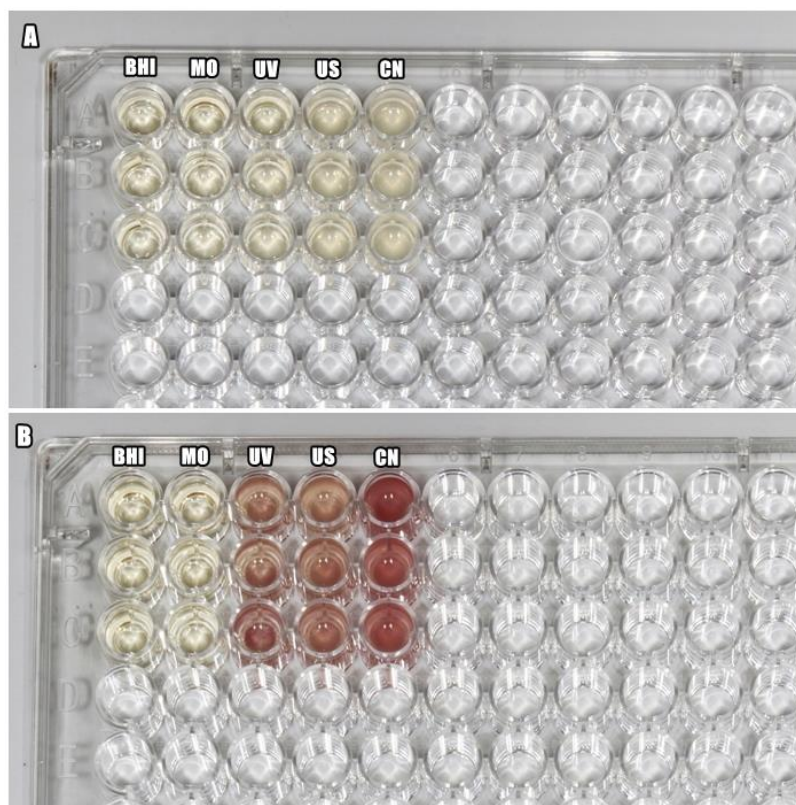
-: Ausência de crescimento microbiano nas placas de Petri;

Cada símbolo (+ ou -) representa uma placa (experimento feito em triplicata).

A partir dos resultados da Figura 16 e Tabela 4, é possível observar que apenas as coletas dos dispositivos do grupo MO não resultaram em crescimento microbiano visível nas placas de cultura.

Para o número de dispositivos confeccionados (n=5) para a avaliação da esterilização em espectrofotômetro, este estudo apresentou poder da amostra de 100% e poder do efeito de 2,72 ($\alpha=0,05$). A Figura 17 mostra as placas de cultura de 96 poços para análise da turbidez e viabilidade microbiana dos caldos nos quais os dispositivos foram imersos após serem submetidos aos diferentes métodos de esterilização testados. A Figura 18 apresenta os resultados das leituras em espectrofotômetro dos caldos com e sem a adição do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio para verificação da viabilidade microbiana.

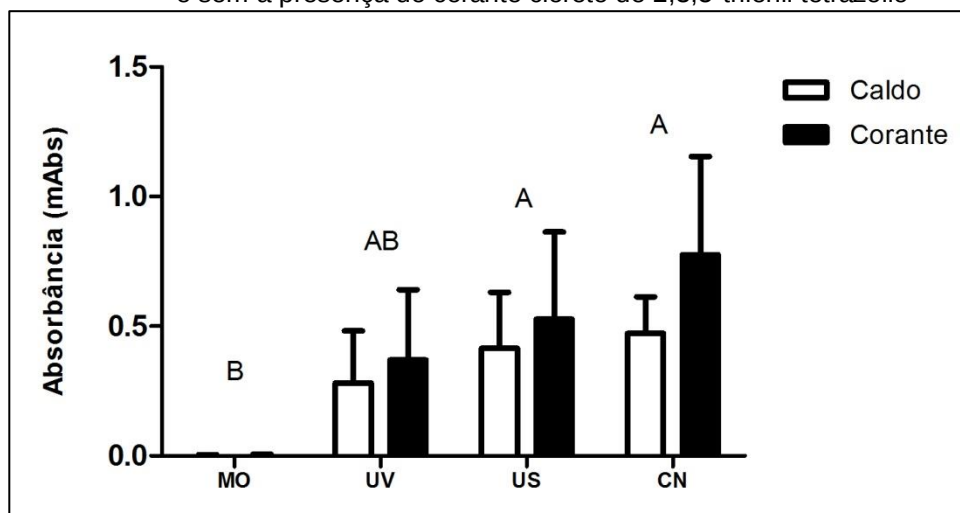
FIGURA 17 – Análise da esterilidade dos dispositivos em espectrofotômetro. Placas de 96 poços para análise em espectrofotômetro sem (A) e com (B) a presença do corante para verificação da viabilidade microbiana



Fonte: O autor.

BHI: caldo BHI estéril – controle positivo; MO: micro-ondas; UV: luz ultravioleta; US: ultrassom; CN: controle negativo

FIGURA 18 - Resultados da análise em espectrofotômetro (mAbs) dos caldos com e sem a presença do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio



Fonte: O autor.

Barras dos valores médios $\pm$ desvio padrão com letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA 1 fator e teste de Tukey).

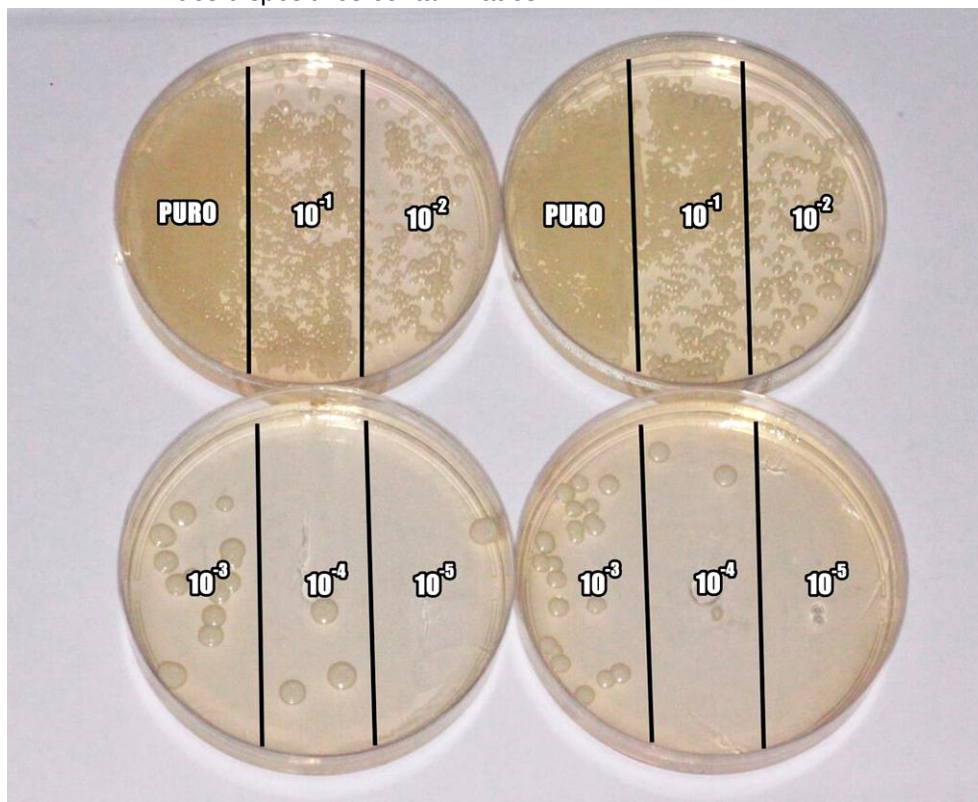
Foi possível observar que o grupo MO esterilizou os dispositivos palatais para uso em modelo animal, uma vez que apenas este grupo não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$) do controle positivo da esterilização (caldo BHI estéril) com ou sem a adição do corante para verificação da viabilidade microbiana. O grupo UV apresentou valores intermediários sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,71$ em comparação ao MO, $p=0,686$ em relação ao US e $p=0,804$ em relação ao controle negativo (CN)) de todos os grupos. Os grupos US e CN apresentaram os maiores valores de contaminação ($p=1,000$).

5.2 CONFIRMAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DOS DISPOSITIVOS

5.2.1 Contagem de UFC/mL

Os valores de contagem de UFC/mL a partir das sementeiras dos seis dispositivos contaminados utilizados nesta etapa do Estudo I foram em média $1,2 \times 10^6$ UFC/mL ($\pm 0,76 \times 10^6$ UFC/mL). A Figura 19 ilustra algumas placas com diluições seriadas para contagem das UFC/mL desses dispositivos. A contagem das colônias foi possível na diluição 10^{-3} .

FIGURA 19 - Placas com diluições seriadas para contagem das UFC/mL a partir dos dispositivos contaminados

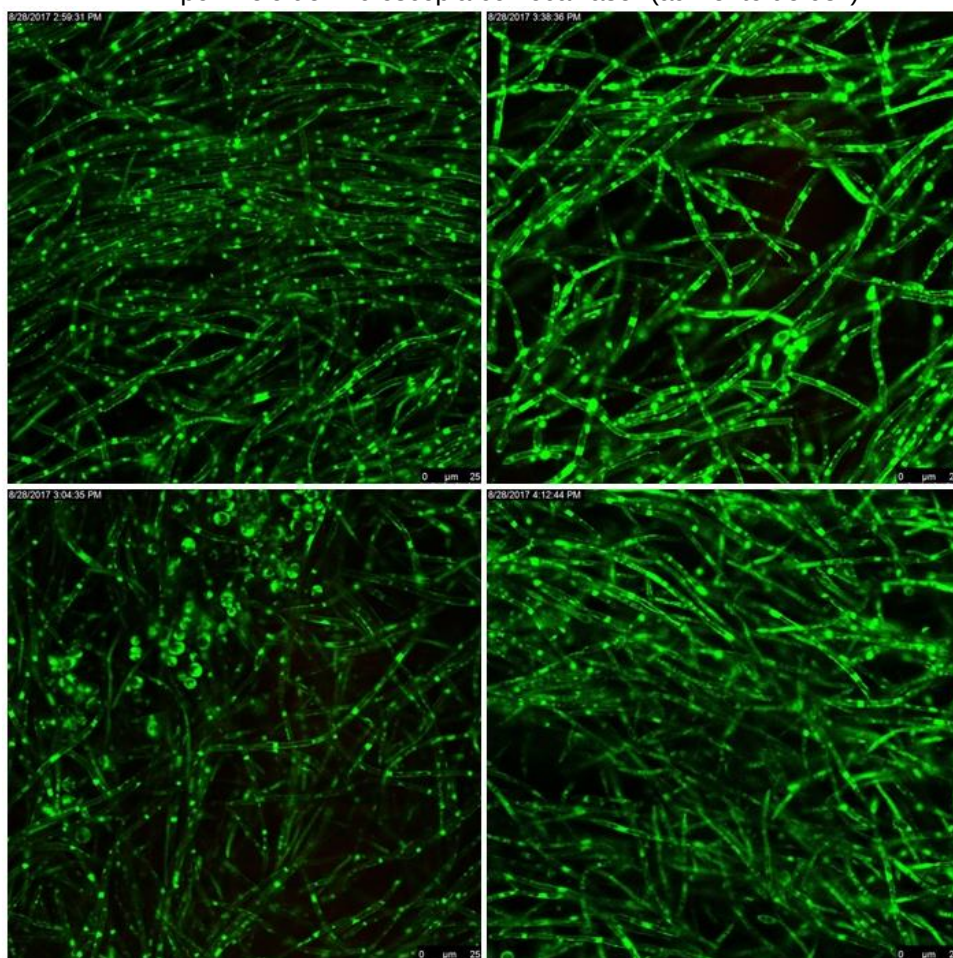


Fonte: O autor.

5.2.2 Análise em microscopia de varredura confocal a laser

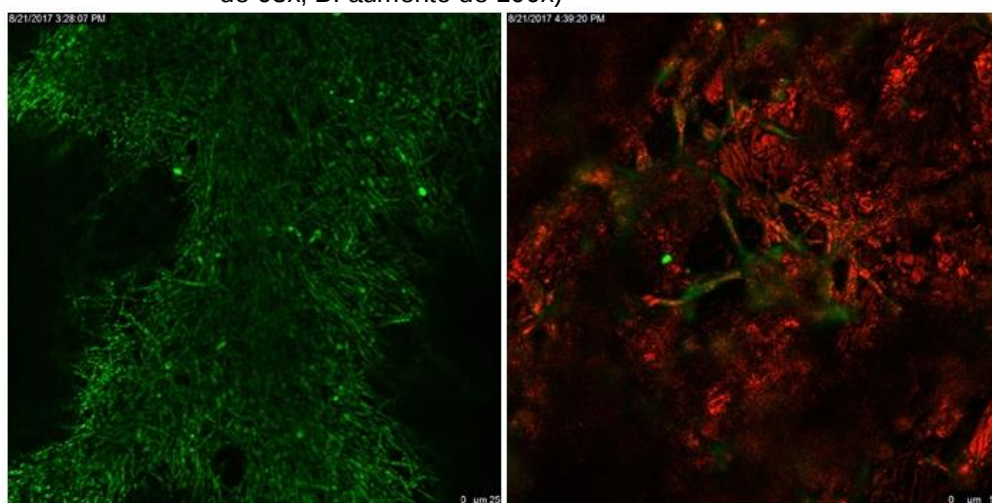
Foi possível observar a presença de formas filamentosas de *Candida* viáveis aderidas à superfície externa dos dispositivos contaminados (Figura 20). Além disso, notou-se que ao empregar essa técnica, as imagens devem ser obtidas dentro de no máximo 25 min, visto que após esse período os microrganismos passam a se aglomerar e então morrem (Figura 21).

FIGURA 20 - Fotomicrografias obtidas de diferentes dispositivos contaminados por meio de microscopia confocal laser (aumento de 63x)



Fonte: O autor.

FIGURA 21 - Fotomicrografias apresentando a aglomeração e morte dos microrganismos após 25 min de exposição ao laser (A: aumento de 63x; B: aumento de 100x)



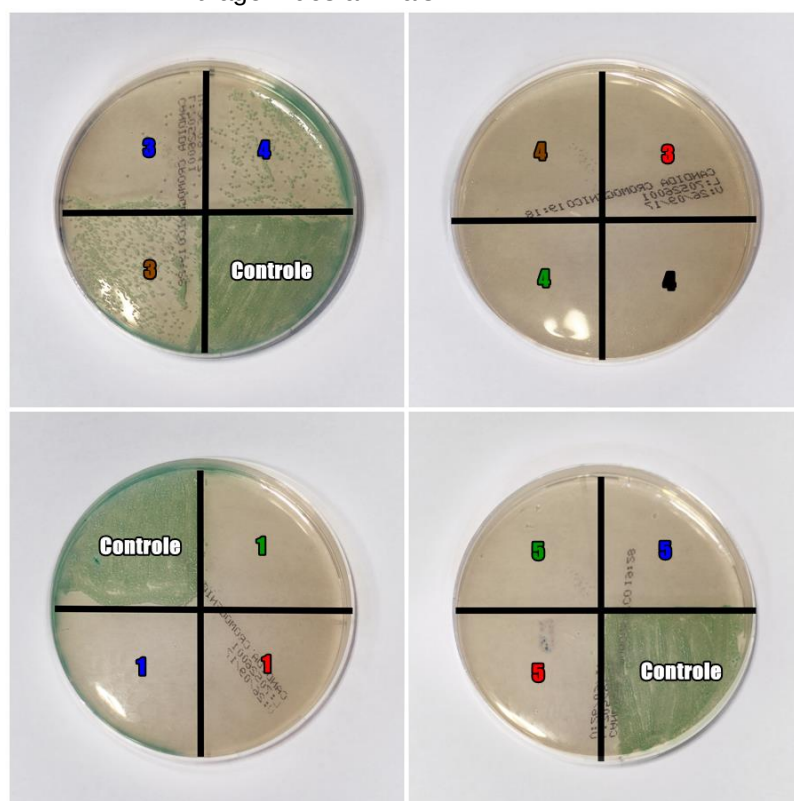
Fonte: O autor.

5.3 AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DA CANDIDOSE BUCAL INDUZIDA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES

5.3.1 Triagem dos animais

De 32 animais triados, seis apresentaram colônias presuntivas de *C. albicans* ou *C. dubliniensis* (18,75%) em sua cavidade bucal e foram substituídos. Placas com *Candida* CHROMagar® ilustrando os resultados das coletas para triagem dos animais podem ser observadas na Figura 22.

FIGURA 22 - Placas de *Candida* CHROMagar® utilizadas na triagem dos animais



Fonte: O autor.

Os animais foram identificados por números e cores diferentes.

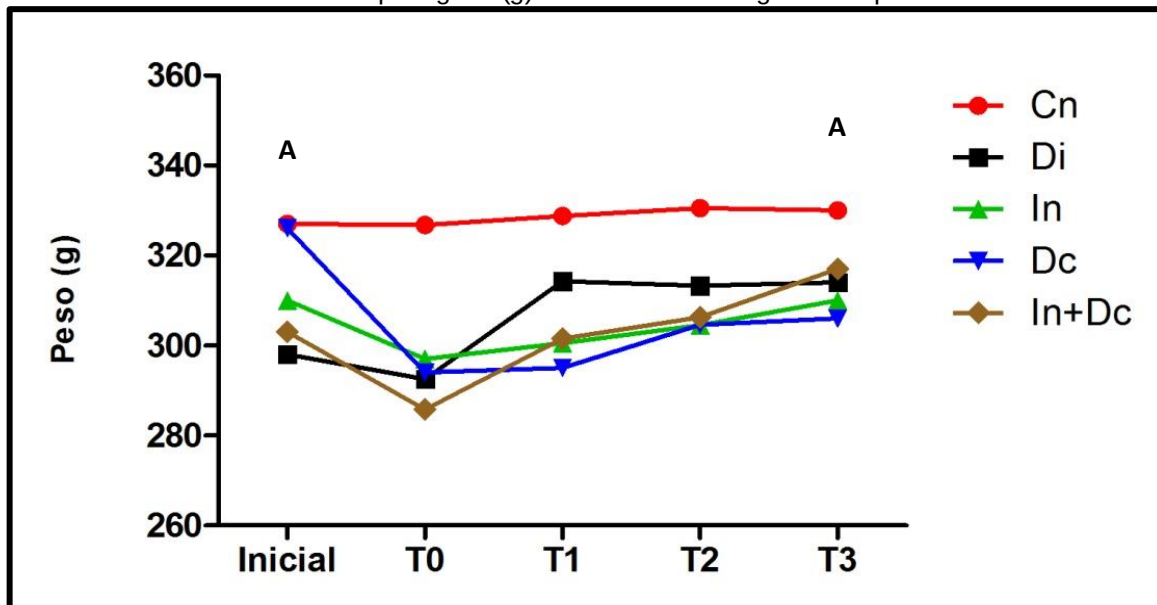
Controle: semeadura de 25 µL de suspensão de *C. albicans*

5.3.2 Monitoramento dos animais

Do total de 34 animais utilizados, três foram perdidos na complementação da sedação. 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, sem diferença notável entre os grupos. Não foi observada diferença significativa no peso dos animais entre os grupos experimentais como também não houve alteração significativa no seu

peso no decorrer do experimento (Figura 23; $p>0,05$). Ainda, nenhum animal mostrou-se debilitado no decorrer do experimento.

FIGURA 23 – Resultados das pesagens (g) dos animais na segunda etapa do Estudo I



Fonte: O autor.

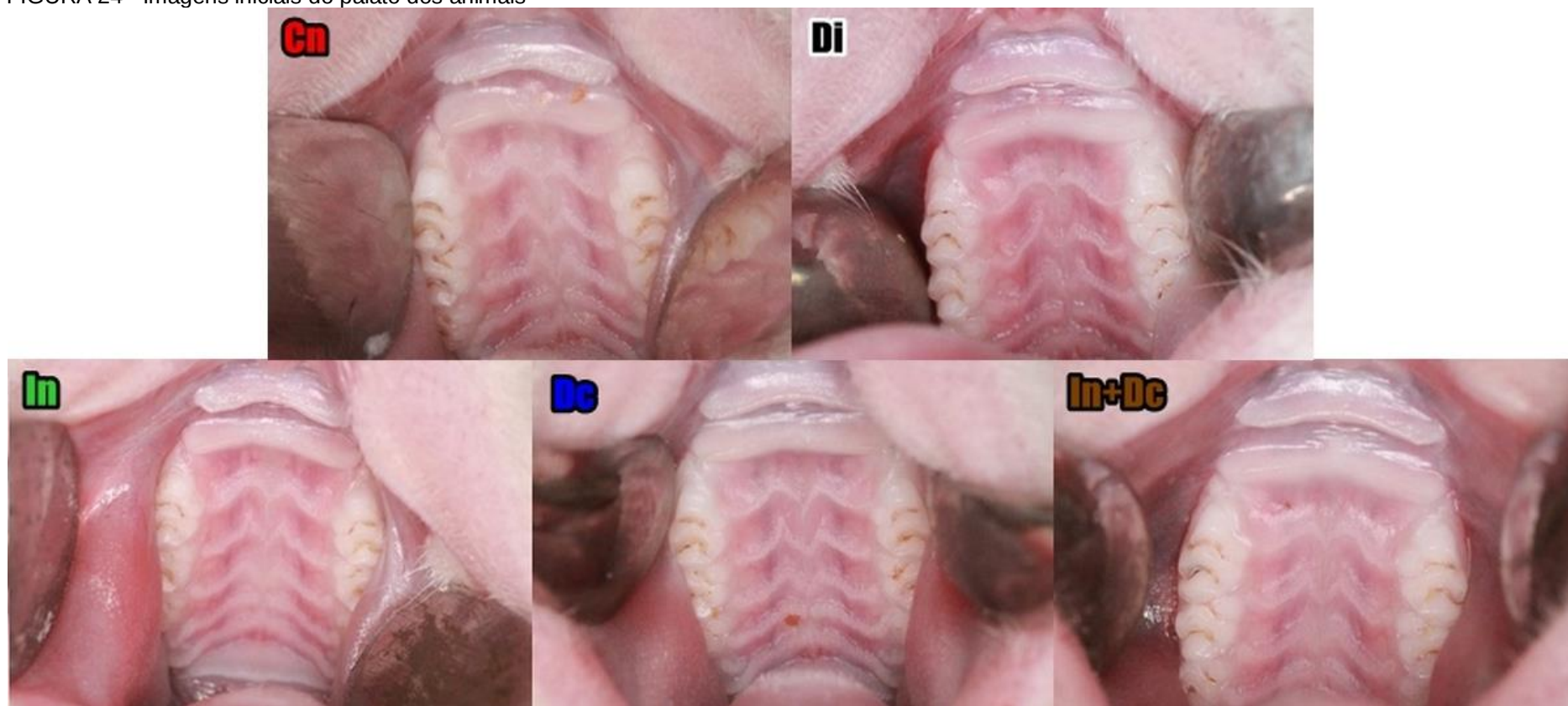
T0: após período de indução da candidose; T1: após 2 dias da indução da candidose; T2: após 4 dias da indução da candidose; T3: antes da eutanásia; Cn: Controle negativo; Di: Dispositivo intra-oral; In: Inoculação; Dc: Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

Sem diferença estatisticamente significativa (ANOVA 2-fatores de medidas repetidas)

5.3.3 Análise visual

Fotografias do palato representativas de cada grupo experimental podem ser visualizadas nas Figuras 24 a 28 (Inicial; T0; T1; T2 e T3, respectivamente) e da língua podem ser visualizadas nas Figuras 29 a 33 (Inicial; T0; T1; T2 e T3, respectivamente).

