



**UNESP - Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



*Paula Tolpato Sanitá*

*"Estomatite protética em pacientes com diabetes mellitus:  
prevalência de Candida spp. e eficiência dos tratamentos  
com nistatina e desinfecção de próteses por micro-ondas"*

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da  
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, para obtenção de título de Doutor em  
Reabilitação Oral.**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani**

**ARARAQUARA**

**2011**

*Paula Volpato Sanitá*

*Estomatite protética em pacientes com diabetes mellitus:  
prevalência de Candida spp. e eficiência dos tratamentos  
com nistatina e desinfecção de próteses por micro-ondas*

**COMISSÃO JULGADORA**

Tese para obtenção do grau de Doutor

**Presidente e Orientador:** Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

**2º Examinador:** Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

**3º Examinador:** Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

**4º Examinador:** Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos

**5º Examinador:** Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 26 de Maio de 2011.

# *Dados Curriculares*

*Paula Volpato Sanitá*

<b>NASCIMENTO</b>	08/06/1982 - São José do Rio Preto, São Paulo
<b>FILIAÇÃO</b>	Paulo Roberto Fochi Sanitá Rosângela Volpato
<b>2001 a 2004</b>	Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2002 a 2004</b>	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Oclusão e Dores Orofaciais do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2005 a 2007</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2005 a 2006</b>	Estágio docência na Disciplina de Oclusão e Dores Orofaciais do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2005 a 2011</b>	Estágio docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2007 a 2011</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

*“Faça da sua sabedoria  
seu maior escudo para ser forte...  
Não desanime nunca...  
Muitos dias serão flores... Outros não...  
Aí é que você deve ser forte  
e saber vencer na vida,  
sempre feliz e alegre.”*

Ida Catarina Volpato

# *Dedicatória*

Aos meus amados pais *Paulo e Rosângela...*

Papai e Mamãe... não há, nem nunca haverá, palavras para descrever o tamanho amor que sinto por vocês, dentro de meu coração! Desde sempre, observei-os dando-me exemplos de vida, família, amor, caráter, profissionalismo, princípios, união, respeito, fé e perseverança. Vocês são a base do meu ser... E a razão da minha existência. Se, hoje, estou aqui, conquistando mais essa etapa de minha vida profissional, muito devo a vocês dois, que confiaram em mim, me apoiaram incondicionalmente e estiveram ao meu lado, em todos os momentos!

*“Tu eras também uma pequena folha que tremia no meu peito.  
O vento da vida pôs-te ali.  
A princípio não te vi: não soube que ias comigo,  
até que as tuas raízes atravessaram o meu peito,  
se uniram aos fios do meu sangue,  
falaram pela minha boca, floresceram comigo.”*

Pablo Neruda

## *Dedicatória especial*

Ao meu marido, amigo, companheiro e eterno namorado *Marcos...*

Meu amor... você deve estar, hoje, orgulhoso de mim, por essa grande conquista! Quero que saiba, no entanto, que sua companhia, paciência, força, ajuda em muitos momentos e seu amor foram imprescindíveis para que eu conseguisse seguir em frente nesta longa jornada! E conquistá-la!

Crescemos e amadurecemos um com o outro! Há tantos anos juntos, quantos momentos inesquecíveis, vitórias e conquistas! E essa vitória também é sua!

Obrigada por viver comigo e por todo o amor que dedica a mim...

*“Quando encontrar alguém e esse alguém fizer seu coração  
parar de funcionar  
por alguns segundos, preste atenção:  
pode ser a pessoa mais importante da sua vida.  
Se os olhares se cruzarem e, neste momento,  
houver o mesmo brilho intenso entre eles, fique alerta:  
pode ser a pessoa que você está esperando desde o dia em que nasceu.  
Se o toque dos lábios for intenso, se o beijo for apaixonante, e os  
olhos se encherem d’água neste momento, perceba:  
existe algo mágico entre vocês.  
Se o primeiro e o último pensamento do seu dia for essa pessoa, se a  
vantade de ficar juntos chegar a apertar o coração, agradeça:  
Deus te mandou um presente: o Amor.”*

Carlos Drummond de Andrade

# *Agradecimentos*

Ao meu querido orientador *Prof. Dr. Carlos Vergani...*

Obrigada pela oportunidade e confiança! Até este momento de vitória, foram 6 anos de ótima convivência! Aprendi muito com sua orientação, sugestões e críticas! Superamos momentos difíceis, de muito trabalho, e colhemos juntos todos os prósperos frutos de nosso suor! Somos uma dupla muito dinâmica de trabalho! E dois geminianos, com muitas outras coisas em comum! Obrigada por ser meu amigo! E por estar presente, sempre que possível! Aprendi com você a sonhar sempre alto e a alcançar esses sonhos. Tenho muito orgulho de ser sua orientada e de ter tido a honra de “absorver” um pouco de seu imenso conhecimento e competência!