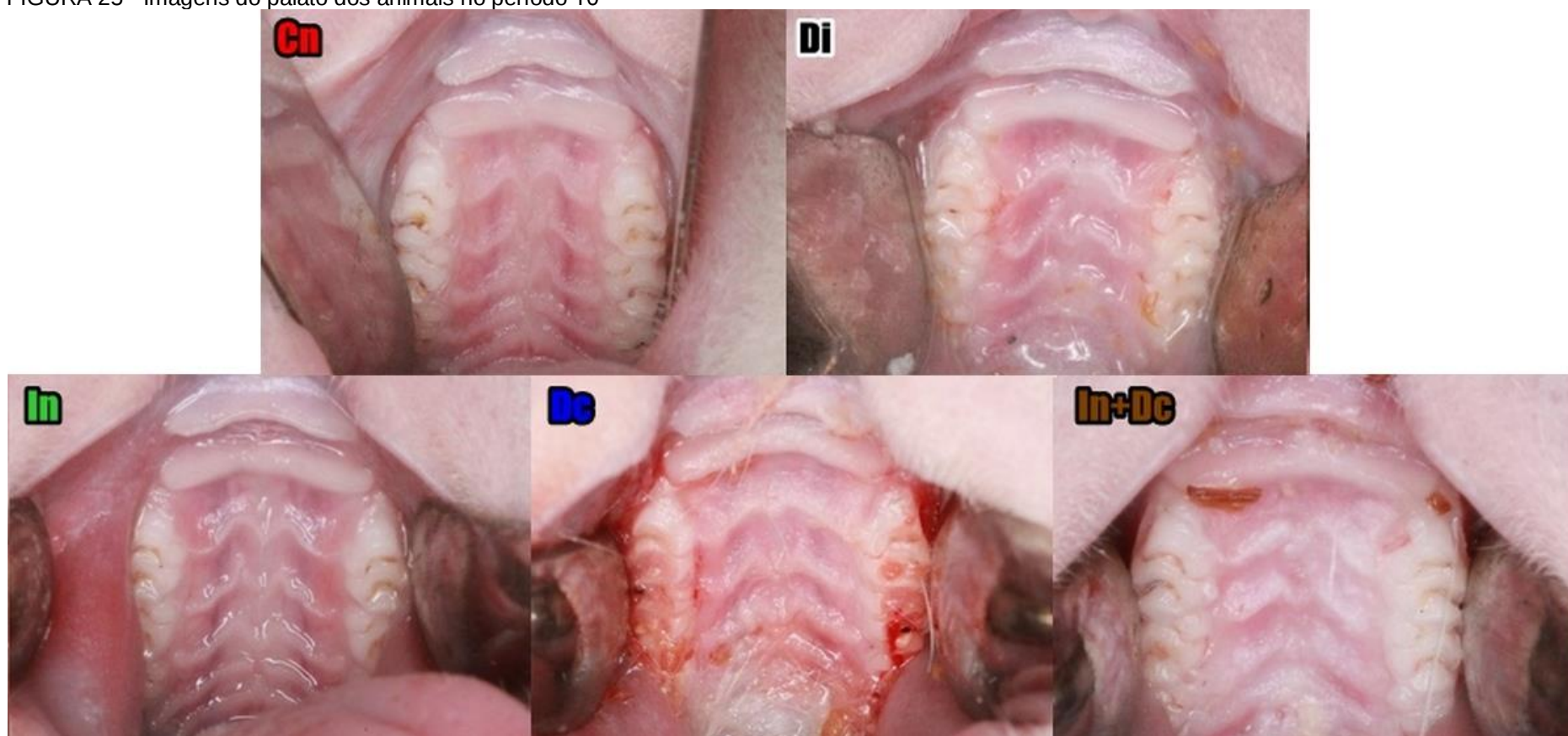
FIGURA 24 - Imagens iniciais do palato dos animais



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

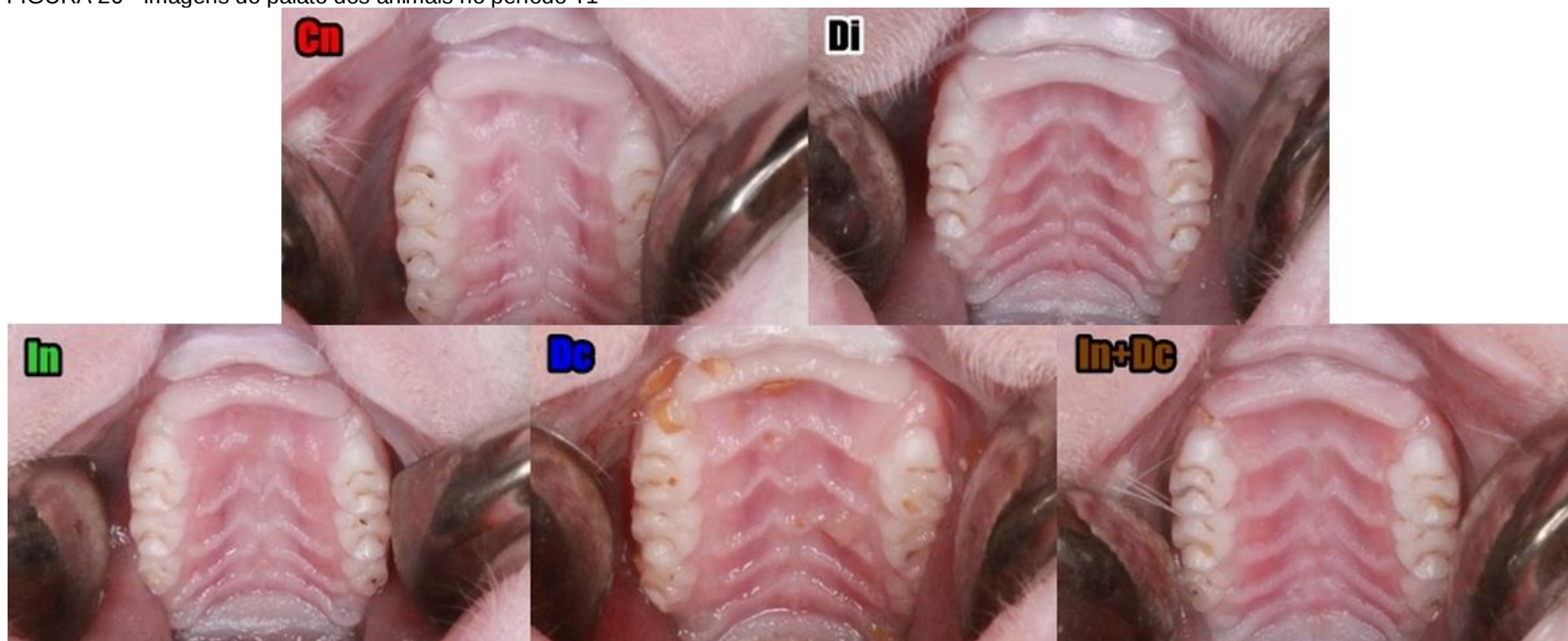
FIGURA 25 - Imagens do palato dos animais no período T0



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

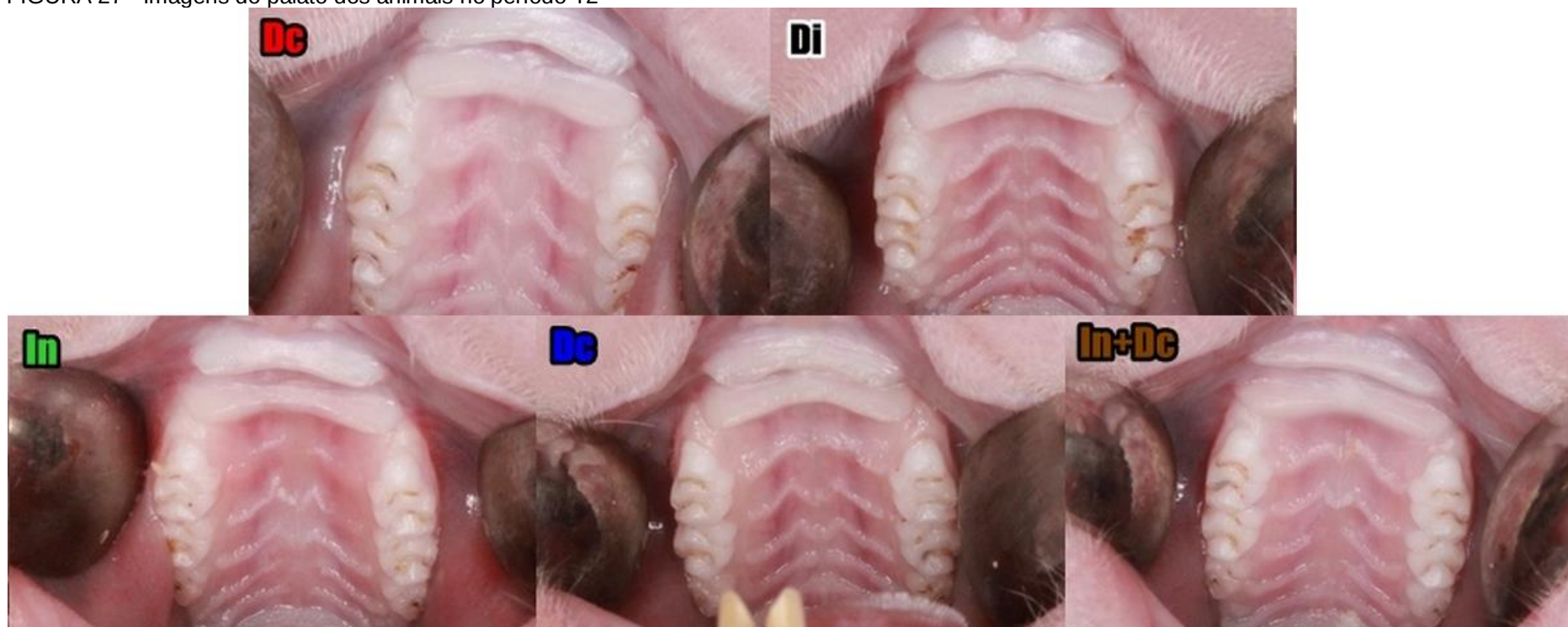
FIGURA 26 - Imagens do palato dos animais no período T1



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

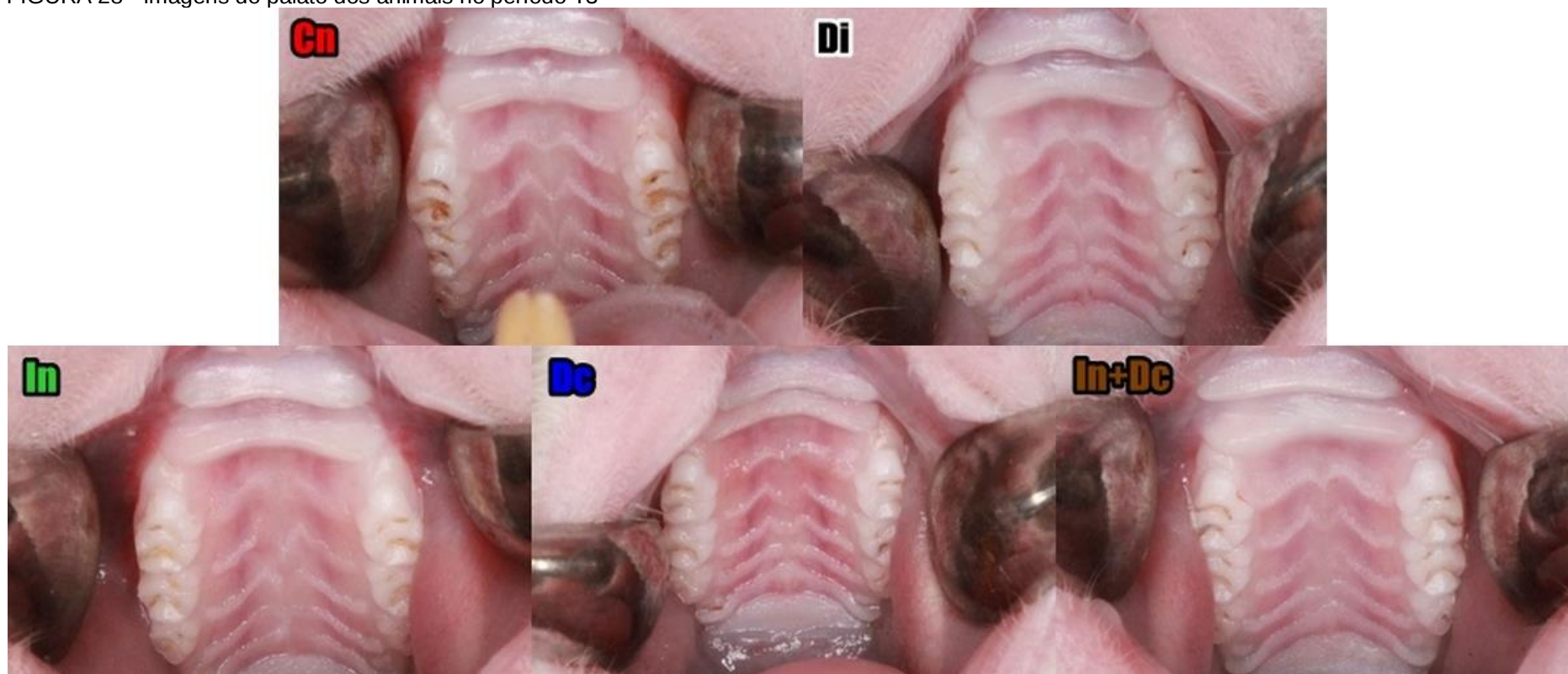
FIGURA 27 - Imagens do palato dos animais no período T2



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

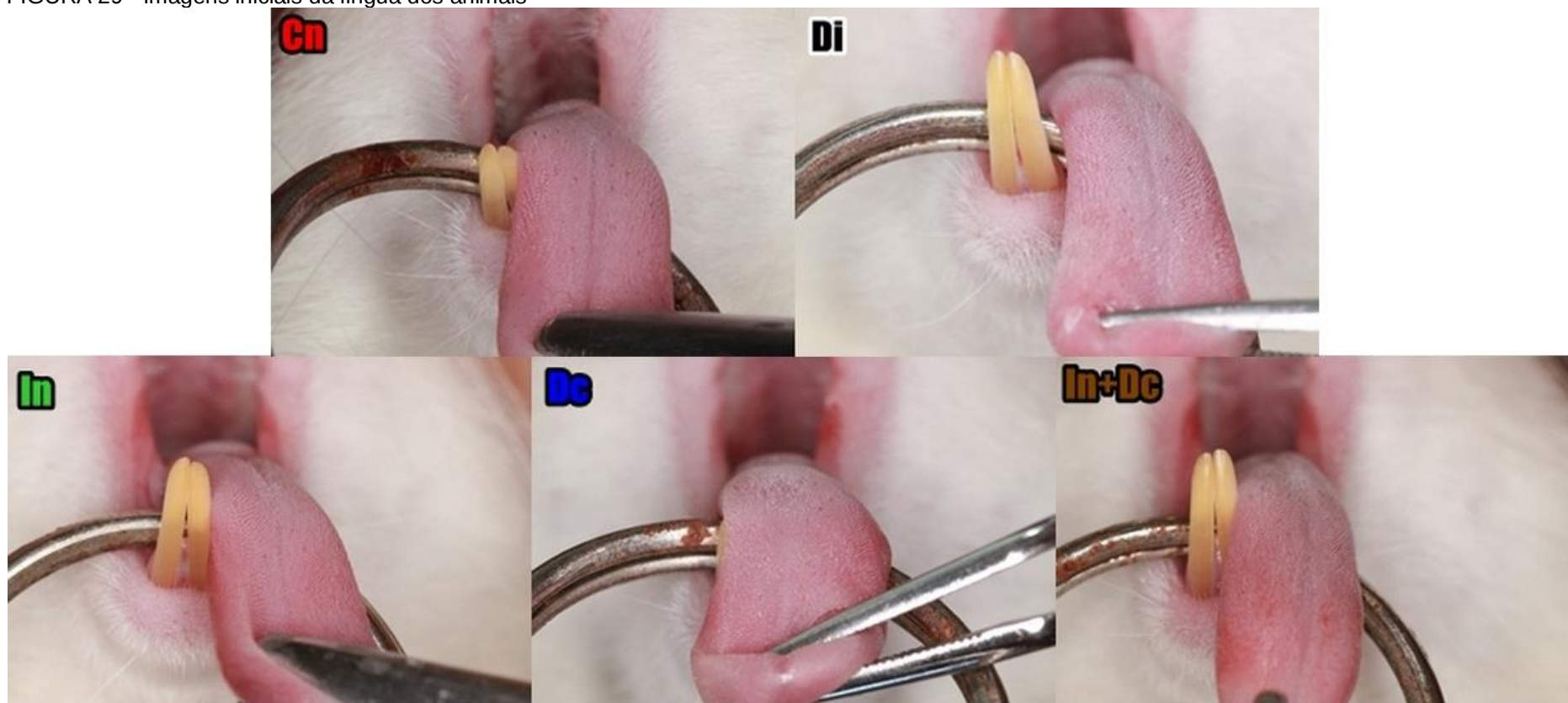
FIGURA 28 - Imagens do palato dos animais no período T3



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

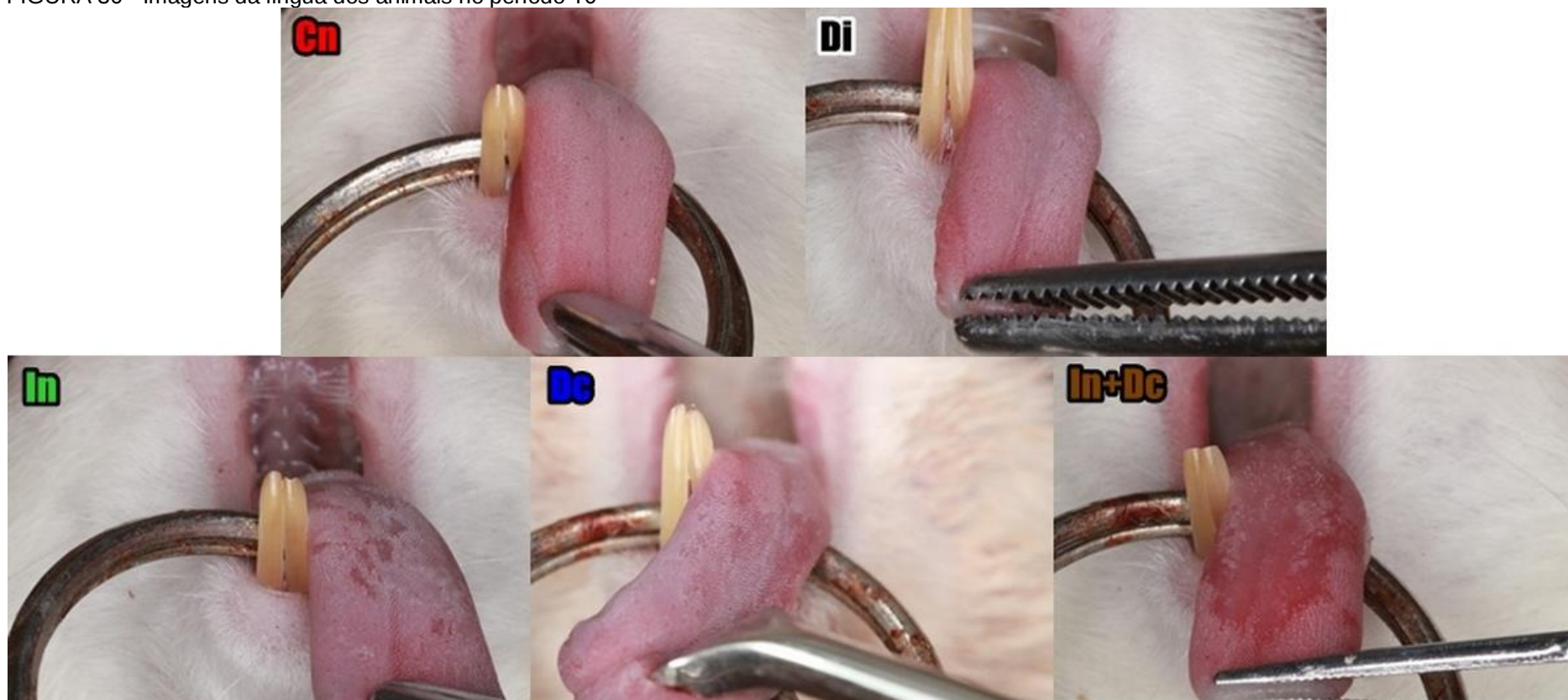
FIGURA 29 - Imagens iniciais da língua dos animais



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

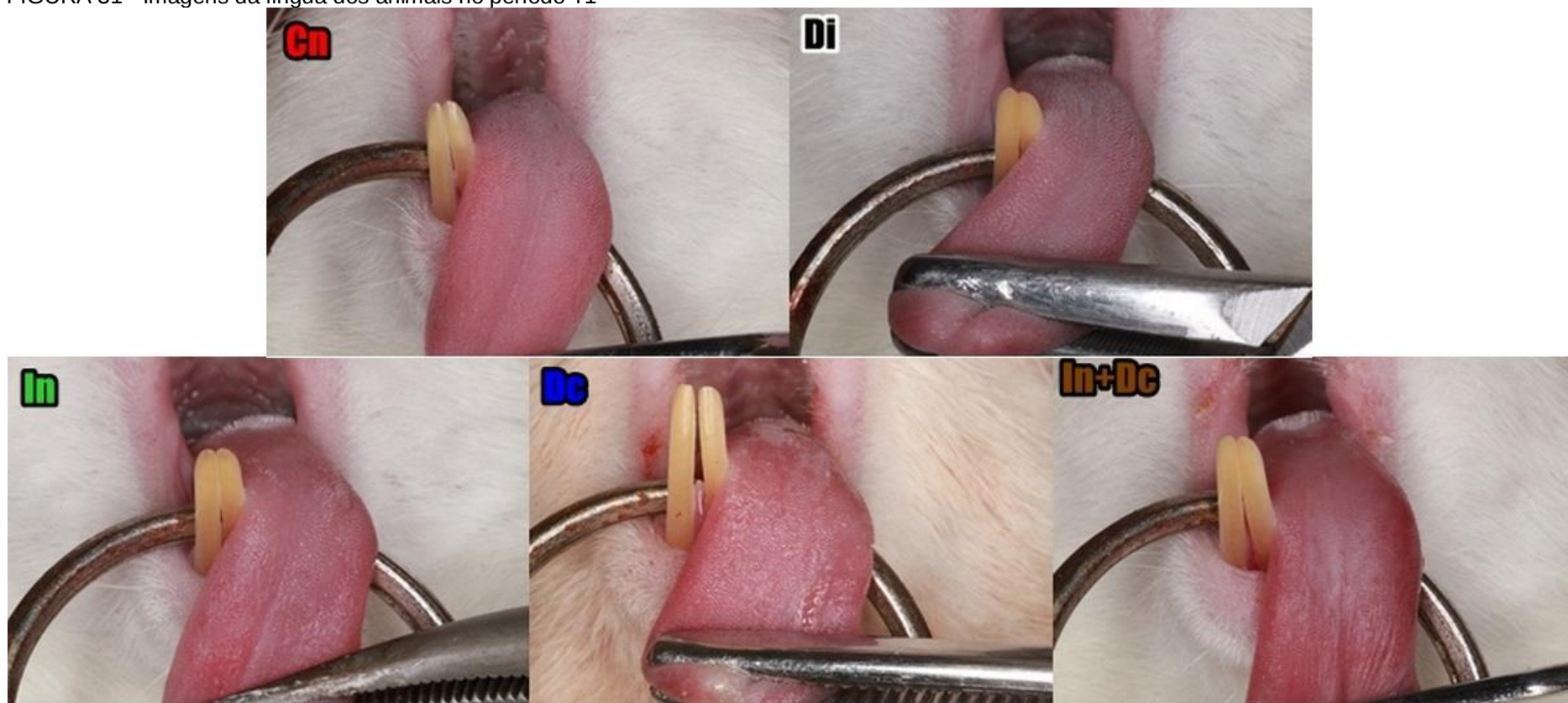
FIGURA 30 - Imagens da língua dos animais no período T0



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

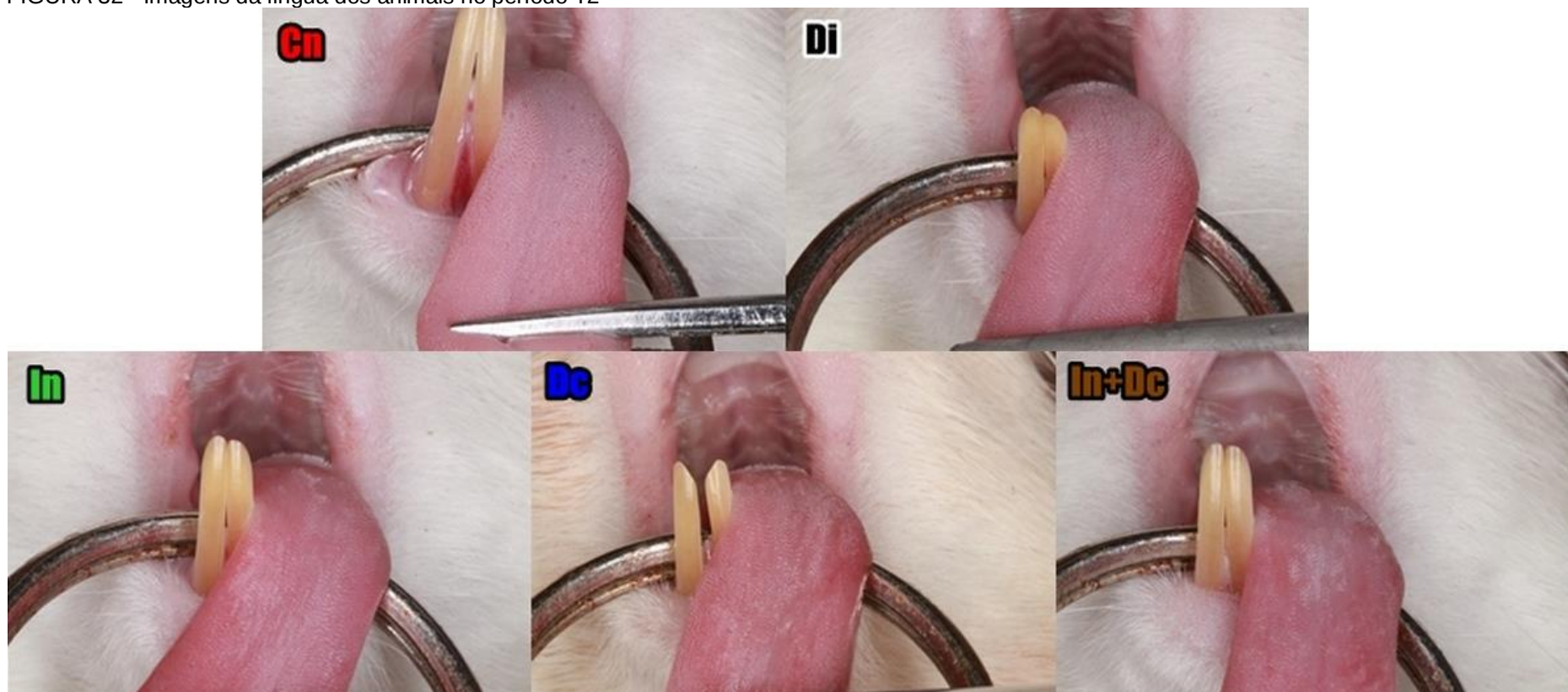
FIGURA 31 - Imagens da língua dos animais no período T1



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

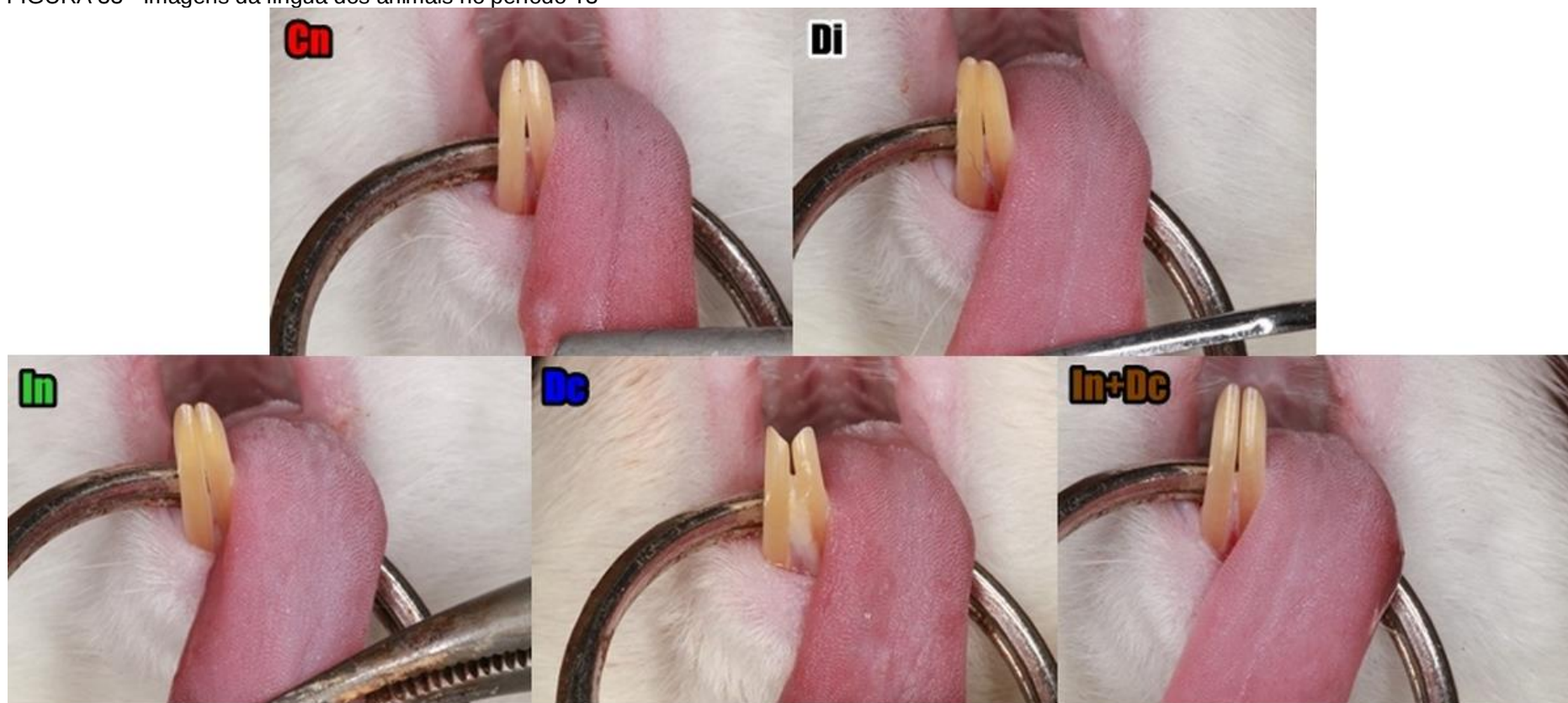
FIGURA 32 - Imagens da língua dos animais no período T2



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

FIGURA 33 - Imagens da língua dos animais no período T3



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

Não foram observadas alterações tanto no palato como na língua dos animais dos grupos Cn e Di. Não foram observadas alterações dignas de nota nos palatos dos animais dos demais grupos. A remoção dos dispositivos eventualmente provocou sangramento da mucosa bucal de alguns animais, como observado no animal do grupo Dc da Figura 25. Além disso, foi possível observar que alguns animais que utilizaram os dispositivos desenvolveram alterações nos molares sugestivas de lesões cariosas.

Apesar de não ter sido o objetivo inicial do presente estudo induzir candidose no dorso lingual dos animais, foram observadas regiões com ausência de papilas nas línguas dos animais dos grupos In, Dc e In+Dc. A severidade dessas alterações foi maior no grupo In+Dc, com o desenvolvimento até mesmo de placas esbranquiçadas (Figura 32), seguida pelo grupo Dc e finalmente pelo grupo In. As alterações foram observadas em até quatro dias (T2) após o período de indução da candidose (T0).

5.3.4 Contagem de UFC/mL

Os resultados de contagem de UFC/mL das coletas nos palatos dos animais podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Recuperação de *C. albicans* a partir de coletas nos palatos dos animais (UFC/mL)

Grupo	Animal	T0	T1	T2	T3
Cn	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
Di	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
In	1	_*	$2,2 \times 10^3$	0	0
	2	_**	_**	_**	_**
	3	$4,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$	0	0
	4	_**	_**	_**	_**
Dc	1	_*	0	0	0
	2	_*	0	0	0
	3	_**	_**	_**	_**
	4	$2,5 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	0	0
In+Dc	1	_*	$1,0 \times 10^4$	0	0
	2	_*	$2,0 \times 10^2$	0	0
	3	$8,3 \times 10^2$	$8,3 \times 10^2$	0	0
	4	$4,6 \times 10^3$	0	0	$4,0 \times 10^2$

Fonte: O autor.

T0: após período de indução da candidose; T1: após 2 dias da indução da candidose; T2: após 4 dias da indução da candidose; T3: antes da eutanásia; Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

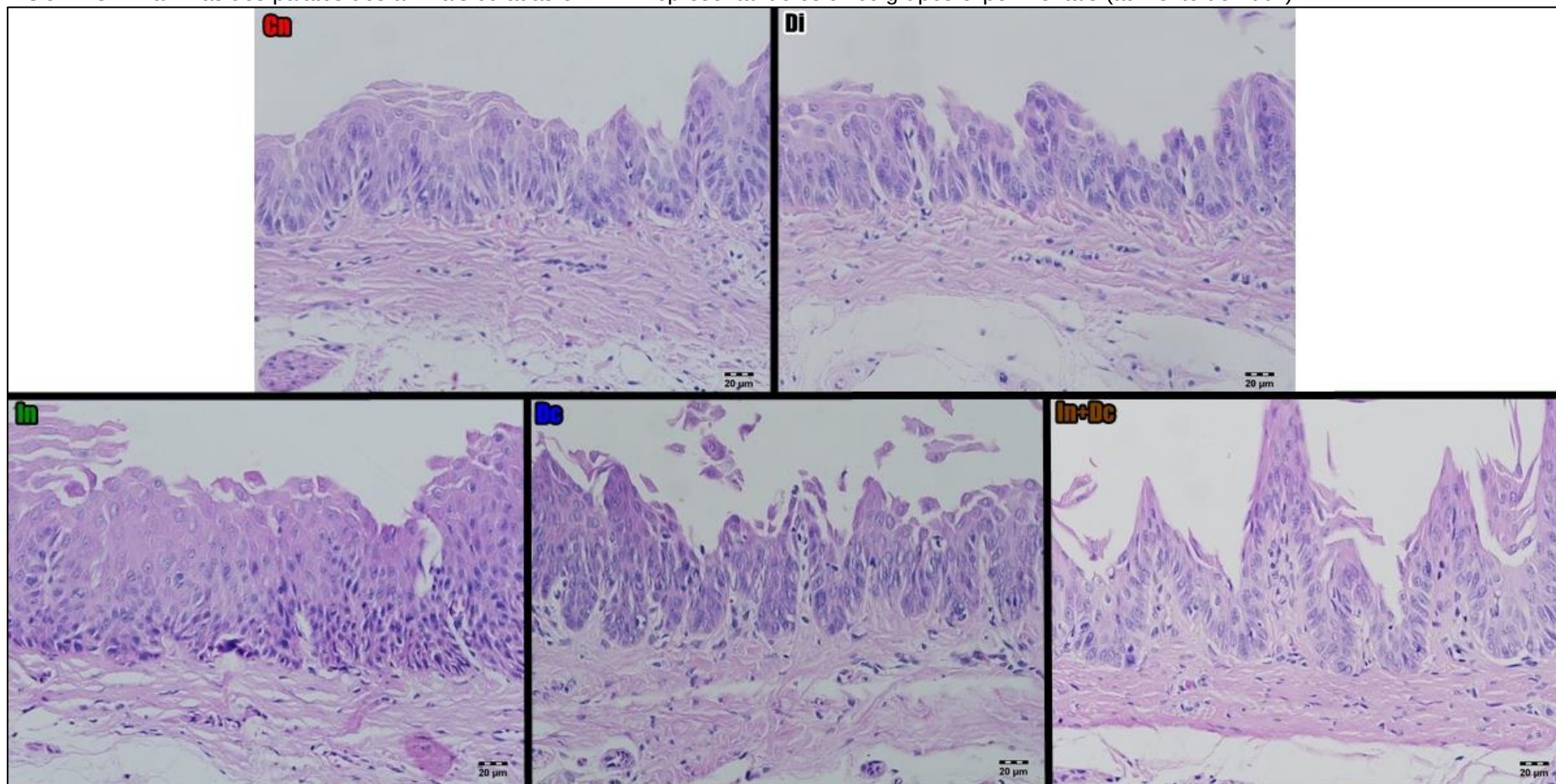
*Não foi possível contabilizar; **Animal perdido durante o experimento

A recuperação de *C. albicans* foi baixa após o período de indução da candidose, visto a concentração inoculada inicialmente. Esses achados condizem com as observações clínicas. Apesar de não terem sido visualizadas alterações no palato dos animais, ainda foi possível recuperar o fungo nas coletas dos palatos e os maiores valores de recuperação foram obtidos no grupo In+Dc em T1.

5.3.5 Análise histopatológica

Após o período de acompanhamento de 7 dias, não foi possível detectar alterações nos palatos e línguas dos animais, em ambas as colorações utilizadas. Em H.E., não foram encontradas atrofia, hipertrofia ou hiperplasia epitelial, áreas de despilação, invasão de pseudo-hifas ou blastóporos, microabscessos ou infiltrado inflamatório, em nenhum animal, independente do grupo (Figuras 34 e 36). Na coloração PAS também não foram identificadas quaisquer alterações, mesmo que o objetivo da técnica seja evidenciar a presença de fungos no tecido (Figuras 35 e 37).

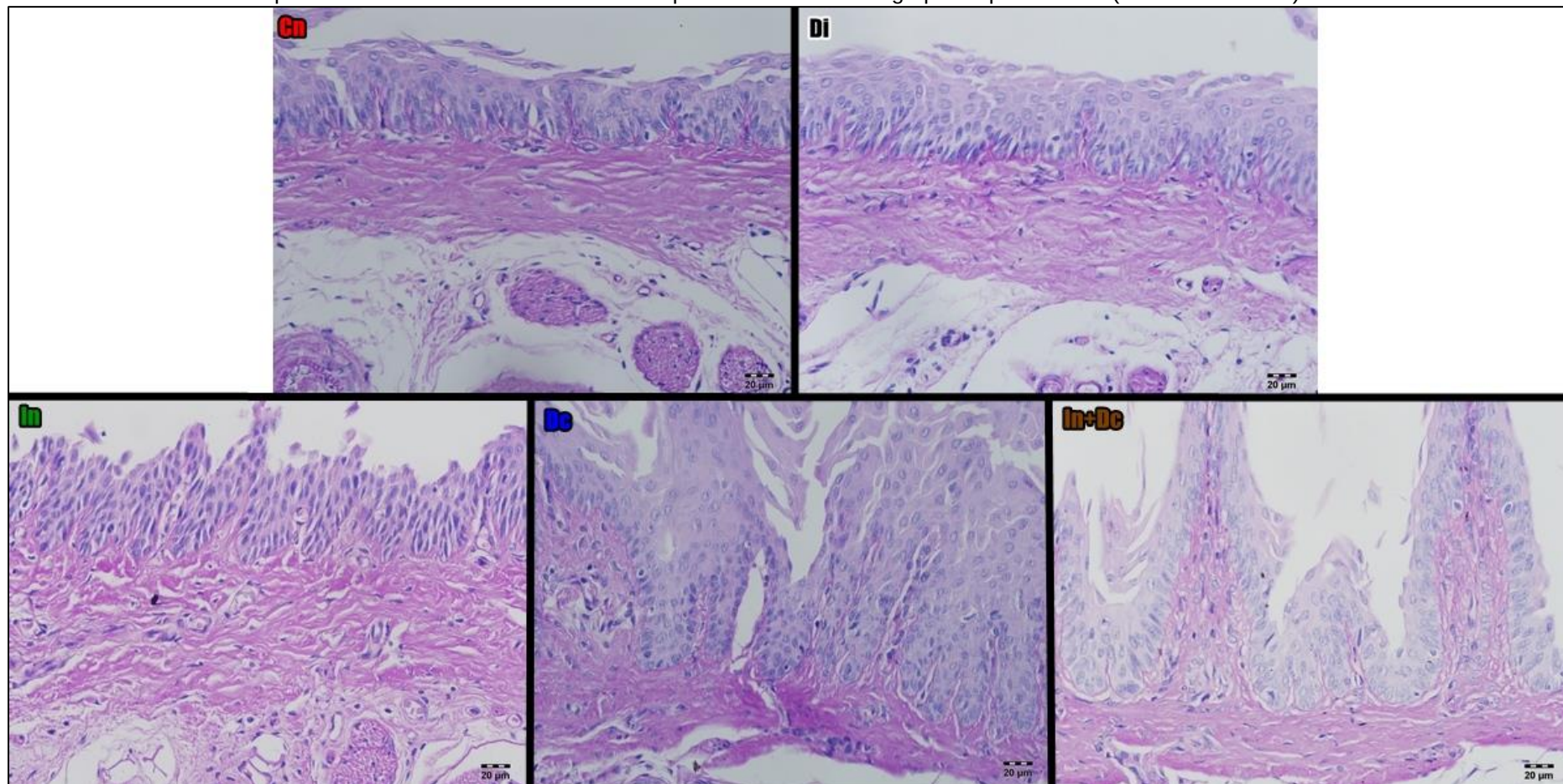
FIGURA 34 - Lâminas dos palatos dos animais coradas em H.E. representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x)