*“Hoje é um bom dia para começar novos desafios.  
Onde você quer chegar? Dr. alto... sonhe alto... queira o melhor do melhor...  
pensando assim, trazemos pra nós aquilo que desejamos...  
Se pensarmos pequeno, coisas pequenas teremos...  
Já, se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente,  
lutarmos pelo melhor,  
o melhor vai se instalar em nossa vida.  
‘Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura’.”*

Carlos Drummond de Andrade

À *Sunice, Ana Lucia e Ana Cláudia...*

Queridas professoras e amigas da Disciplina de Prótese Parcial Removível, obrigada pelo apoio, ensinamentos, ótima convivência e companhia. Cada uma, com seu jeito próprio, me acolheu e me ajudou, sempre que precisei, ao longo desses anos!

À professora e amiga *Karin Neppelenbroek*, pela ajuda no início da elaboração deste projeto de pesquisa e pelos conselhos dados durante nossa convivência na Pós-Graduação.

À minha querida “amiga-mãe” *Malu*, por me adotar, acolher, cuidar de mim em Araraquara, sempre, e por ser tão carinhosa comigo!

## *Agradecimentos*

Aos “*Best friends forever*”: **Mari, Dani, Livia e Ewerton**. Como descrever aqui, neste papel, todos os momentos que dividimos e compartilhamos juntos? Como explicar que nos entendemos por olhares? Que sentimos as mesmas coisas? Como explicar o nascimento e o batismo de PaMaDaLiEw? Nossa amizade não tem explicação! Só nós sabemos e entendemos! Obrigada por existirem! Obrigada por terem me acolhido! Obrigada por fazerem parte de minha vida!

Às minhas amigas de graduação *Naná e Ana Luisa*, que sempre compartilharam comigo as dificuldades da pós-graduação e cujas amizades permanecem e permanecerão tão vivas, mesmo apesar do tempo e da distância!

À minha querida “miga” *Livia*... minha amiga para todas as horas e viagens, confidente, presente, vizinha... Obrigada por estar ao meu lado e compartilhar todos os momentos, alegres ou tristes, fáceis ou difíceis, sempre disposta a me ajudar.

*“Abençoadas os que possuem amigos, os que os têm sem pedir.  
Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!  
Benditos os que sofrem por amigos, os que falam com o alhar.  
Porque amigo não se cala, não questiona, nem se rende.  
Amigo a gente entende!  
Benditos os que guardam amigos, os que entregam o ombro pra chorar.  
Porque amigo sofre e chora. Amigo não tem hora pra consolar!  
Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade  
ou te apontam a realidade.  
Porque amigo é a direção. Amigo é a base quando falta o chão!  
Benditos sejam todos os amigos de raízes, verdadeiros.  
Porque amigos são herdeiros da real sagacidade.  
Ter amigos é a melhor cumplicidade!  
Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho.  
Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!”*

Machado de Assis



# *Agradecimentos*

Aos meus **amigos e companheiros** da turma de Doutorado, *Alejandro, Isabella, Juliê, Laiza, Luciano, Livia, Luís Eduardo e Pierre*, por todos esses anos de convívio!

A todos os meus **amigos** de Pós-Graduação, em especial à *Amandinha, Ana Paula, Camilinha, Cadu, Carol, Cristiane, Delise, Eduardo, Fernanda, Juliana, Karen, Marianinha e Paty*, pelo companheirismo, ajuda e apoio em todos os momentos importantes.

Às bolsistas de Apoio Técnico **Sônia, Tati** e, especialmente, **Stela**, por terem sido essenciais com seu auxílio e ajuda, prontamente prestados durante a execução de todos os longos experimentos deste trabalho.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,  
mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis  
e pessoas incomparáveis.”*

Fernando Pessoa

Aos **Professores** do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral e do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta Faculdade, pela orientação, dedicação e ensinamentos, essenciais para minha formação profissional.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**, pela disponibilidade e orientações na elaboração do projeto de pesquisa; à **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pelas orientações, auxílio na triagem dos pacientes e análise das fotos clínicas; e ao **Dr. Reginaldo Rigoto Giovani**, médico endocrinologista, pelo auxílio na abordagem e avaliação dos pacientes diabéticos incluídos neste estudo.