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

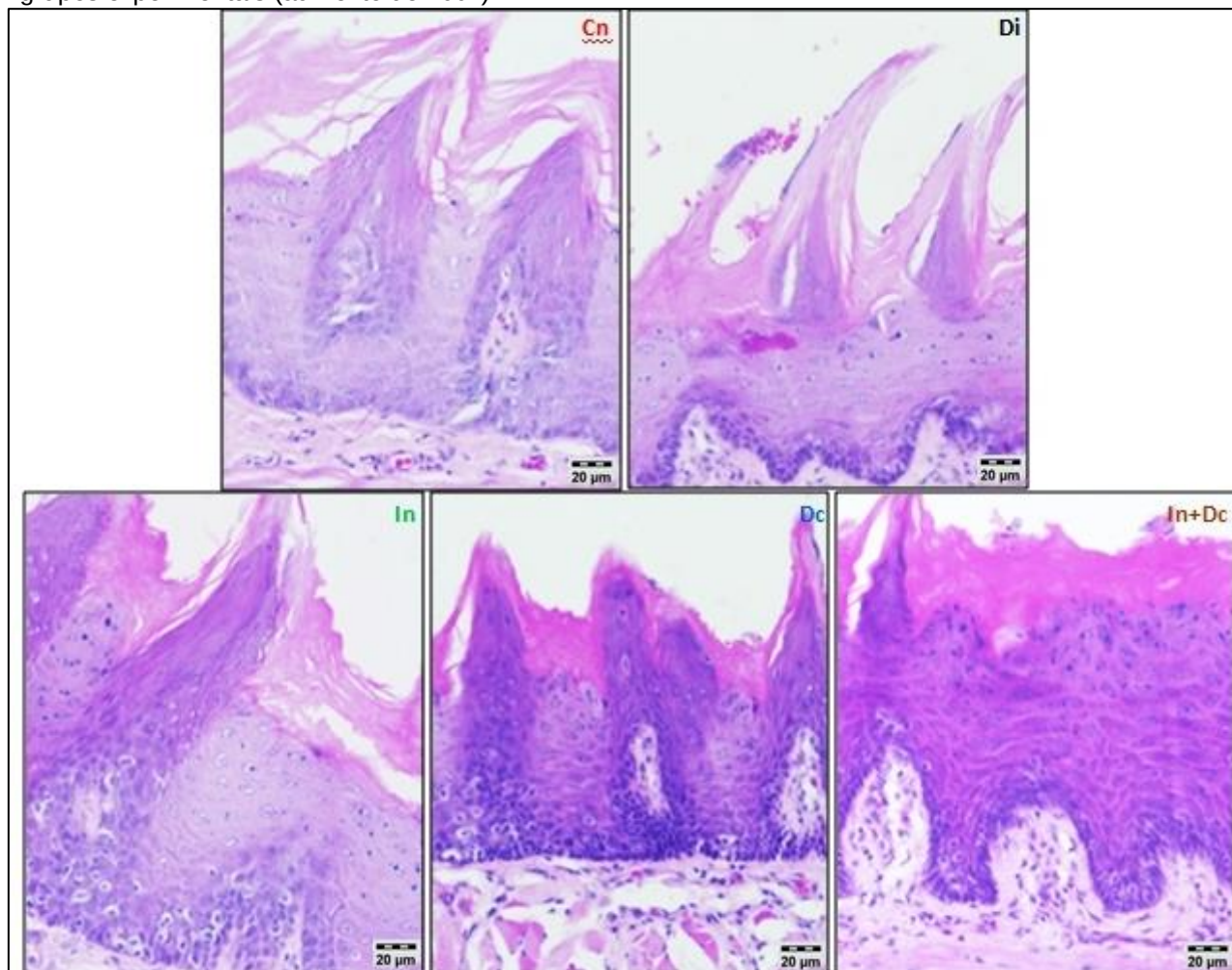
FIGURA 35 - Lâminas dos palatos dos animais coradas em PAS representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x)



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

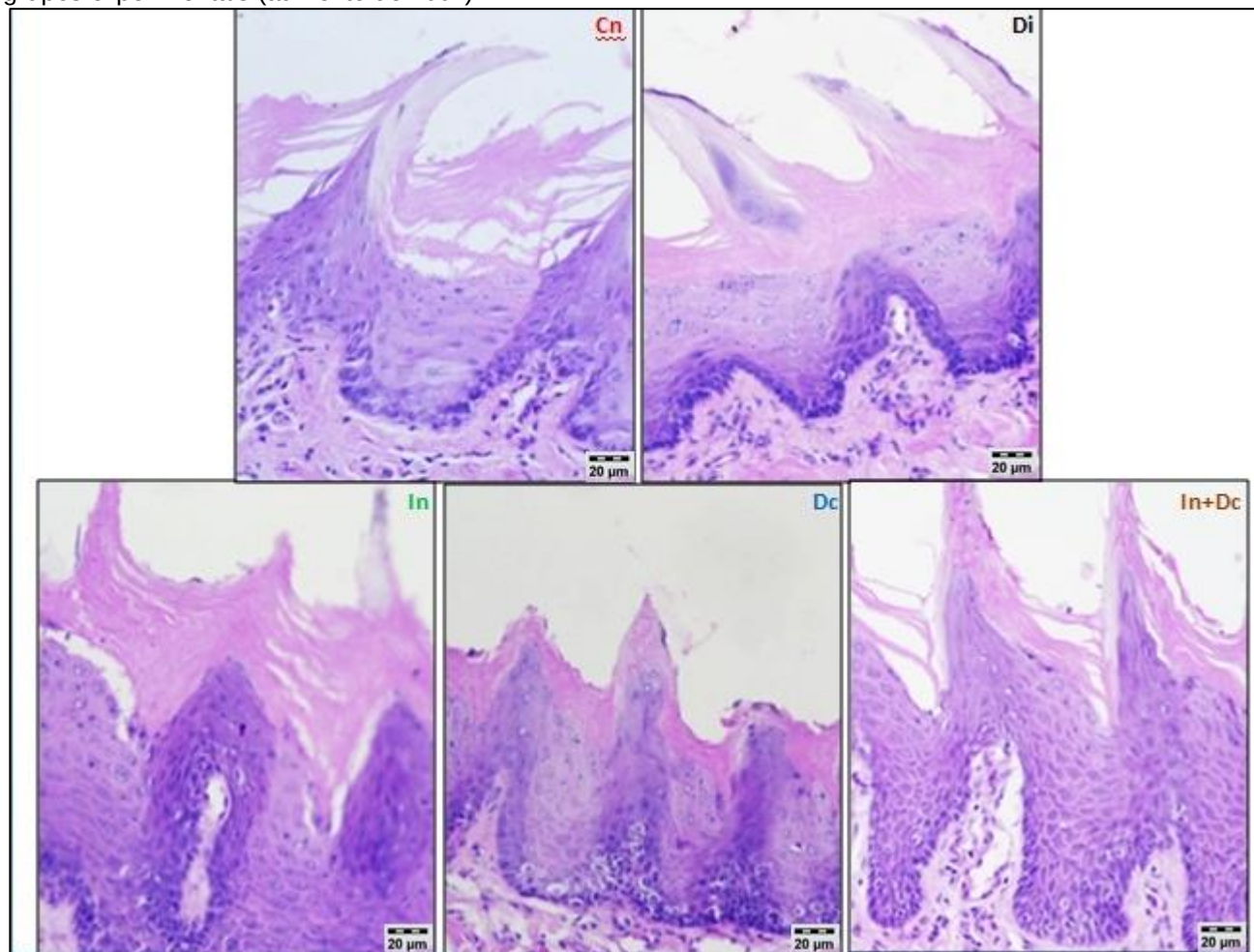
FIGURA 36 - Lâminas da região do dorso lingual dos animais coradas em H.E. representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x)



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

FIGURA 37 - Lâminas da região do dorso lingual dos animais coradas em PAS representando os cinco grupos experimentais (aumento de 400x)



Fonte: O autor.

Cn: grupo Controle negativo; Di: grupo Dispositivo intra-oral; In: grupo Inoculação; Dc: grupo Dispositivo intra-oral contaminado; In+Dc: grupo Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado

5.4 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS IMUNOCOMPETENTES SOB ANTIBIOTICOTERAPIA

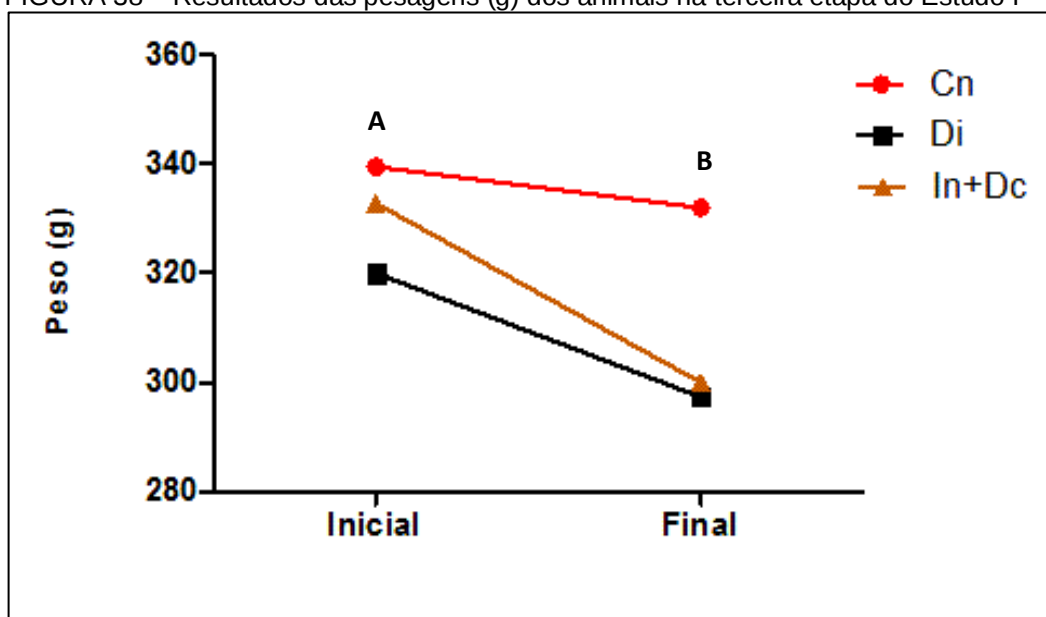
5.4.1 Triagem dos animais

Dos 20 animais triados para a terceira etapa do Estudo I, nenhum apresentou *Candida* spp. em sua cavidade bucal anteriormente ao início do experimento.

5.4.2 Monitoramento dos animais

Dos 14 animais utilizados, nenhum foi perdido durante o experimento. Apenas um animal do grupo In+Dc apresentou perda do dispositivo. Pequena quantidade de detritos alimentares foi encontrada ao se remover os dispositivos, sem diferença notável entre os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais para o peso dos animais tanto no início como no final do experimento antes da eutanásia (Figura 38). Entretanto, houve uma redução significativa no peso dos animais ($303,4 \pm 29,2$ g) em relação ao seu peso inicial ($328,3 \pm 28,8$ g) em todos os grupos avaliados (Figura 38; $p = 0,001$). Apesar disso, assim como na etapa anterior, nenhum animal mostrou-se debilitado no decorrer do experimento.

FIGURA 38 – Resultados das pesagens (g) dos animais na terceira etapa do Estudo I



Fonte: O autor.

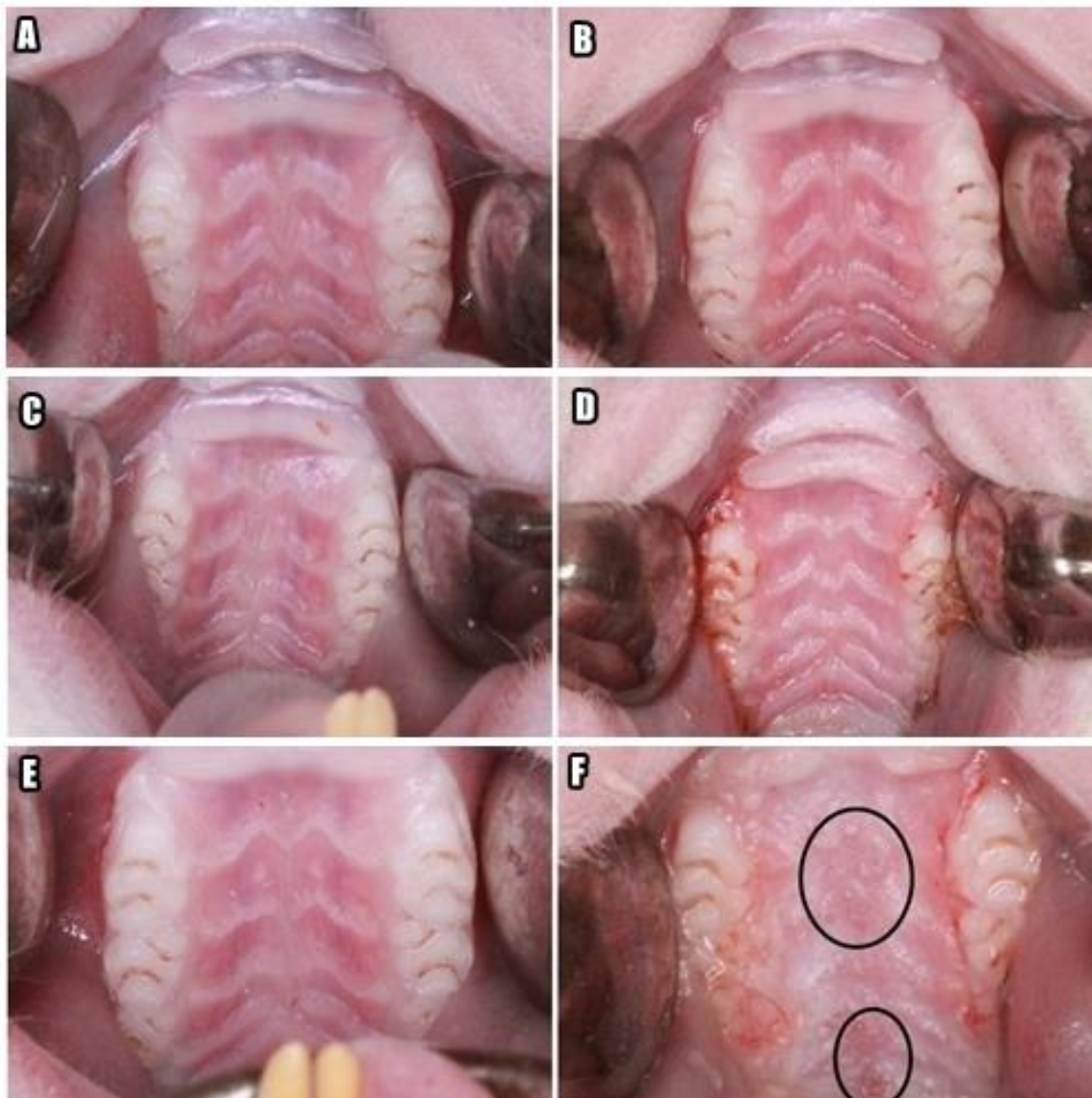
Cn: Controle negativo; Di: Dispositivo intra-oral; In+Dc: Inoculação+dispositivo intra-oral contaminado

Valores médios $\pm$ desvio padrão com letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA 2-fatores de medidas repetidas e teste de Tukey HSD)

5.4.3 Análise visual

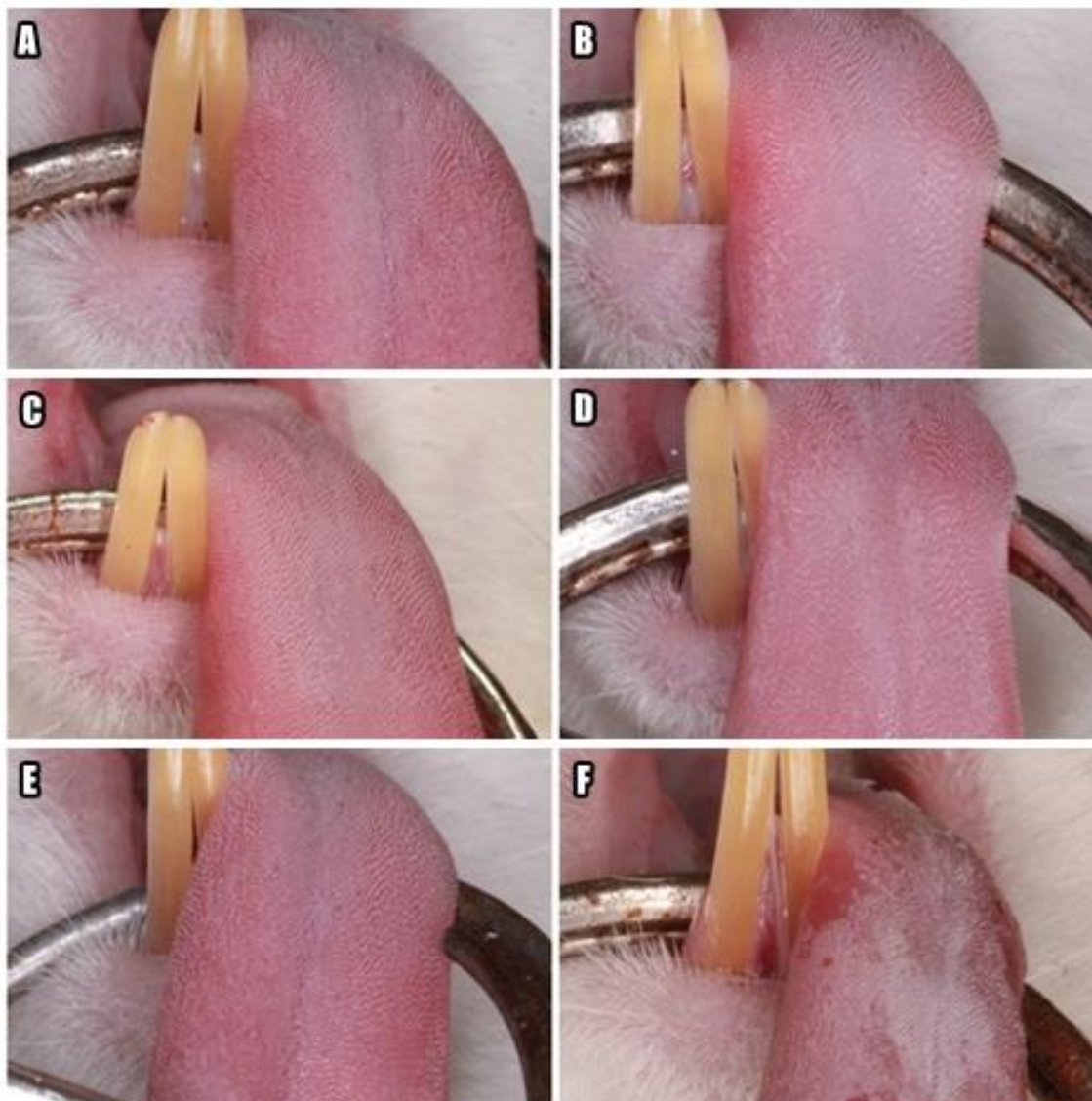
Fotografias do palato e da língua representativas de cada grupo experimental podem ser visualizadas nas Figuras 39 e 40, respectivamente. Não foram observadas alterações nem no palato nem na língua dos animais antes da eutanásia em relação ao início do experimento para os grupos Cn e Di. Para os animais do grupo In+Dc, foi possível observar sinais discretos de inflamação no palato, com áreas de eritema puntiforme (áreas evidenciadas) e edema tecidual, condizentes com o tipo I da classificação de Newton⁹ (Figura 39F). Além disso, foi notado que as rugosidades palatinas de todos os animais do grupo In+Dc apresentaram-se menos definidas (Figura 39F). Foram observadas áreas de despilação e presença de placas esbranquiçadas nas línguas destes animais imediatamente após a remoção dos dispositivos intra-orais contaminados (Figura 40F).

FIGURA 39 - Aspecto visual do palato dos animais no início do experimento e logo após o período de indução da estomatite protética para os grupos Cn (A e B), Di (C e D) e In+Dc (E e F), respectivamente



Fonte: O autor.

FIGURA 40 - Aspecto visual da língua dos animais no início do experimento e logo após o período de indução da estomatite protética para os grupos Cn (A e B), Di (C e D) e In+Dc (E e F), respectivamente



Fonte: O autor.

5.4.4 Contagem de UFC/mL

A recuperação fúngica (UFC/mL) a partir das coletas nos palatos dos animais logo após o período de indução da estomatite protética está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Recuperação fúngica a partir de coletas nos palatos dos animais (UFC/mL)

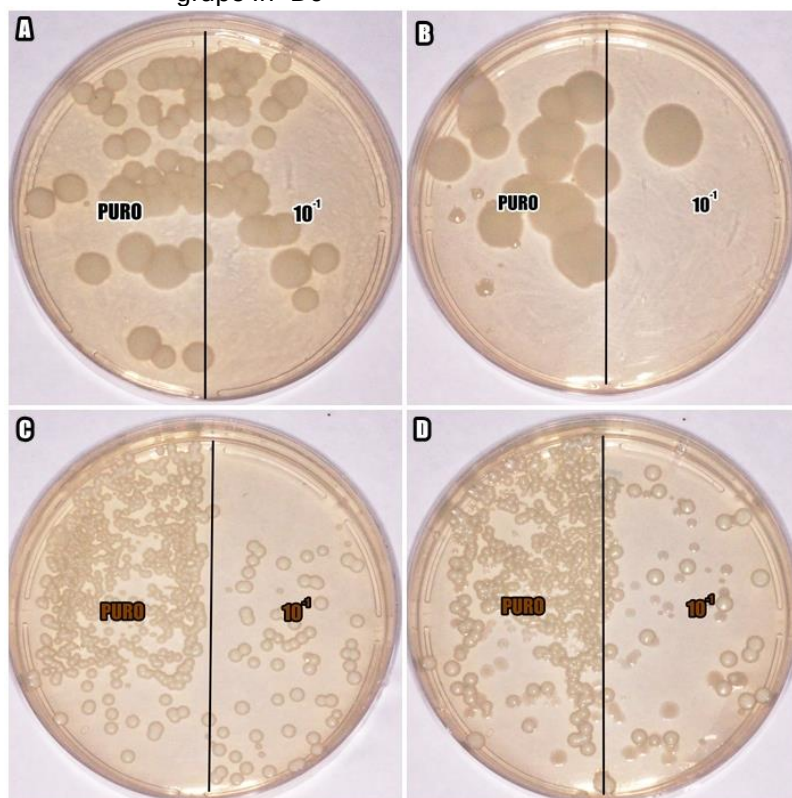
Animal	Cn	Di	In+Dc
1	0	$8,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$
2	0	$3,7 \times 10^2$	$3,3 \times 10^3$
3	-	*	$2,0 \times 10^4$
4	-	*	$5,8 \times 10^3$
5	-	$2,8 \times 10^2$	$2,0 \times 10^4$
6	-	*	$1,3 \times 10^4$

Fonte: O autor.

* Não foi possível contabilizar

Não foi encontrado crescimento fúngico em nenhum dos animais do grupo Cn. A recuperação média de *C. albicans* após o período de indução da estomatite protética foi aproximadamente 10 vezes maior para o grupo In+Dc sob antibioticoterapia ($1,3 \times 10^4$ UFC/mL) do que aquela observada na etapa anterior deste estudo ($2,7 \times 10^3$ UFC/mL). Além disso, nas placas de cultura dos animais pertencentes ao grupo Di não foram encontradas colônias de *C. albicans*, entretanto, foram observados fungos com aspecto macroscópico diferente de *C. albicans* (Figuras 41A e 41B). Também foram observadas colônias de outras espécies fúngicas nas placas do grupo In+Dc (Figura 41D).

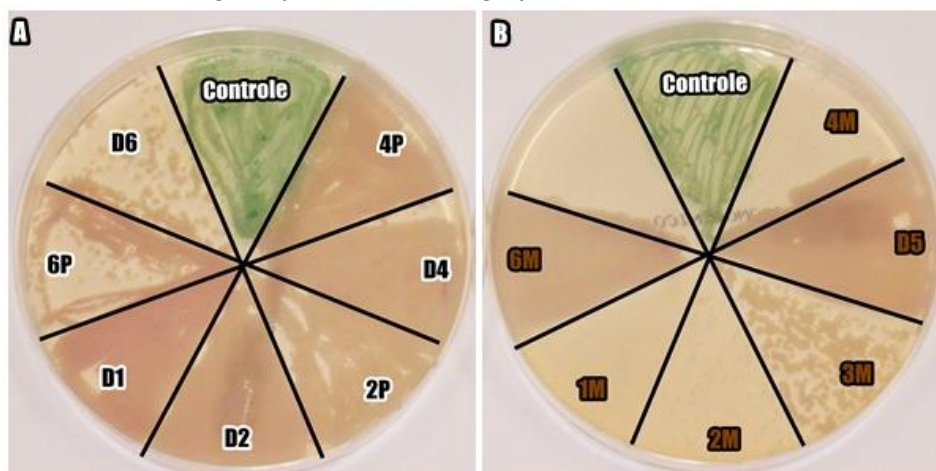
FIGURA 41 - Aspecto macroscópico das colônias encontradas nas placas de cultura após o período de indução da estomatite protética. A: Colônias fúngicas presentes em um dispositivo do grupo Di; B: Colônias fúngicas recuperadas após coleta do palato de um animal do grupo Di. C: Crescimento fúngico condizente com o aspecto de *C. albicans* encontrado em um dispositivo do grupo In+Dc; D: Colônias fúngicas recuperadas após coleta do palato de um animal do grupo In+Dc



Fonte: O autor.

Para tipificar as colônias com aspecto macroscópico diferente do da *C. albicans*, alíquotas foram semeadas em *Candida* CHROMagar assim como descrito no item 4.1. A partir dos resultados apresentados na Figura 42, pode se sugerir a presença de *C. krusei* ou *C. glabrata*, visto a coloração rósea apresentada nas placas de cultura tanto do grupo Di como do grupo In+Dc.

FIGURA 42 - Placas de *Candida* CHROMagar utilizadas para identificação presuntiva das colônias fúngicas. A: Identificação das colônias fúngicas pertencentes ao grupo Di; B: Identificação das colônias fúngicas pertencentes ao grupo In+Dc



Fonte: O autor.

Identificação das colônias fúngicas a partir de material coletado do palato dos animais (grupo Di: 4P, 2P e 6P; grupo In+Dc: 4M, 3M, 2M, 1M e 6M) e a partir de material coletado dos dispositivos (grupo Di: D4, D2, D1 e D6; grupo In+Dc: D5). Controle: semeadura de 10 μ L de suspensão de *C. albicans*

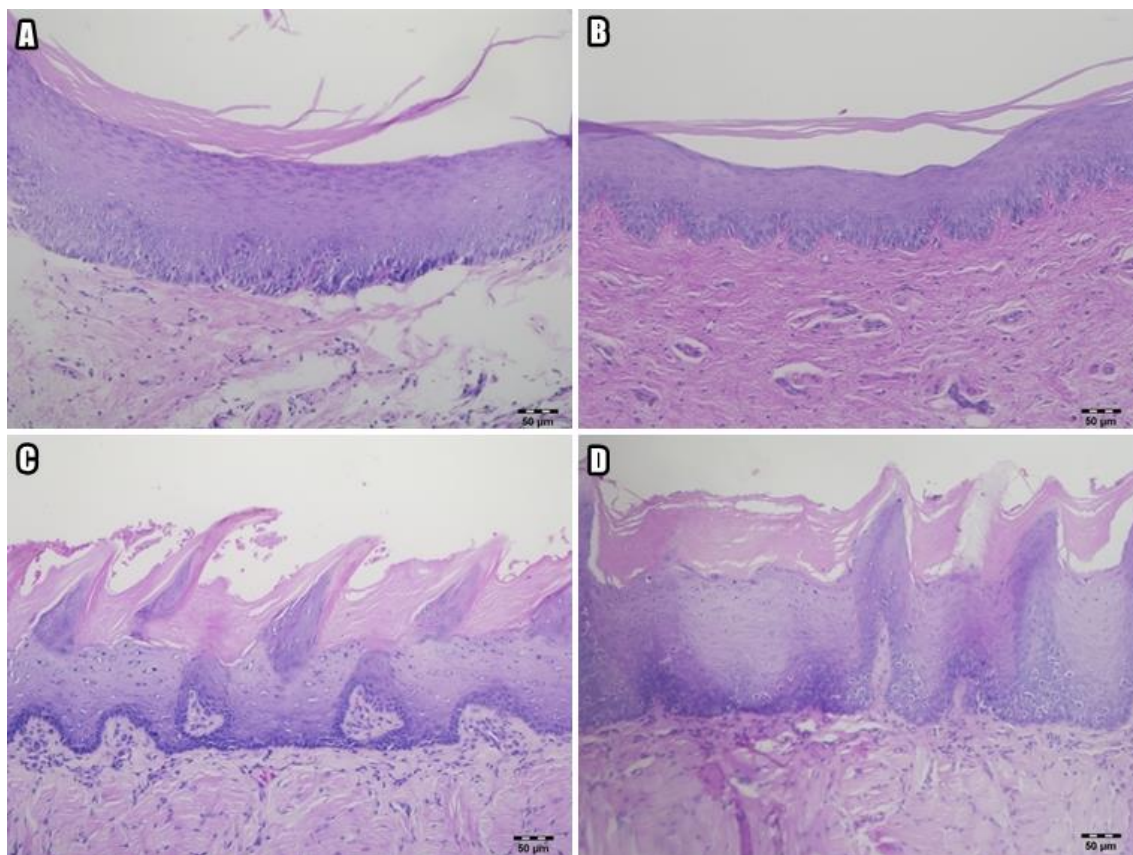
A concentração média de UFC/mL de *C. albicans* recuperada a partir dos dispositivos contaminados utilizados pelos animais do grupo In+Dc após o período de indução da estomatite protética foi de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL.

5.4.5 Análise histopatológica

As alterações histológicas encontradas foram conzidentes com o aspecto clínico observado, visto que as línguas dos animais do grupo In+Dc apresentaram-se muito mais alteradas do que os palatos (Figura 45), e que os tecidos dos animais dos grupos Cn e Di apresentaram aspecto de normalidade (Figuras 43 e 44, respectivamente).

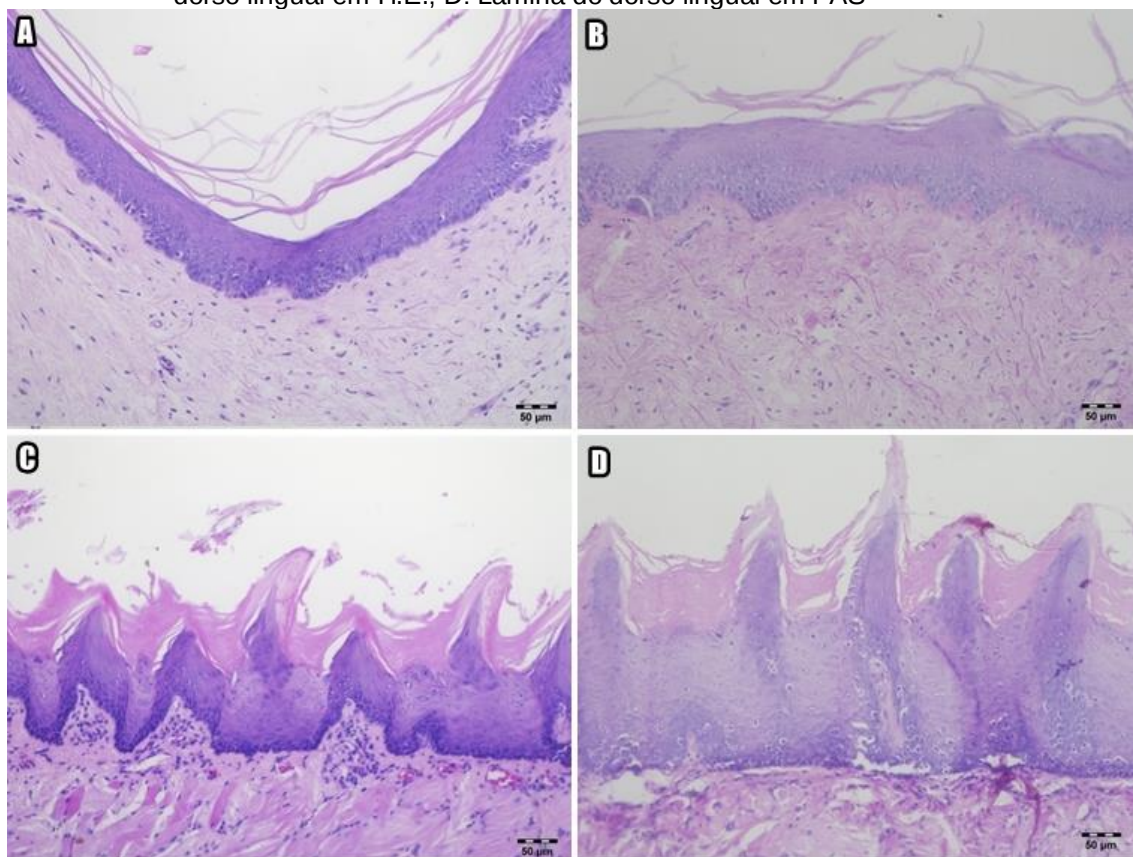
Apesar de ter sido possível identificar microabscessos e discreto infiltrado inflamatório no tecido palatal dos animais pertencentes ao grupo In+Dc, não se detectou a presença de pseudo-hifas ou leveduras, nem mesmo na coloração PAS (Figuras 45A e 45B). Por outro lado, as línguas desses animais apresentaram áreas de despilação, microabscessos, intenso infiltrado inflamatório e invasão tecidual por pseudo-hifas e leveduras, a qual foi evidenciada pela coloração PAS (Figuras 45C e 45D).

FIGURA 43 – Lâminas histológicas representando o grupo Cn (aumento de 200x). A: Lâmina da mucosa palatal em H.E.; B: Lâmina da mucosa palatal em PAS; C: Lâmina do dorso lingual em H.E.; D: Lâmina do dorso lingual em PAS



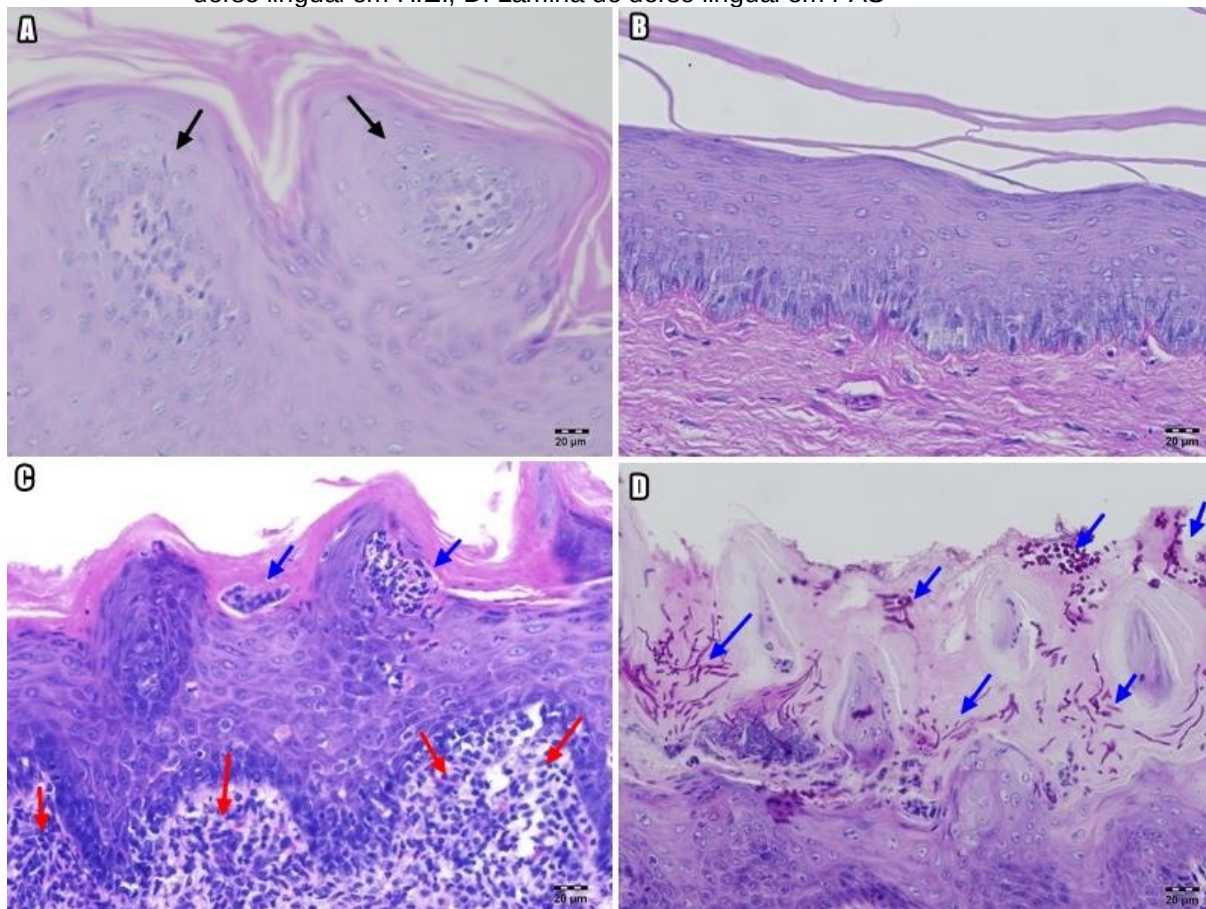
Fonte: O autor.

FIGURA 44 – Lâminas histológicas representando o grupo Di (aumento de 200x). A: Lâmina da mucosa palatal em H.E.; B: Lâmina da mucosa palatal em PAS; C: Lâmina do dorso lingual em H.E.; D: Lâmina do dorso lingual em PAS



Fonte: O autor.

FIGURA 45 – Lâminas histológicas representando o grupo In+Dc (aumento de 400x). A: Lâmina da mucosa palatal em H.E.; B: Lâmina da mucosa palatal em PAS; C: Lâmina do dorso lingual em H.E.; D: Lâmina do dorso lingual em PAS



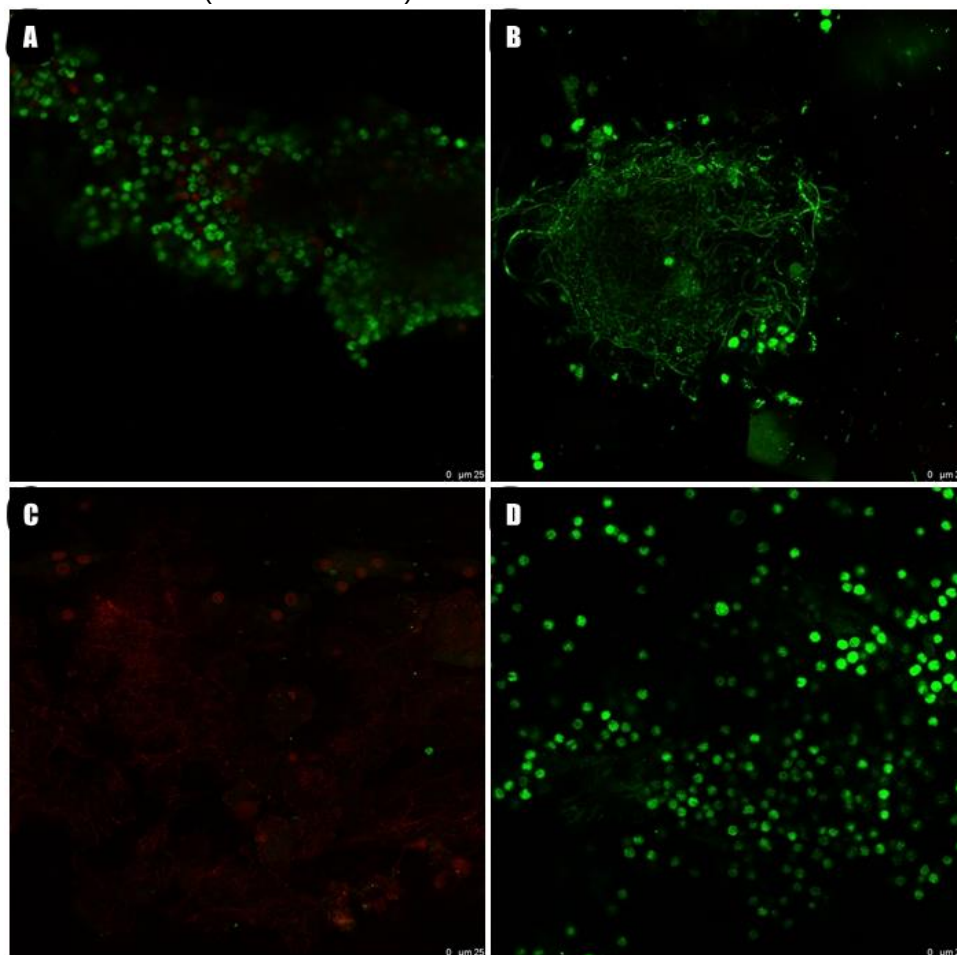
Fonte: O autor.

Setas pretas indicam microabscessos no epitélio; Setas vermelhas indicam infiltrado inflamatório; Setas azuis apontam a presença de formas filamentosas e leveduras de *Candida* na camada de queratina

5.4.6 Análise em microscopia confocal a laser

Algumas leveduras e formas filamentosas viáveis ou não de *C. albicans* foram encontradas na análise em microscópio confocal laser dos palatos e dispositivos do grupo In+Dc logo após o período de indução da estomatite protética. A Figura 46 ilustra os achados.

FIGURA 46 – Fotomicroscopias obtidas dos palatos e dispositivos do grupo In+Dc após o período de indução da estomatite protética. A e B: Fotomicroscopias ilustrando leveduras e formas filamentosas de *C. albicans* encontradas na superfície externa dos dispositivos. C e D: Fotomicroscopias ilustrando leveduras de *C. albicans* encontradas na mucosa palatina dos animais (aumento de 63x)



Fonte: O autor.

6. DISCUSSÃO

A primeira hipótese testada no Estudo I foi aceita, uma vez que os dispositivos intra-orais acrílicos foram esterilizados por meio da irradiação com energia de micro-ondas e o protocolo utilizado para a contaminação permitiu a formação de um biofilme maduro de *C. albicans* na sua superfície.

Esta fase preliminar do Estudo I foi necessária para confirmar a validade das etapas prévias necessárias à indução de estomatite protética em avaliação. Uma vez que existe a teoria de que a prótese atua como um reservatório permitindo que o fungo reinfecte a mucosa e contribua para a patogênese da estomatite protética,⁹⁶ utilizou-se um protocolo de formação de biofilme empregado na literatura^{86,88,89} para a contaminação dos dispositivos intra-orais com uma suspensão padronizada de *C. albicans*. Pseudo-hifas e blastóporos viáveis de *C. albicans* patogênica foram encontrados no biofilme formado na superfície dos dispositivos intra-orais, como pôde ser observado nas fotomicrografias obtidas por microscopia confocal a laser. Imagens semelhantes foram observadas nas amostras controle negativo do estudo realizado por Delben et al.⁸⁸ Assim como Chandra e colaboradores⁸⁷ relataram em seu estudo, a análise das imagens em microscópio confocal deve ser realizada rapidamente. No entanto, diferente do que os autores mencionam, no presente estudo não ocorreu branqueamento das amostras ou degradação do corante, e sim a desorganização do biofilme e morte dos microrganismos. A concentração do inóculo utilizado para contaminar os dispositivos não excedeu a grandeza de 10^7 , visto que Chandra e colaboradores⁸⁶ relataram que suspensões acima desse valor não aprimoraram a formação de biofilme em suas amostras. A recuperação de *C. albicans* a partir dos dispositivos contaminados ($1,2 \times 10^6$ UFC/mL) foi, aproximadamente, 10 vezes menor que o inoculado inicialmente ($2,6 \times 10^7$ UFC/mL).