*“Escrever é fácil.  
Você começa com uma letra maiúscula e termina com um ponto final.  
No meio você coloca idéias.”*

Pablo Neruda

## *Agradecimentos*

Aos **Funcionários** do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta Faculdade, em especial à *Miriam, Martinha e Sílvia*, pelo convívio agradável e disposição em sempre me ajudar.

Aos **Professores Membros da Banca Examinadora**, por terem aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Silvio Govone** - Professor assistente doutor da UNESP de Rio Claro e ao **Olympio Teixeira Neto**, por realizarem a extensa análise estatística deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pela bolsa de estudos e pelos auxílios à pesquisa concedidos para o desenvolvimento deste estudo.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP** e ao **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**, diretor desta Instituição.

A todos os **pacientes** que participaram deste estudo.

A **todos** que, embora não tenham sido citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo.  
Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."*

Chico Xavier

## *Agradecimentos especiais*

Ao meu *Papi Paulo*... Seus abraços fortes me deram embasamento, segurança e força, por toda minha vida. Sua presença e carinho paternos, constantes, fazem de você o melhor pai que eu desejaria ter. Obrigada por estar, sempre, na retaguarda, olhando por mim... Você é demais!

À minha *Mama Rô*... Sua força de vontade de viver, fé e perseverança fazem com que eu tenha muito orgulho de ser sua filha! Seus ensinamentos profissionais me guiam de forma segura para exercer meus dons de cirurgiã-dentista. Que exemplo de mãe e mulher! Quero ser igual a você quando eu crescer!

Aos meus amados irmãos, *Rafael e Sara, Pedro e Clarissa*... Obrigada por torcerem por mim e acreditarem na minha capacidade! Obrigada por fazerem parte da minha vida e por todas as lembranças que guardo em meu coração. Vocês são os laços mais fortes que possuo e desejo tê-los sempre presentes!

Aos meus amados Avós, *Santo e Onofra*... Obrigada por serem o exemplo de vida que guia nossa família em sua trajetória! Obrigada por tudo que me proporcionam! Obrigada por seu amor! Vocês são indescritivelmente especiais.

À toda minha *Família*... Meus amados tios, tias e primos 'Volpatos' e minhas amadas tias 'Sanitás', que me incentivaram sempre, torceram por mim e por estarem incondicionalmente presentes em minha vida!

Ao meu amor *Marquinhos*... Você esteve sempre ao meu lado! Confiou em minhas decisões e me apoiou em todos os momentos! Você foi essencial para que eu seguisse em frente: deu-me forças sempre que precisei de estímulos e me acolheu nos momentos de desânimo e cansaço! Obrigada por tudo!

*“Basta-me um pequeno gesto, feita de longe e de leve,  
para que venhas comigo e eu para sempre te leve...”*

Cecília Meireles

A *Deus...*

Pelo presente da vida,  
... por ser luz em meu caminho,  
... pela força e auxílio nos momentos difíceis,  
... e por estar presente, em cada momento de minha vida!  
Obrigada Senhor, por estar sempre ao meu lado e  
me conceder a beleza de cada novo dia!

*“Deus é puríssima essência.  
Para os que têm fé Nele, Deus simplesmente é.”*

Mahatma Gandhi

*“Renova-te.  
Renasce em ti mesmo.  
Multiplica os teus olhos, para verem mais.  
Multiplica-se os teus braços para semeares tudo.  
Destrói os olhos que tiverem visto.  
Cria outros, para as visões novas.  
Destrói os braços que tiverem semeado,  
Para se esquecerem de colher.  
Sê sempre o mesmo.  
Sempre outro. Mas sempre alto.  
Sempre longe.  
E dentro de tudo.”*

Cecília Meireles

# *Sumário*

Resumo.....	14
Abstract.....	18
1 Introdução.....	21
2 Proposição.....	28
3 Capítulos	
3.1 Capítulo 1.....	31
3.2 Capítulo 2.....	52
4 Discussão.....	81
5 Conclusão.....	93
6 Referências.....	95
7 Apêndice.....	107
8 Anexo.....	136