Os dispositivos acrílicos deveriam ser previamente esterilizados para garantir que fossem contaminados apenas por *C. albicans*, principal fator etiológico envolvido na patogênese da estomatite protética.^{4,6,8} Apesar de *Candida* spp. interagir com outros microrganismos na cavidade bucal, resultando em um biofilme misto, complexo e de difícil remoção,^{85,96-99} a patogênese da estomatite protética está mais relacionada a uma reação imunológica mediada por neutrófilos polimorfonucleares contra *Candida*.^{100,101} Relata-se na literatura que 93% dos indivíduos com sinais clínicos de estomatite protética apresentam infecção

fúngica^{13,100,102,103} com a prevalência de *C. albicans*, identificada em 50 a 98% dos casos.^{3,100,102-107}

Para a escolha do método mais adequado para a esterilização dos dispositivos, foram selecionados métodos físicos utilizados rotineiramente para desinfecção/esterilização de materiais acrílicos: irradiação com energia de micro-ondas, exposição à luz UV e banho em ultrassom.^{79,81,108-110} Outros meios físicos de esterilização, como calor seco em estufa ou vapor saturado sob pressão em autoclaves poderiam danificar a resina acrílica para base de prótese devido às altas temperaturas empregadas.¹¹¹ Meios químicos de esterilização como utilização de formaldeído ou glutaraldeído podem gerar resíduos tóxicos^{112,113} que poderiam influenciar nos resultados histopatológicos e microbiológicos de avaliação da mucosa palatina dos animais durante os experimentos de indução de estomatite protética. Dessa forma, estabelecer um método que garantisse a esterilidade dos dispositivos sem alterar suas propriedades físico-mecânicas é de fundamental importância. A irradiação por energia de micro-ondas na potência de 650 W por 3 min foi o único método de esterilização testado realmente efetivo. A forma pela qual a eliminação dos microrganismos ocorre ainda não está totalmente estabelecida, porém, estudos sugerem que seja uma interação do efeito térmico com o campo eletromagnético criado no micro-ondas.¹¹⁴ O uso do micro-ondas para descontaminação de corpos de prova de resina acrílica e até mesmo de próteses removíveis tem sido bastante descrito e preconizado na literatura,^{13,79,115-118} dada sua efetividade contra os microrganismos, baixo custo, rapidez e facilidade de manuseio.¹¹⁴ Ainda, tem sido relatado que o protocolo de irradiação a 650 W por 3 min melhora a dureza e resistência à flexão,¹¹⁵ além de não alterar a estabilidade dimensional da resina acrílica.¹¹⁹

A triagem dos animais foi realizada para seleção daqueles *C. albicans*-negativos. De acordo com a literatura, o fungo *C. albicans* não coloniza normalmente a mucosa de ratos e camundongos,^{120,121} apesar de Olsen e Bondevik²⁹ relatarem que 78,9% de sua amostra (n=30) apresentava o fungo anteriormente à realização do experimento. No presente estudo, este microrganismo foi encontrado em 11,5% (n=6) da amostra triada no total (N=52). Uma possível justificativa para tal ocorrência seria a presença de colônias viáveis na maravalha das gaiolas dos animais,¹²² resultando em uma contaminação transitória de suas cavidades bucais.³⁹ Dos animais selecionados, foram perdidos 5,75% (n=3) durante a complementação da

sedação anestésica com maleato de acepromazina. Embora exista o risco de perda do animal, o período de sedação prolongado, por 2 a 3 h, é considerado de extrema importância para que os fungos gerem tubos germinativos, transformando-se em hifas e pseudohifas, permitindo assim a invasão tecidual.¹²³ A severidade da infecção tem sido correlacionada com o período de sedação dos animais, uma vez que a mesma evita a deglutição da *Candida*, reduzindo sua presença no esôfago e estômago, promovendo melhor colonização e invasão tecidual na cavidade bucal.^{95,123,124}

A literatura apresenta diferentes modelos de dispositivos acrílicos intra-orais, os quais incluem a incorporação de bandas metálicas de aço inoxidável para cimentação ao redor dos incisivos superiores dos animais^{51,66} e a confecção de porções fixas e removíveis com a inclusão de ímãs e fios ortodônticos.^{53,58} Os dispositivos palatais utilizados nessa pesquisa foram baseados no modelo de dispositivo cimentado desenvolvido por Hotta et al.⁵⁵ No entanto, modificações foram realizadas com o intuito de aprimorar seu *design* e fixação. Optou-se por utilizar resina acrílica termopolimerizável incolor para a confecção dos dispositivos, a fim de melhorar a visualização durante a adaptação e instalação dos mesmos. A visibilidade no momento da fixação é essencial, visto que qualquer defeito na superfície dos dispositivos pode comprometer a adaptação e, com isso, sua permanência na cavidade bucal. Ao adicionar nitrato de miconazol à resina acrílica autopolimerizável, Norris e colaboradores²⁸ obtiveram dispositivos opacos, que dificultaram a detecção de falhas, e como consequência, nove dispositivos foram perdidos no decorrer do experimento.

Além da forma de fixação, a dieta administrada aos animais é um fator importante para a permanência dos dispositivos na cavidade bucal e, consequentemente, para o desenvolvimento da candidose. Ao receberem dieta pastosa e terem os dispositivos fixados com cimento resinoso, apenas um animal utilizado neste estudo perdeu o aparato. Em contrapartida, Jennings e MacDonald²⁴ relataram a perda de 13 dispositivos durante os primeiros dias pós-instalação. Em tal estudo, os animais foram alimentados com ração sólida e os dispositivos, fixados por meio da cimentação de uma banda metálica nos incisivos utilizando resina acrílica autopolimerizável. Estes autores recuperaram *Candida* em apenas três animais após o período de uso dos dispositivos, o qual teve duração de 28 dias. Dentre as opções de dietas já testadas para tal fim na literatura, as dietas líquida,³⁴ pastosa^{52,55} e em

gel²⁵ são que apresentaram os melhores resultados, com menor acúmulo de detritos alimentares entre os dispositivos e palatos dos animais.

Um dos principais diferenciais do presente modelo de indução de estomatite protética é a utilização de dispositivos palatais que possibilitaram a infecção do palato e da língua concomitantemente, visto que os aparatos são totalmente imersos no inóculo de *C. albicans* durante sua contaminação. Os modelos apresentados na literatura consistem na inoculação do microrganismo apenas no palato e/ou parte interna dos dispositivos.^{24,25,29-33,39,58} Tobouti et al.³⁴ contaminaram seus dispositivos com um biofilme de *C. albicans* de maneira semelhante ao presente estudo, no entanto, relataram que somente a porção interna dos dispositivos foi contaminada e não encontraram sinais de inflamação nas línguas dos animais avaliados.

Durante a comparação dos diferentes protocolos de indução de candidose bucal na segunda etapa do Estudo I, foi possível observar que os grupos inoculados com uma suspensão líquida de *C. albicans* apresentaram valores de recuperação de *C. albicans* inferiores àqueles que utilizavam dispositivos acrílicos contaminados. Tais achados estão de acordo com Shakir et al.,³⁰ que notaram que a presença de um aparato acrílico foi fundamental no desenvolvimento da estomatite protética, visto que apenas a inoculação não foi capaz de promover alterações clínicas e histológicas no palato dos animais. Uma possível justificativa para isso seria o fato de que o uso dos dispositivos promove condições favoráveis à formação de biofilme e conversão em hifas, como a exaustão de metabólitos ou a baixa tensão de oxigênio.³⁰

Na segunda etapa do Estudo I, os animais não foram submetidos à antibioticoterapia e tiveram os dispositivos mantidos em posição assim como proposto por Tobouti et al.³⁴ Entretanto, estes autores observaram eritema puntiforme (tipo I de Newton) logo após a remoção de dispositivos utilizados por quatro dias e, no presente estudo, não foram encontradas alterações visuais nos palatos dos animais no decorrer de todo o experimento. Isto pode ter sido devido ao fato de que esses autores administraram uma dieta líquida suplementada com vitaminas e aminoácidos aos animais. Essa administração não foi seguida neste estudo uma vez que Hotta et al.⁵⁵ relataram que a dieta líquida, apesar de propiciar menor acúmulo de detritos nos dispositivos intra-orais, causou perda de peso, escurecimento dos pelos, prostração e morte de muitos animais por desnutrição após 7 dias de avaliação. No presente estudo, também não foram registradas

alterações de comportamento e de peso dos animais ou mortes decorrentes da utilização dos dispositivos ou da administração da dieta pastosa.

Embora não tenha sido o objetivo inicial do presente estudo, foram observadas regiões despapiladas nas línguas dos animais dos grupos In, Dc e In+Dc que estão associadas à indução de candidose.³⁷ De acordo com Van Wyk et al.,¹²⁵ a superfície dorsal da língua parece ser a melhor região anatômica para avaliar o desenvolvimento de lesões por *C. albicans*. Provavelmente, a razão pela qual isso ocorre está relacionada ao tipo de epitélio, visto que o epitélio da língua não é tão denso e ortoqueratinizado como o do palato duro.¹²⁶ Ainda, Samaranayake e Samaranayake¹²⁷ relataram que língua de ratos imunocompetentes é facilmente colonizada por *Candida*, apresentando lesões condizentes com glossite romboide mediana e candidose atrófica.

A recuperação de *C. albicans* foi baixa após o período de indução da candidose bucal, visto a concentração inoculada inicialmente. Esses achados condizem com as observações da segunda etapa do Estudo I. Apesar de não terem sido visualizadas alterações no palato dos animais, ainda foi possível recuperar o fungo nas coletas dos palatos em até quatro dias após a indução da candidose bucal (T1) e maiores valores de recuperação foram obtidos no grupo In+Dc. Histologicamente, não foram encontradas alterações no palato e língua de nenhum animal, independente do grupo experimental, achado condizente com o aspecto clínico observado ao final do período de acompanhamento de 7 dias. Dessa forma, a segunda hipótese testada no Estudo I foi aceita e estes resultados estão de acordo com Conti et al.,¹²⁸ que relataram que animais adultos são resistentes à colonização fúngica e à candidose e que a completa perda de fungos ocorre entre três a quatro dias após sua inoculação oral. De acordo com Junqueira et al.,³⁷ as lesões desaparecem e as hifas de *Candida* são eliminadas do organismo pelo sistema imune do hospedeiro.

Diferentes abordagens têm sido propostas para auxiliar no desenvolvimento de candidose bucal em modelo murino, tais como a administração de antibióticos,^{23,36-38,58,67-69,95,120,129,130} imunossupressores,^{36,38,39,67-69,95,131} e antimuscarínicos,²⁶ além da realização de sialoadenectomia^{132,133} e até mesmo alimentação com dieta rica em carboidratos.¹³⁰ A administração de imunossupressores tem sido uma alternativa pouco explorada para o desenvolvimento de estomatite protética,³⁹ apesar de existirem protocolos com o uso

desses medicamentos para o desenvolvimento da infecção na língua de ratos e camundongos.^{36,38,67,69,95,121,131} No entanto, essa abordagem pode ser questionada pelo fato de que a estomatite protética não acomete apenas pacientes imunocomprometidos e por haver relatos de severo comprometimento do bem-estar dos animais, com perda significativa de peso e redução do *grooming* e de suas atividades.¹²¹

Com isso, optou-se por instituir antibioticoterapia com a administração de tetraciclina na concentração de 0,83 mg/mL na água de beber dos animais.⁶⁷⁻⁶⁹ O regime antibiótico teve início 7 dias antes da inoculação da *Candida* e instalação dos dispositivos contaminados e continuou até o fim do experimento. Apesar da mudança no sabor da água poder influenciar negativamente o seu consumo, o tratamento com agentes antibacterianos pode ser importante na transição de comensalismo para parasitismo¹³⁴ e na erradicação da população antagônica comensal da microbiota bucal,¹²⁷ além de ser um método bastante empregado na literatura.^{23,36-38,67-69,95,120,130} Ainda que o volume de água consumido pelos animais não tenha sido contabilizado, pôde-se observar que a adição do fármaco não os inibiu de consumi-la. Como as gaiolas continham mais de um animal, não foi possível determinar a quantidade exata de tetraciclina ingerida por cada um, porém, o mesmo protocolo foi realizado por outros estudos^{67,68,95} sem menção sobre o comprometimento dos resultados.

A associação do uso de dispositivos acrílicos intra-orais com a administração de tetraciclina tornou os animais dos grupos Di e In+Dc vulneráveis à contaminação por outros fungos que não somente *C. albicans*. A espécie de *C. krusei* já foi identificada previamente em outro estudo de indução de candidose em ratos submetidos à antibioticoterapia, e estava presente na cavidade bucal de um animal e também em uma amostra de ração.²³ A presença de fungos de diferentes gêneros tais como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. foi relatada em um biotério de Nova Orleans, tendo sido sua origem atribuída ao material utilizado para forrar as gaiolas dos animais.¹³⁵

A terceira hipótese testada no Estudo I também foi aceita. Visualmente, os palatos dos animais apresentaram discreto eritema puntiforme grau I de Newton,⁹ e as línguas encontravam-se despapiladas e com placas esbranquiçadas imediatamente após o período de indução da estomatite protética. A concentração de UFC/mL de *C. albicans* nesta etapa do estudo foi dez vezes superior à

recuperada a partir das coletas no palato dos animais que não receberam antibiótico. Nas lâminas histológicas dos palatos dos animais foi possível notar a presença de microabscessos e discreto infiltrado inflamatório e, apesar da ausência de pseudo-hifas e leveduras, as mesmas foram observadas em microscópio confocal a laser. As lâminas das línguas apresentaram microabscessos, intenso infiltrado inflamatório e penetração de pseudo-hifas e leveduras no epitélio. Foldvari et al.,³⁸ Ishijima et al.,⁹⁵ Martinez et al.³⁶ e Junqueira et al.³⁷ relataram a presença de pseudo-hifas e blastóporos, microabscessos, hiperplasia epitelial, hiperparaqueratose, espongiose, exocitose e infiltrado inflamatório nas línguas dos animais após acompanhamento igual ou superior a 7 dias. Nestes estudos, a tetraciclina também foi administrada na água de beber com^{36,38,95} ou sem³⁷ a associação de imunossupressores.

No presente estudo, objetivou-se desenvolver estomatite protética em ratos imunocompetentes seguindo protocolos de curta duração estabelecidos na literatura. Visto que inicialmente não foram observadas alterações clínicas nos palatos dos animais, optou-se então por se instituir antibioticoterapia como uma medida que facilitasse a infecção por *C. albicans*. Ainda assim, o aspecto visual da mucosa palatal apresentou alterações muito sutis, sugerindo que protocolos mais invasivos e/ou de exposição prolongada ao microrganismo sejam testados futuramente. Apenas dois estudos^{25,34} encontrados na literatura disponível apresentam imagens do aspecto clínico do palato dos animais, sendo que em ambos os animais utilizados eram imunocompetentes e não foram tratados com antibióticos. Os autores desses estudos encontraram lesões dos tipos I e II da classificação de Newton.⁹ Além da dieta líquida utilizada por Tobouti et al.,³⁴ outra possível justificativa para tais resultados seria a utilização de uma pasta de leveduras sedimentadas,²⁵ a qual, segundo os autores, teve resultados superiores quando comparados à suspensão líquida. Outra diferença diz respeito à duração dos protocolos para indução da doença. Enquanto Tobouti e colaboradores³⁴ desenvolveram lesões do tipo I em 4 dias de uso de dispositivos intra-orais contaminados com biofilme de *C. albicans*, Johnson e colaboradores²⁵ levaram de 6 a 8 semanas após a inoculação da pasta de leveduras nos dispositivos para observar lesões do tipo II da classificação de Newton.⁹

A escassez de imagens clínicas poderia ser justificada pelo fato de que as lesões de estomatite protética em ratos, apesar de histologicamente semelhantes,

são clinicamente mais discretas do que aquelas encontradas em humanos.²⁶ Assim, outra alternativa seria a utilização apenas dos métodos de contagem de colônias viáveis e de análise histopatológica como parâmetros indicativos da presença da doença. Uma das limitações do presente estudo a ser considerada foi a utilização de ratos Wistar convencionais, visto que Jones e colaboradores¹³⁶ relataram que em animais *germ-free* a contaminação por *Candida* ocorre de maneira mais intensa. Na sequência, outros animais do grupo In+Dc submetidos à antibioticoterapia deverão ser acompanhados pelo período de 7 dias após a instalação da doença a fim de verificar a sua longevidade, assim como na segunda etapa do Estudo I.

7. CONCLUSÃO

- A irradiação por energia de micro-ondas foi o único método dentre os testados que promoveu a esterilização dos dispositivos palatais e o protocolo utilizado para a contaminação dos dispositivos palatais demonstrou-se adequado e satisfatório para a formação de biofilme de *C. albicans*;
- Os protocolos de indução de candidose não foram eficazes o suficiente para induzir alterações visíveis nos palatos dos animais imunocompetentes, apenas nas suas línguas. A contagem de UFC viáveis foi baixa e diminuiu com o passar do tempo. O grupo In+Dc foi o que apresentou as alterações mais severas;
- Com a administração de tetraciclina na água de beber, o protocolo In+Dc foi aprimorado, permitindo o desenvolvimento de lesões de estomatite protética, as quais foram confirmadas macroscopicamente, microscopicamente e histologicamente.

ESTUDO II

Avaliação de toxicidade sistêmica aguda à clorexidina em ratos Wistar

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a toxicidade aguda hepática, renal, pulmonar e gástrica causada pela administração de doses tóxicas de Clx em ratos machos por meio de análises bioquímicas e histológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar os parâmetros bioquímicos transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), fosfatase alcalina na verificação de hepatotoxicidade aguda à Clx em ratos machos;
2. Quantificar os parâmetros bioquímicos ureia, creatinina e ácido úrico na verificação de nefrotoxicidade aguda à Clx em ratos machos;
3. Quantificar os parâmetros bioquímicos glicemia e lactato desidrogenase na verificação de outras alterações metabólicas agudas frente à administração de Clx em ratos machos;
4. Avaliar por meio da coloração de hematoxilina-eosina (H.E.) a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, toxicidade pulmonar e gástrica agudas à Clx em ratos machos;

3.3 HIPÓTESES TESTADAS

1. Os danos sistêmicos hepático, renal, pulmonar e gástrico causados pela administração via gavagem da Clx poderiam ser detectados por meio de análises bioquímicas e/ou histológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a execução do Estudo II, foram utilizados 18 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), que apresentavam 90 dias de idade e peso entre 300 g e 400 g. Os animais foram obtidos por meio do 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 de alimentação e alojamento dos animais também foram 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 receberam água *ad libitum* e 150 g de ração sólida por gaiola/dia, proveniente do NAEVI/UEPG. O consumo de comida foi avaliado durante o experimento, ao se realizar a pesagem da ração remanescente nas gaiolas a cada 24 h. Verificou-se a média de ração consumida nos três dias anteriores à gavage e a quantidade consumida 24 h após o procedimento.

Os animais foram alojados em gaiolas em grupos de 4 ou 5. Cada gaiola apresentava apenas animais do mesmo grupo, para que fosse possível estimar a quantidade de ração consumida pelo grupo após o experimento. Os ratos foram identificados por meio de marcações em suas caudas com canetas esferográficas. As caixas nas quais os animais foram armazenados apresentavam identificação conforme protocolo do NAEVI/UEPG.

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° e 24°C e taxa de umidade relativa entre 45 e 55%.

Para a manipulação dos animais, os pesquisadores utilizaram equipamentos de proteção individual (EPIs), de acordo com a Resolução CEPE/UEPG n.057, de 13 de julho de 2004. Todos os materiais e instrumentais utilizados durante a pesquisa foram previamente esterilizados e aqueles não passíveis de esterilização foram adequadamente desinfetados.

No decorrer do experimento, a saúde dos animais foi monitorada por meio da observação de condições como a quantidade de ração consumida e massa corporal.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O Estudo II contou com dois grupos experimentais (n=9):

1. Controle negativo (CN): administração de 1,5 mL de água destilada (veículo);
2. Clorexidina (Clx): administração de 1,5 g/Kg de diacetato de Clx⁴³ diluído no veículo (300 µL de uma suspensão de Clx a uma concentração de 0,5 g/mL para cada 100 g de peso do animal).

As substâncias foram acondicionadas em seringas de 3 mL (PROCARE; Lamedid Comercial e Serviços Ltda., Barueri, SP) e administradas por um operador experiente em dose única via gavagem utilizando uma sonda esofágica (Figura 47) estando os animais estabilizados porém não sedados.

FIGURA 47 - Sonda esofágica utilizada para o procedimento de gavagem



Fonte: O autor.

4.3 ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Após 24 h da administração via gavagem, os animais foram anestesiados para coleta de sangue via punção cardíaca.¹³⁷ Diferente do Estudo I, os animais foram sedados anteriormente à realização da eutanásia com hidrato de cloral a 4% (Sigma-Aldrich) administrado intraperitonealmente na dose de 1 mL para cada 100 g de peso do animal.

Para tal, utilizou-se seringas de 3 mL heparinizadas e agulhas 0,8 x 30 mm (21G; BD PrecisionGlide™, Curitiba, PR). O volume de sangue coletado ($\approx$ 3 mL) foi transferido para *ependorfs* contendo 2 µL de heparina (Actparin®; Bergamo,

Taboão da Serra, SP), os quais foram agitados delicadamente de forma que o sangue se misturasse com a heparina. Em seguida, realizou-se a centrifugação (Centrifuge 5810 R, Eppendorf do Brasil) das amostras a 5.000 rpm por 7 min para obtenção do plasma sanguíneo, o qual foi transferido para novos *eppendorfs*, que foram armazenados em freezer -20°C (Electrolux, Curitiba, PR) até o momento da realização das análises.

As análises bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório Escola da UEPG. Foram dosados os níveis de glicemia, ureia, creatinina, ácido úrico, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), fosfatase alcalina e lactato desidrogenase.

4.4 OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Feita a coleta do sangue, a eutanásia foi realizada por deslocamento cervical e confirmada ao se verificar ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos.⁷⁰

Os órgãos (rins, pulmões, fígado e estômago) foram removidos cirurgicamente e acondicionados em frascos com solução de formalina 10% contendo PBS e encaminhadas para o processamento histológico.

Após o fim do experimento, as carcaças dos animais foram encaminhadas ao NAEVI/UEPG e incineradas, seguindo as normas preconizadas pela Instituição.

4.4.1 Processamento das amostras histológicas

Idem à forma de processamento das línguas do Estudo I, descrita no item 4.7.3.1.

4.4.2 Obtenção das fotomicrografias

Idem ao item 4.7.3.2 do Estudo I.

4.4.3 Análise histopatológica

De maneira geral, os órgãos removidos foram analisados quanto à presença de vasodilatação, vasocongestão, exsudato inflamatório, áreas hemorrágicas e/ou necróticas e sinais de inflamação tecidual. Mais especificamente, as alterações pulmonares abrangeram a desorganização e/ou colapso dos alvéolos; as hepáticas consideraram a ocorrência de edema (vacuolização) dos hepatócitos e

perda do contorno celular; as gástricas compreenderam desorganização do epitélio e destruição da mucosa gástrica; e as renais incluíram desorganização tecidual e glomérulos alterados. Foram atribuídos os seguintes escores para comparação:

- 0: sem alterações;
- 1: alterações muito leves;
- 2: leves;
- 3: moderadas e
- 4: severas.

As fotomicrografias foram avaliadas por dois histopatologistas experientes, calibrados e cegos para este experimento. Inicialmente, os avaliadores examinaram as secções histológicas individualmente e, então, reuniram-se para discutir as características das imagens e atribuir o escore que melhor representava cada uma.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises de monitoramento dos animais, inicialmente, foi constatada a normalidade dos dados com o teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de Levene e, na sequência, o peso e o consumo de ração para cada grupo antes e pós-gavage foram comparados utilizando a ANOVA 2-fatores de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$) (IBM SPSS 19; SPSS Inc.).

Para as análises dos parâmetros bioquímicos, constatou-se a normalidade dos dados com o teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade com o teste de Levene a um nível de significância de 95% (IBM SPSS 19; SPSS Inc.). Os resultados foram, na sequência, analisados pelo teste T não-pareado ($\alpha=0,05$, IBM SPSS 19; SPSS Inc.).

Para a comparação entre os escores atribuídos aos grupos para as análises histopatológicas de todos os órgãos foi utilizado o teste de qui-quadrado ($\alpha=0,05$, IBM SPSS 19; SPSS Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 MONITORAMENTO DOS ANIMAIS

Nenhum animal foi perdido durante o Estudo II. No entanto, foi possível observar dificuldades respiratórias e alterações comportamentais em cinco animais do grupo Clx (55,5%) logo após a realização da gavagem. Esses animais mostraram-se acuados, com redução das atividades e indiferentes à manipulação até o momento da eutanásia. Além disso, dois animais do grupo Clx (22,2%) apresentaram escurecimento dos pelos e irritação cutânea.

As médias referentes ao peso dos animais e consumo de ração estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Média e DP dos pesos inicial e final (g) dos animais e do consumo de ração (g) três dias antes e 24 h após a gavagem

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Consumo de ração (g) pré- gavagem	Consumo de ração (g) pós- gavagem
CN	342,0 ± 22,0 B	352,2 ± 26,2 A	127,6 ± 21,3 A	126,0 ± 33,8 A
Clx	351,9 ± 32,7 A	340,2 ± 21,0 B	125,9 ± 15,0 A	26,4 ± 14,2 B

Fonte: O autor.

Médias ± DP seguidos por letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA 2-fatores de medidas repetidas e teste de Tukey HSD)

Houve aumento e redução estatisticamente significativos no peso dos animais dos grupos CN e Clx, respectivamente ($p=0,001$). Além disso, os animais do grupo Clx apresentaram diminuição estatisticamente significativa no consumo de ração ($p=0,008$). Para o grupo CN, não houve diferença no consumo de ração antes e pós-gavagem ($p=0,890$).

O peso inicial dos animais do grupo CN era inferior ao do grupo Clx e, após gavagem, o peso dos animais do grupo experimental Clx igualou-se ao peso inicial do grupo CN ($p<0,001$). O consumo inicial de ração foi semelhante entre os grupos ($p=0,935$) e, após gavagem, o consumo de ração do grupo Clx foi estatisticamente inferior ao do grupo CN ($p=0,012$).

5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os achados de tal avaliação estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores bioquímicos plasmáticos médios após administração via gavagem de dose única de veículo (CN) ou de Clx em ratos

Parâmetros bioquímicos	CN	Clx
Glicose (mmol/L)	10,64 ± 1,24	11,40 ± 1,09
Ureia (mmol/L)	15,23 ± 1,54	13,87 ± 3,95
Creatinina (μmol/L)	29,56 ± 4,78	29,07 ± 3,84
Ácido úrico (μmol/L)	66,08 ± 50,33	38,33 ± 22,86
TGO (IU/L)	93,00 ± 22,20	125,00 ± 32,40*
TGP (IU/L)	76,22 ± 14,10	107,44 ± 28,74*
Fosfatase alcalina (IU/L)	403,89 ± 119,31	274,22 ± 91,44*
Lactato desidrogenase (IU/L)	263,00 ± 104,22	243,44 ± 92,70

Fonte: O autor.

* Diferença estatisticamente significativa (teste *T* não-pareado).

Não houve diferença significativa entre os grupos para os parâmetros glicose ($p=0,189$), ureia ($p=0,412$), creatinina ($p=0,495$), ácido úrico ($p=0,236$) e lactato desidrogenase ($p=0,680$). Maiores valores de TGO ($p=0,026$) e TGP ($p=0,009$) foram encontrados para o grupo Clx em relação ao grupo CN. Para fosfatase alcalina, o grupo Clx apresentou menores valores em relação ao grupo CN ($p=0,020$).

5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os resultados referentes à análise histopatológica realizada pelos examinadores são exibidos na Figura 48.

Com base nessa avaliação, determinou-se que a maioria dos pulmões de ambos os grupos apresentou danos leves ($p=0,451$; Figura 48), correspondentes ao escore 2 (56% do grupo CN e 44% do grupo Clx). Dentre essas alterações, podem-se citar áreas de hemorragia e exsudato, vasocongestão e presença de infiltrado inflamatório (Figuras 49A e 49B).

O escore 3 (danos moderados) foi o mais frequente para os fígados dos animais do grupo CN (6 dos 9 animais, cerca de 67%), enquanto que a maior parte dos animais do grupo Clx não apresentou alterações hepáticas (escore 0 para 8 dos 9 animais, cerca de 89%) ($p=0,009$; Figura 48). A alteração mais comum encontrada foi edema celular nos hepatócitos (Figura 49C).

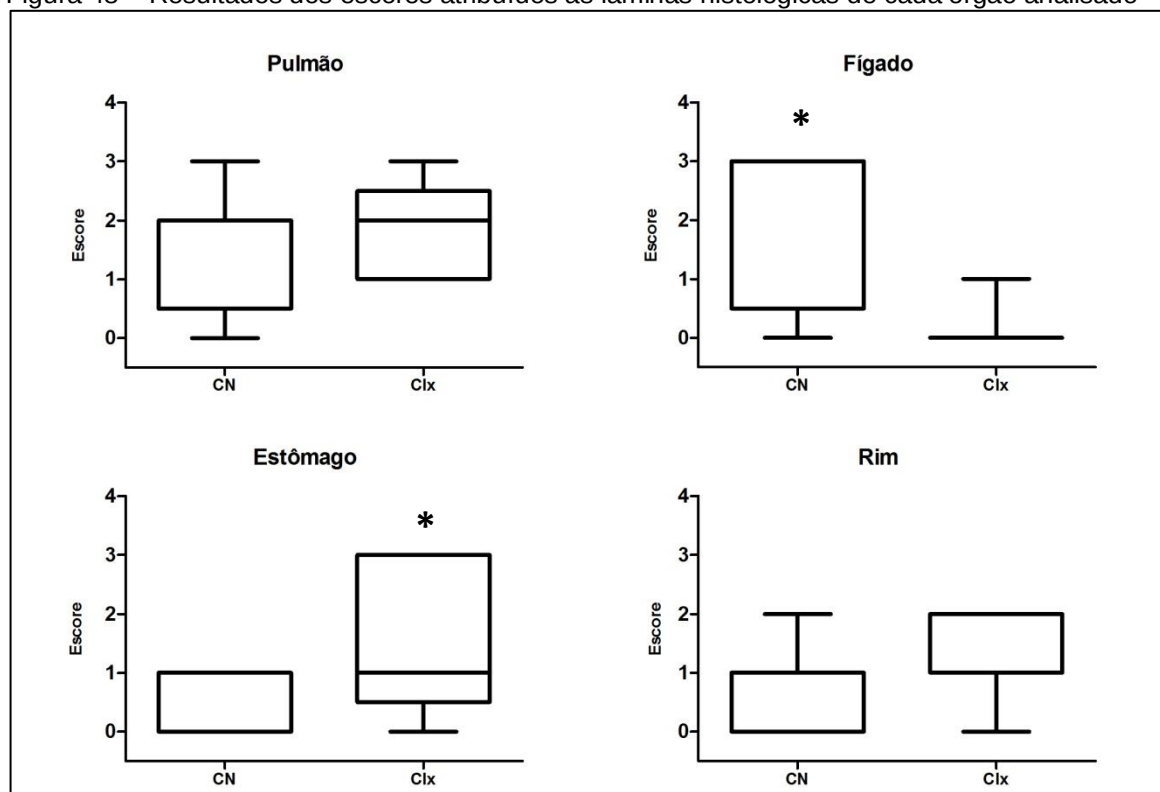
A administração de Clx causou danos moderados ($p=0,05$) ao estômago de 4 dos 9 animais utilizados (44%), os quais incluíram desorganização do epitélio da mucosa gástrica, presença de infiltrado inflamatório, extravasamento de hemácias e

áreas necróticas (Figura 49F). Já para os animais do grupo CN, as lâminas se revelaram com aspecto de normalidade ou com alterações muito leves (cerca de 67% e 33%, respectivamente) (Figura 49E).

Finalmente, a avaliação histológica dos rins revelou aspecto de normalidade ou alterações muito leves nos animais controle (cerca de 67% e 33%, respectivamente) e alterações leves na maioria dos animais do grupo experimental (cerca de 56%) ($p=0,120$), das quais podem-se citar algumas áreas focais de hemorragia, congestão vascular e exsudato (Figura 49H).

Não se atribuiu escore 4 (alterações severas) a nenhum órgão avaliado, independente do grupo.

Figura 48 – Resultados dos escores atribuídos às lâminas histológicas de cada órgão analisado

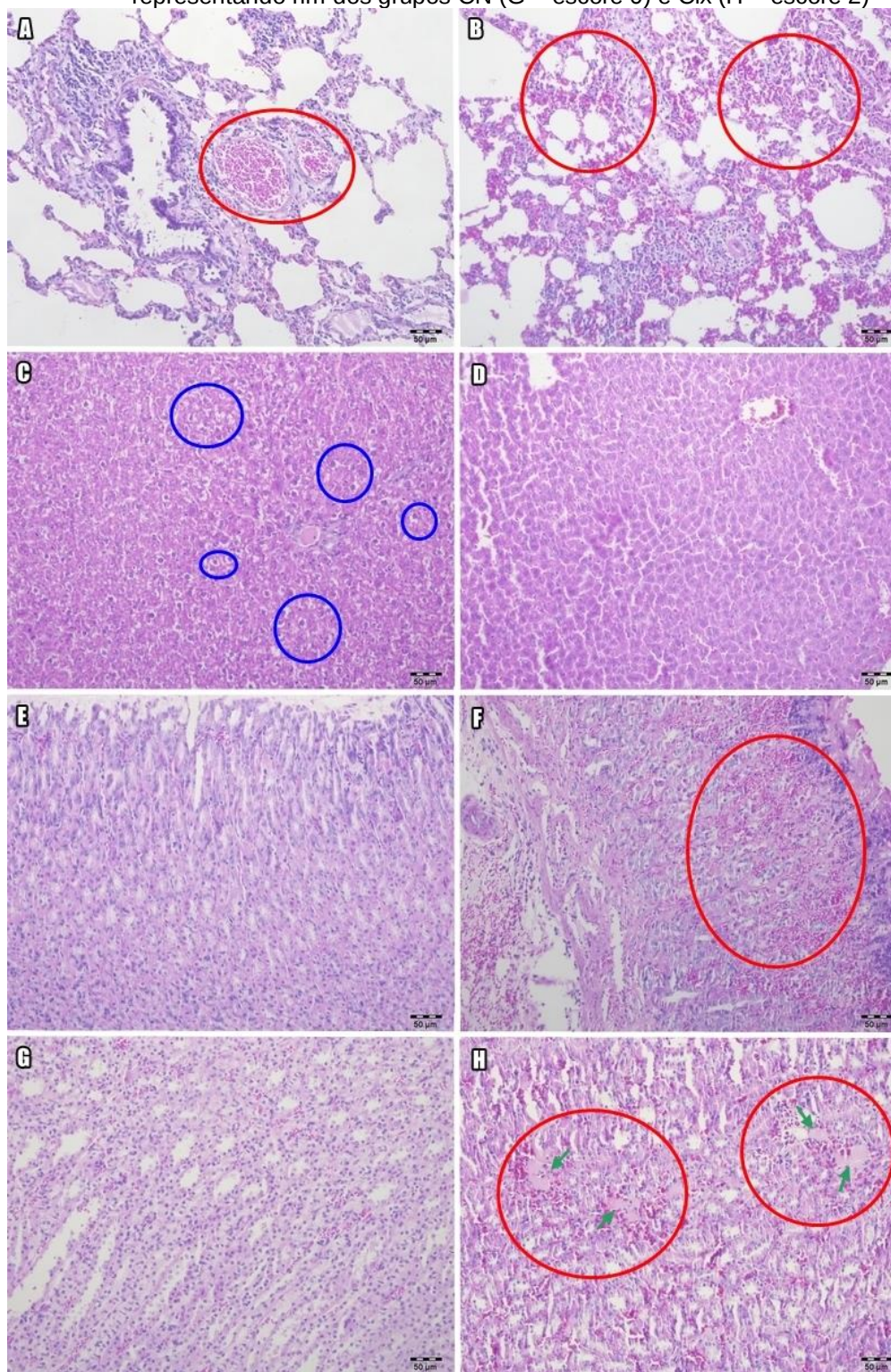


Fonte: O autor.

Medida de tendência central: mediana (Q2); Dispersão dos dados: desvio inter-quartil (Q1 e Q3) e Amplitude: valores máximo e mínimo.

* Diferença estatisticamente significativa (teste Qui-quadrado).

FIGURA 49 – Lâminas histológicas dos órgãos analisados coradas em H.E. (aumento de 200x). Lâminas representando pulmão dos grupos CN (A – escore 2) e Clx (B – escore 2); Lâminas representando fígado dos grupos CN (C – escore 3) e Clx (D – escore 0); Lâminas representando estômago dos grupos CN (E – escore 0) e Clx (F – escore 3); Lâminas representando rim dos grupos CN (G – escore 0) e Clx (H – escore 2)



Fonte: O autor.

Áreas destacadas em vermelho indicam regiões hemorrágicas ou de extravasamento de hemácias; Estruturas destacadas em azul indicam hepatócitos edemaciados; Setas verdes indicam áreas com presença de exsudato.

6. DISCUSSÃO

A administração via gavagem de Clx na concentração de 1,5 g/Kg utilizada no presente estudo foi segura e não resultou na perda de nenhum animal, assim como reportado por Chow et al.⁴³ Entretanto, foram identificadas algumas alterações após a realização da gavagem nos animais do grupo Clx, como dificuldades respiratórias, redução do padrão de atividades e do consumo de ração e perda de peso, achados condizentes com a literatura.^{27,42,44} Diferente do relatado por Xue et al.,⁴² os animais não se recuperaram dentro de duas horas após a administração do fármaco, continuando indispostos até o momento da eutanásia.

A dose de Clx utilizada foi estabelecida com base no estudo realizado por Chow e colaboradores,⁴³ no qual os animais apresentaram sinais de danos hepáticos e renais, sem, no entanto, irem a óbito. Ao se calcular a dose equivalente em humanos, obtém-se o valor de 243,2 mg/Kg, o que corresponde a 14,6 g para uma pessoa pesando 60 Kg.¹³⁸ Tal concentração é inferior à ingerida em uma tentativa de suicídio mal sucedida relatada por Massano e colaboradores,⁴¹ na qual um paciente consumiu cerca de 30 g de Clx e muito superior à concentração inibitória mínima ao biofilme de *C. albicans* para a Clx, estabelecida para a incorporação em materiais resilientes para reembasamento de próteses totais (64 mg de Clx para cada grama de material).¹⁵ O volume administrado aos animais foi considerado aceitável¹³⁹ e foi baseado no estudo piloto que verificou que quantidades menores de água destilada não foram capazes de diluir totalmente a Clx, resultando em acúmulo do fármaco no estômago dos animais e, com isso, comprometendo sua absorção.

A hipótese de que os danos hepático, renal, pulmonar e gástrico causados pela administração via gavagem da Clx poderiam ser detectados por meio de análises bioquímicas e/ou histológicas foi parcialmente aceita, uma vez que não foram observados danos renal e pulmonar por essas avaliações.

Os animais do grupo Clx apresentaram aumento significativo da atividade das enzimas TGO e TGP, indicando alterações hepáticas. Outros estudos já demonstraram a capacidade da Clx em elevar os níveis dessas enzimas, tanto em ratos Wistar,⁴³ como em humanos.⁴¹ Também se notou redução significativa nos níveis de fosfatase alcalina, alteração não identificada por Xue et al.⁴² Esse decréscimo poderia ser resultado de uma injúria à mucosa intestinal.¹⁴⁰ Apesar de o intestino não ter sido analisado, a literatura apresenta um caso de necrose da

mucosa intestinal devido à ingestão indevida de Clx.⁴¹ Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros creatinina, ureia, ácido úrico, lactato desidrogenase e glicemia. Esses achados também foram contra os expostos por Xue et al.,⁴² que relataram aumento significativo dos níveis de creatinina e lactato desidrogenase nos animais que receberam Clx na concentração de 0,2%. Essas divergências poderiam ser explicadas pelas diferentes concentrações, via de administração do fármaco utilizadas e períodos avaliados.

Embora as dosagens de TGO e TGP tenham se apresentado elevadas para o grupo Clx, sugerindo alterações no fígado, a grande maioria das lâminas histológicas dos animais pertencentes a esse grupo mostrou-se com aspecto de normalidade, sugerindo um possível reparo tecidual. Estudos que induziram danos hepáticos em ratos mostraram que o reparo tecidual ocorreu de forma relativamente rápida, em até 120 h após a indução da injúria.^{141,142} Apesar de não existir uma comparação direta entre o potencial danoso da Clx e os protocolos destes estudos, outra evidência que reforça essa possibilidade é o fato de os animais do grupo Clx terem se mantido praticamente sem alimentação durante o período experimental e a existência de relatos que mostraram que o reparo tecidual em animais sob restrição alimentar é maior do que naqueles que recebem alimentação *ad libitum*.¹⁴² Ainda, o restabelecimento da normalidade nos níveis de TGO e TGP aparenta ser mais lento, com estudos mostrando altas dosagens após 7 dias da administração da Clx para ratos⁴² até 6 meses⁴¹ após a ingestão por um paciente de 150 mL de gluconato de Clx. Por outro lado, os fígados dos animais do grupo CN apresentaram danos moderados significativos, principalmente edema nos hepatócitos, achado um tanto quanto contraditório, visto que não há relatos de que a água destilada ou a técnica da gavagem em si poderiam provocar tal reação.

A administração de Clx provocou danos gástricos moderados com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, dentre os quais podem-se elencar áreas de necrose tecidual, presença de infiltrado inflamatório e desorganização do epitélio da mucosa gástrica. Xue e colaboradores⁶² reportaram o desenvolvimento de necrose e congestão estomacal após administração via oral de Clx na dose de 1250 mg/Kg para ratos Sprague-Dawley e Roche et al.⁴⁸ relataram a ocorrência de múltiplas erosões na parte inferior do estômago de um paciente que ingeria a substância de forma inadvertida.

Apesar de Grassi et al.⁴⁶ e Xue et al.⁶² sugerirem que o rim é um órgão suscetível à ação tóxica da Clx, não foram encontrados sinais de danos renais moderados ou severos no presente estudo. As dosagens de creatinina, ureia e ácido úrico do grupo experimental não divergiram significativamente das do grupo controle e, histologicamente, foi possível detectar algumas áreas focais de hemorragia, congestão vascular e exsudato, sem a ocorrência de necrose tecidual ou alteração nos glomérulos.

A fim de reduzir a ocorrência de possíveis vieses, algumas medidas foram tomadas durante a execução do experimento. Primeiramente, optou-se por mudar o protocolo anestésico utilizando hidrato de cloral a 4% para realização da punção cardíaca e eutanásia, visto que o cloridrato de xilazina tem como um de seus efeitos a ocorrência de hiperglicemia.¹⁴³ Decidiu-se administrar a Clx via gavagem tendo em vista a vantagem de garantir que todos os animais recebessem a mesma dose do fármaco.^{144,145} O gosto desagradável da Clx provavelmente inibiria os animais de consumi-la caso fosse adicionada à água de beber, assim como aconteceu no estudo de Kornman et al.⁴⁴ Ainda assim, existe a possibilidade da ocorrência de microaspiração,¹⁴⁶ o que poderia justificar as alterações histológicas encontradas nos pulmões dos animais controle. Apesar de tal limitação dificultar o estabelecimento dos efeitos tóxicos da Clx no tecido pulmonar, outros estudos já mencionaram seu potencial lesivo, relatando a ocorrência de espirros, dificuldades respiratórias, as quais também foram observadas no presente estudo, edema e hemorragia pulmonar,⁴² congestão dos alvéolos e capilares⁵⁹ e até mesmo síndrome do desconforto respiratório agudo.⁴⁹

Os achados deste estudo sugerem que os parâmetros bioquímicos TGO, TGP e fosfatase alcalina e que a análise histológica podem ser utilizados na detecção do potencial tóxico da Clx. Dessa forma, futuros estudos de toxicidade sistêmica da clorexidina em nível terapêutico poderão ser realizados utilizando como referências esses marcadores.

7. CONCLUSÃO

- Os parâmetros TGO e TGP podem ser utilizados para avaliar a hepatotoxicidade causada pela Clx, apesar de não haver alterações histopatológicas no fígado. Além disso, danos gástricos foram detectados por meio da análise histopatológica.

REFERÊNCIAS

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.
2. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil*. 2004 Feb;31(2):135-9.
3. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Oct;18(10):E380-8.
4. Emami E, Taraf H, de Grandmont P, Gauthier G, de Koninck L, Lamarche C, et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2012 Mar-Apr;25(2):113-9.
5. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonca G, McGraw K, Stoner L. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2016 Jun;25(4):288-301.
6. Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2013 Nov;110(5):356-62.
7. Hilgert JB, Giordani JM, de Souza RF, Wendland EM, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Geriatr Soc*. 2016 Dec;64(12):2539-45.
8. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995 Mar;61(3):199-200, 3-5.
9. Newton AV. Denture sore mouth as possible etiology. *Br Dent J*. 1962 1:357-60.
10. Shepherd MG. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidosis. *N Z Dent J*. 1986 Jul;82(369):78-81.
11. Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J Prosthet Dent*. 1994 May;71(5):517-24.
12. Schneid TR. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. *Spec Care Dentist*. 1992 Nov-Dec;12(6):245-50.
13. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001 21(1):4-8.

14. Urban VM, de Souza RF, Arrais CA, Borsato KT, Vaz LG. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. *J Prosthodont*. 2006 Sep-Oct;15(5):295-9.
15. Bueno M, Urban V, Barberio G, da Silva W, Porto V, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Dis*. 2015 Jan;21(1):57-65.
16. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakanoda S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *J Oral Rehabil*. 1997 May;24(5):350-7.
17. Bueno MG, Sousa EJB, Hotta J, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Surface Properties of Temporary Soft Liners Modified by Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungals. *Braz Dent J*. 2017 Jan-Apr;28(2):158-64.
18. Lima JFM, Maciel JG, Arrais CAG, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. Effect of the incorporation of antifungal agents on the water sorption and solubility of temporary soft materials for denture base relining. *J Prosthet Dent*. 2016 115(5):611-6.
19. Lima JFM, Maciel JG, Hotta J, Vizoto ACP, Honório HM, Urban VM, et al. Porosity of temporary denture soft liners containing antifungal agents. *J Appl Oral Sci*. 2016 24(5):453-61.
20. Neppelenbroek KH, Lima JF, Hotta J, Galitesi LL, Almeida ALPF, Urban VM. Effect of incorporation of antifungal agents on the ultimate tensile strength of temporary soft denture liners. *J Prosthodont*. 2017 In Press.
21. Sánchez-Aliaga A, Pellissari CVG, Arrais CAG, Michel MD, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of soft lining with antifungal to a denture base acrylic resin. *Dent Mater J*. 2016 35(2):194-203.
22. Parasuraman S. Toxicological screening. *J Pharmacol Pharmacother*. 2011 Apr;2(2):74-9.
23. Fisker AV, Rindom Schiott C, Philipsen HP. Short-term oral candidosis in rats, with special reference to the site of infection. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 1982 Feb;90(1):49-57.
24. Jennings KJ, MacDonald DG. Rat palatal histology related to denture-like appliances. *J Dent*. 1992 Aug;20(4):250-4.
25. Johnson CC, Yu A, Lee H, Fidel PL, Jr., Noverr MC. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis

- using a novel intraoral denture system. *Infect Immun*. 2012 May;80(5):1736-43.
26. Jones JH, Adams D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. *Br J Dermatol*. 1970 Dec;83(6):670-3.
 27. Lamb DJ, Martin MV. An in vitro and in vivo study of the effect of incorporation of chlorhexidine into autopolymerizing acrylic resin plates upon the growth of *Candida albicans*. *Biomaterials*. 1983 Jul;4(3):205-9.
 28. Norris MM, Lamb DJ, Craig GT, Martin MV. The effect of miconazole on palatal candidosis induced in the Wistar rat. *J Dent*. 1985 Dec;13(4):288-94.
 29. Olsen I, Bondevik O. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand J Dent Res*. 1978 Sep;86(5):392-8.
 30. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Induced palatal candidosis in the wistar rat. *Arch Oral Biol*. 1981 26(10):787-93.
 31. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Relative effectiveness of various yeasts, *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the Wistar rat. *Arch Oral Biol*. 1983 28(11):1069-71.
 32. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Effect on experimental palatal candidosis in the Wistar rat of removal and re-insertion of acrylic appliances. *Arch Oral Biol*. 1986 31(9):617-21.
 33. Shakir BS, Smith CJ, Martin MV. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the Wistar rat. *J Oral Pathol*. 1986 Aug;15(7):375-80.
 34. Tobouti PL, Casaroto AR, de Almeida RS, de Paula Ramos S, Dionisio TJ, Porto VC, et al. Expression of Secreted Aspartyl Proteinases in an Experimental Model of *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2016 Feb;25(2):127-34.
 35. Camacho-Alonso F, Martínez-Beneyto Y, Gallego MC, Cuello F, Buendía AJ, Pérez-Lajarin L, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. *J Oral Pathol Med*. 2016:1-7.
 36. Martinez A, Regadera J, Jimenez E, Santos I, Gargallo-Viola D. Antifungal efficacy of GM237354, a sordarin derivative, in experimental oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):1008-13.

37. Junqueira JC, Martins Jda S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009 Nov;24(6):877-84.
38. Foldvari M, Jaafari MR, Radhi J, Segal D. 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*. 2005 Jul;49(7):2887-94.
39. Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun*. 2010 Sep;78(9):3650-9.
40. Henschen A, Olson L. Chlorhexidine-induced degeneration of adrenergic nerves. *Acta Neuropathol*. 1984 63(1):18-23.
41. Massano G, Ciocatto E, Rosabianca C, Vercelli D, Actis GC, Verme G. Striking aminotransferase rise after chlorhexidine self-poisoning. *Lancet*. 1982 Jan 30;1(8266):289.
42. Xue Y, Zhang S, Yang Y, Lu M, Wang Y, Zhang T, et al. Acute pulmonary toxic effects of chlorhexidine (CHX) following an intratracheal instillation in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2011 Nov;30(11):1795-803.
43. Chow AY, Hirsch GH, Buttar HS. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of triclosan and chlorhexidine in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1977 Oct;42(1):1-10.
44. Kornman KS, Clark WB, Kreitzman SN, Alvarez C. Caries control in the albino rat with chlorhexidine gluconate (Hibitane). *Arch Oral Biol*. 1973 Feb;18(2):165-70.
45. Case DE. Safety of Hibitane. I. Laboratory experiments. *J Clin Periodontol*. 1977 Dec;4(5):66-,2.
46. Grassi TF, Camargo EA, Salvadori DM, Marques ME, Ribeiro DA. DNA damage in multiple organs after exposure to chlorhexidine in Wistar rats. *Int J Hyg Environ Health*. 2007 Mar;210(2):163-7.
47. Abdallah C. Perioperative chlorhexidine allergy: Is it serious? *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2015 Apr-Jun;31(2):152-4.
48. Roche S, Chinn R, Webb S. Chlorhexidine-induced gastritis. *Postgrad Med J*. 1991 Feb;67(784):210-1.

49. Ishigami S, Hase S, Nakashima H, Yamada H, Dohgomori H, Natsugoe S, et al. Intravenous chlorhexidine gluconate causing acute respiratory distress syndrome. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2001 39(1):77-80.
50. Kudo K, Ikeda N, Kiyoshima A, Hino Y, Nishida N, Inoue N. Toxicological analysis of chlorhexidine in human serum using HPLC on a polymer-coated ODS column. *J Anal Toxicol*. 2002 Mar;26(2):119-22.
51. Jennings KJ, MacDonald DG. A quantitative method for assessing changes in rat palatal histology under denture-like appliances. *Arch Oral Biol*. 1990 35(7):557-9.
52. Barclay SC, MacDonald DG, Watson IB. The effect of diet on palatal prosthetic coverage in rats. *J Dent*. 1997 Jan;25(1):71-8.
53. Lee H, Yu A, Johnson CC, Lilly EA, Noverr MC, Fidel PL, Jr. Fabrication of a multi-applicable removable intraoral denture system for rodent research. *J Oral Rehabil*. 2011 Sep;38(9):686-90.
54. Hotta J, Garlet GP, Cestari TM, Lima JFM, Porto VC, Urban VM, et al. In vivo biocompatibility of a temporary soft denture liner containing antifungal drugs. *J Prosthet Dent*. 2017 In Press.
55. Hotta J, Cral WG, Sakima VT, Lara VS, Urban VM, Neppelenbroek KH. Intraoral Device for Optimal Antifungal Delivery in a Rat Model. *Curr Drug Deliv*. 2017 14(5):658-67.
56. Martin MV, Appleton J, Chesters J, Smalley JW. The effect of *Candida albicans* on the permeability of rat palatal epithelium: an ultrastructural and biochemical study. *J Med Vet Mycol*. 1987 Feb;25(1):19-28.
57. Martin MV. A comparison of fluconazole and ketoconazole in the treatment of rat palatal candidosis. *J Med Vet Mycol*. 1989 27(2):63-70.
58. Yano J, Yu A, Fidel PL, Jr., Noverr MC. Transcription Factors Efg1 and Bcr1 Regulate Biofilm Formation and Virulence during *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. *PLoS One*. 2016 11(7):e0159692.
59. Orito K, Hashida M, Hirata K, Kurokawa A, Shirai M, Akahori F. Effects of single intratracheal exposure to chlorhexidine gluconate on the rat lung. *Drug Chem Toxicol*. 2006 Jan;29(1):1-9.
60. Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. *J Endod*. 2007 Jun;33(6):715-22.

61. Monteiro AS, Macedo LG, Macedo NL, Feitosa FA, Toyoshima T. Biocompatibility of a chlorhexidine local delivery system in a subcutaneous mouse model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):e278-84.
62. Xue Y, Zhang S, Tang M, Zhang T, Wang Y, Hieda Y, et al. Comparative study on toxic effects induced by oral or intravascular administration of commonly used disinfectants and surfactants in rats. *J Appl Toxicol*. 2012 Jul;32(7):480-7.
63. Rushton A. Safety of Hibitane. II. Human experience. *J Clin Periodontol*. 1977 Dec;4(5):73-9.
64. Hirata K, Kurokawa A. Chlorhexidine gluconate ingestion resulting in fatal respiratory distress syndrome. *Vet Hum Toxicol*. 2002 Apr;44(2):89-91.
65. Balit CR, Lynch AM, Gilmore SP, Murray L, Isbister GK. Lignocaine and chlorhexidine toxicity in children resulting from mouth paint ingestion: a bottling problem. *J Paediatr Child Health*. 2006 Jun;42(6):350-3.
66. Barclay SC, MacDonald DG, Watson IB. The effect of chairside relining materials on rat palatal mucosa. *J Dent*. 1997 May-Jul;25(3-4):251-5.
67. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003 47(5):321-6.
68. Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. *J Med Microbiol*. 2004 Jun;53(Pt 6):495-500.
69. Wong SS, Kao RY, Yuen KY, Wang Y, Yang D, Samaranayake LP, et al. In vitro and in vivo activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. *PLoS One*. 2014 9(1):e85836.
70. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim*. 1996 Oct;30(4):293-316.
71. Hawkins P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim*. 2002 Oct;36(4):378-95.
72. Neppelenbroek KH, Seo RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of

- conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* 2014 May;20(4):329-44.
73. Alves HN, da Silva AL, Olsson IA, Orden JM, Antunes LM. Anesthesia with intraperitoneal propofol, medetomidine, and fentanyl in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010 Jul;49(4):454-9.
 74. Seo RS, Murata H, Hong G, Vergani CE, Hamada T. Influence of thermal and mechanical stresses on the strength of intact and relined denture bases. *J Prosthet Dent.* 2006 Jul;96(1):59-67.
 75. ISO. International Organization for Standardization: Specification 1567: denture base polymers. 2nd ed. Switzerland: ISO; 1998.
 76. Silva PMB. Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilme de *C. albicans* em resinas acrílicas termopolimerizáveis. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo; 2009.
 77. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997 May;77(5):535-9.
 78. Barnabe W, de Mendonca Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 2004 May;31(5):453-9.
 79. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Palomari Spolidorio DM, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. *J Dent.* 2009 Sep;37(9):666-72.
 80. Peker I, Akca G, Sarikir C, Alkurt MT, Celik I. Effectiveness of alternative methods for toothbrush disinfection: an in vitro study. *ScientificWorldJournal.* 2014 2014:726190.
 81. Gantait S, Bhattacharyya J, Das S, Biswas S, Ghati A, Ghosh S, et al. Comparative assessment of the effectiveness of different cleaning methods on the growth of *Candida albicans* over acrylic surface. *Contemp Clin Dent.* 2016 Jul-Sep;7(3):336-42.
 82. Catalan A, Pacheco JG, Martinez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Mar;105(3):327-32.

83. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses*. 2010 Sep;54(5):e344-51.
84. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol*. 1998 Dec;43(12):999-1007.
85. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001 Dec;18(4):163-70.
86. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001 Mar;80(3):903-8.
87. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008 3(12):1909-24.
88. Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani CE. Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium. *PLoS One*. 2016 11(5):e0155427.
89. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006 Aug;51(8):672-80.
90. Zago CE, Silva S, Sanita PV, Barbugli PA, Dias CM, Lordello VB, et al. Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*. 2015 10(4):e0123206.
91. de Vasconcelos LC, Sampaio FC, Albuquerque Ade J, Vasconcelos LC. Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. *Braz Dent J*. 2014 25(4):277-81.
92. da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*. 2011 Nov;54(6):e712-7.
93. Hotta J. Viabilidade do uso de dispositivo acrílico intra-oral reembasado por material resiliente temporário modificado por antimicrobianos: estudo preliminar em ratos. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 2013.

94. Sakima VT. Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por curcumina nanoparticulada em modelo murino de candidose oral. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP; 2017.
95. Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y, 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. 2012 Apr;78(7):2190-9.
96. Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. Aust Dent J. 1997 Oct;42(5):343-6.
97. Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008 Oct;23(5):419-24.
98. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. J Appl Oral Sci. 2008 Mar-Apr;16(2):86-94.
99. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 Mar;16(2):e139-43.
100. McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 1999 Jun;14(3):183-9.
101. Shannon DC, Johnson G, Rosen FS, Austen KF. Cellular reactivity to *Candida albicans* antigen. N Engl J Med. 1966 Sep 29;275(13):690-3.
102. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005 Apr;10(Suppl 1):E27-39.
103. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. J Oral Rehabil. 2002 Nov;29(11):1115-9.

104. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):377-83.
105. Sanita PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jun;111(6):726-33.
106. Silva MM, Mima EG, Colombo AL, Sanita PV, Jorge JH, Massucato EM, et al. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Oct;114(4):469-79.
107. Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008 Dec;25(4):222-8.
108. Burns DR, Kazanoglu A, Moon PC, Gunsolley JC. Dimensional stability of acrylic resin materials after microwave sterilization. *Int J Prosthodont*. 1990 Sep-Oct;3(5):489-93.
109. Vasconcelos LR, Consani RL, Mesquita MF, Sinhoreti MA. Effect of chemical and microwave disinfection on the surface microhardness of acrylic resin denture teeth. *J Prosthodont*. 2013 Jun;22(4):298-303.
110. Muscat Y, Farrugia C, Camilleri L, Arias-Moliz MT, Valdramidis V, Camilleri J. Investigation of Acrylic Resin Disinfection Using Chemicals and Ultrasound. *J Prosthodont*. 2016 May 31.
111. Orsi IA, Junior AG, Villabona CA, Fernandes FH, Ito IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerised acrylic resin. *Gerodontology*. 2011 Dec;28(4):253-7.
112. Chassot AL, Poisl MI, Samuel SM. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz Dent J*. 2006 17(2):117-21.
113. Ekren O, Ozkomur A. Influence of ozone and paracetic acid disinfection on adhesion of resilient liners to acrylic resin. *J Adv Prosthodont*. 2016 Aug;8(4):290-5.

114. Vergani CE, Ribeiro DG, Dovigo LN, Sanita PV, Pavarina AC. Microwave assisted disinfection method in Dentistry. In: Chandra U, editor. Microwave heating. Rijeka: InTechOpen; 2011. p. 63-88.
115. Ribeiro DG, Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Flexural strength and hardness of reline and denture base acrylic resins after different exposure times of microwave disinfection. Quintessence Int. 2008 Nov;39(10):833-40.
116. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, de Oliveira JA, Vergani CE, Machado AL. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. J Prosthodont. 2009 Oct;18(7):611-7.
117. Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE, Souza JF, Jorge JH. Changes in roughness of denture base and reline materials by chemical disinfection or microwave irradiation: surface roughness of denture base and reline materials. J Appl Oral Sci. 2011 Oct;19(5):521-8.
118. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. J Oral Rehabil. 2008 Nov;35(11):836-46.
119. Basso MF, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Ribeiro RC. Influence of microwave disinfection on the dimensional stability of denture reline polymers. J Prosthodont. 2010 Jul;19(5):364-8.
120. Rennie JS, Hutcheon AW, MacFarlane TW, MacDonald DG. The role of iron deficiency in experimentally-induced oral candidosis in the rat. J Med Microbiol. 1983 Aug;16(3):363-9.
121. Conti HR, Huppler AR, Whibley N, Gaffen SL. Animal models for candidiasis. Curr Protoc Immunol. 2014 Apr 2;105:19 6 1-7.
122. MacCallum DM, Odds FC. Safety aspects of working with *Candida albicans*-infected mice. Med Mycol. 2004 Aug;42(4):305-9.
123. Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, et al. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Aug;47(8):2619-23.
124. Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. Virulence. 2013 Jul 01;4(5):391-9.

125. Van Wyk CW, Basson NJ, Gibson BM. Evaluation of inbred germ-free Fischer 344 albino rats as an experimental model for oral candidiasis. *Lab Anim*. 1989 23:248-55.
126. Philipsen HP, Cleaton-Jones P, Fisker AV. Correlative light microscopic and scanning electron microscopic study of completely and incompletely orthokeratinized rat oral epithelium. *Scand J Dent Res*. 1982 Aug;90(4):255-62.
127. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):398-429.
128. Conti HR, Huppler AR, Whibley N, Gaffen SL. Animal models for candidiasis. *Curr Protoc Immunol*. 2015 Apr 02;105:19 6 1-7.
129. Bailey PJ. Sponge implants as models. *Meth Immunol*. 1988 162:327-34.
130. Russell C, Jones JH. Effects of oral inoculation of *Candida albicans* in tetracycline-treated rats. *J Med Microbiol*. 1973 Aug;6(3):275-9.
131. Fabio CA, Yolanda MG, Carmen GM, Francisco C, Antonio Julián B, Leonor PL, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. *J Oral Pathol Med*. 2016 45(8):627-33.
132. Totti MA, dos Santos EB, de Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AO. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. *Braz Oral Res*. 2004 Jul-Sep;18(3):202-7.
133. Nunez MJ, Novio S, Suarez JA, Balboa J, Freire-Garabal M. Effects of psychological stress and fluoxetine on development of oral candidiasis in rats. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Apr;17(4):668-73.
134. Winner HI. The transition from commensalism to parasitism. *Br J Dermatol*. 1969 81:Suppl 1:62+.
135. Mayeux P, Dupepe L, Dunn K, Balsamo J, Domer J. Massive fungal contamination in animal care facilities traced to bedding supply. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Jun;61(6):2297-301.
136. Jones JH, Russell C, Young C, Owen D. Tetracycline and the colonization and infection of the mouths of germ-free and conventionalized rats with *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 1976 Sep;2(3):247-53.
137. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010 Jul;1(2):87-93.

138. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J*. 2008 Mar;22(3):659-61.
139. Turner PV, Vaughn E, Sunohara-Neilson J, Ovari J, Leri F. Oral gavage in rats: animal welfare evaluation. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012 Jan;51(1):25-30.
140. Abdelhalim MAK, Moussa S. The biochemical changes in rats' blood serum levels exposed to different gamma radiation doses. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2013 7:785-92.
141. Locke SJ, Brauer M. The response of the rat liver in situ to bromobenzene--in vivo proton magnetic resonance imaging and ³¹P magnetic resonance spectroscopy studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991 Sep 15;110(3):416-28.
142. Ramaiah SK, Bucci TJ, Warbritton A, Soni MG, Mehendale HM. Temporal changes in tissue repair permit survival of diet-restricted rats from an acute lethal dose of thioacetamide. *Toxicol Sci*. 1998 Oct;45(2):233-41.
143. Muggaberg J, Brockman RP. Effect of adrenergic drugs on glucose and plasma glucagon and insulin responses to xylazine in sheep. *Res Vet Sci*. 1982 Jul;33(1):118-20.
144. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011 Sep;50(5):600-13.
145. Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, Wolf V, Trujillo A, Duke MS, et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Apr 1;260(1):65-9.
146. Craig MA, Elliott JF. Mice Fed Radiolabeled Protein by Gavage Show Sporadic Passage of Large Quantities of Intact Material Into the Blood, an Artifact not Associated With Voluntary Feeding. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 1999 Sep;38(5):18-23.

**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)**



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

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2016.

Atenciosamente,

**Profa. Dra. Dionizia Xavier Scamparini
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

ANEXO C - 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°;
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 D - 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 E - Protocolo de coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) – 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 destilada.....	4 trocas
Digerir com diástase (saliva).....	5 min
Lavar em água corrente	
Ácido periódico.....	15 min
Lavar bem em água corrente	
Água destilada.....	2 trocas
Reativo de Schiff.....	5-10 min
Lavar bem em água corrente	
Água destilada.....	2 trocas
Contra-corar com Hematoxilina de Mayer.....	2 min
Lavar em água corrente	
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	