SANITÁ PV. Estomatite protética em pacientes com diabetes mellitus: prevalência de *Candida* spp. e eficiência dos tratamentos com nistatina e desinfecção de próteses por micro-ondas [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## *Resumo*

Este estudo in vivo teve como objetivos avaliar: 1. a prevalência das diferentes espécies de *Candida* em pacientes diabéticos portadores de estomatite protética e compará-la àquela de pacientes não diabéticos com/sem estomatite protética; 2. a eficiência de dois tratamentos para estomatite protética em pacientes diabéticos: terapia antifúngica com nistatina e desinfecção de próteses totais por micro-ondas. Para isso, 210 pacientes usuários de prótese totais foram selecionados e distribuídos em três grupos de estudo. O grupo controle - GC foi formado por 90 pacientes não diabéticos e com mucosa oral saudável; os grupos experimentais foram formados por portadores de estomatite protética, sendo 80 pacientes não diabéticos - EPND e 40 diabéticos do tipo 2 controlados - EPD. Uma avaliação intra-oral dos pacientes dos grupos experimentais foi realizada e a aparência clínica da mucosa inflamada foi classificada de acordo com os critérios de Newton em graus I, II ou III. Coletas microbiológicas das próteses totais foram realizadas com swab estéril e plaqueadas em meio CHROMagar *Candida*. Em seguida, os procedimentos de identificação foram realizados: análise de microcultivo, teste de triagem fenotípica em caldo hipertônico e testes bioquímicos (ID-32C). Os resultados obtidos foram analisados por Intervalo de Confiança de Bonferroni e testes Exato de Fisher e Qui Quadrado ( $\alpha=0,05$ ). Os 40 pacientes diabéticos foram, então, submetidos ao tratamento da estomatite protética. Para isso, foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos (n=20): grupo NIS – tratamento com antifúngico tópico nistatina (suspensão oral - 100.000UI/mL), 4 vezes ao dia, por 14 dias; grupo MIC – tratamento por meio da irradiação das totais por micro-ondas (650W / 3 minutos), 3 vezes por semana,



## Resumo

por 14 dias. Dois parâmetros foram utilizados para avaliar a efetividade dos tratamentos: microbiológico (coletas de material das próteses e das mucosas palatinas com swab estéril para quantificação de colônias viáveis – ufc/mL e identificação de *Candida* spp.) e clínico (tomadas fotográficas intra-orais das mucosas palatinas infectadas). Todos os pacientes foram submetidos a estes procedimentos previamente ao início dos tratamentos, ao seu final, e 30, 60 e 90 dias decorridos do seu início. Os valores de  $\log_{10}$ ufc/mL foram analisados estatisticamente por ANOVA subjacente a um modelo linear com efeitos aleatórios. A prevalência das espécies de *Candida* foi avaliada pelo teste Qui Quadrado. As avaliações qualitativas das fotografias intra-buciais e a análise da inflamação ao longo do tempo foram avaliadas, respectivamente, pelos testes Exato de Fisher e Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ). Os resultados observados demonstraram que a *C. albicans* foi a espécie predominante em todos os grupos de estudo ( $p<0,016$ ), seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata* ( $p>0,05$ ). Não foram verificadas diferenças significantes ( $p>0,05$ ) na prevalência de *Candida* spp. entre os grupos EPND e EPD. As prevalências de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram significativamente superiores ( $p<0,01$ ) nos grupos de pacientes com estomatite protética e a de *C. tropicalis* foi superior ( $p<0,05$ ) nos pacientes diagnosticados com infecção grau III de Newton. Com relação aos tratamentos instituídos nos pacientes diabéticos, ambos reduziram significativamente ( $p<0,001$ ) os valores de  $\log_{10}$ ufc/mL após 15 e 30 dias, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ) entre os grupos de estudo. Não foram verificadas diferenças significantes ( $p>0,05$ ) entre o número de pacientes curados e com recidivas, após a condução dos dois tratamentos. Com base nestes resultados, foi concluído que a prevalência de *Candida* spp. foi similar entre os pacientes diabéticos e não-diabéticos com estomatite protética. Apesar de a *C. albicans* ter sido a espécie mais frequentemente identificada em todos os pacientes avaliados, a prevalência de *C. tropicalis* foi superior nos pacientes com estomatite protética e naqueles com maior grau de inflamação, sugerindo que esta espécie pode estar envolvida com o início e a progressão da infecção. Além disso, a irradiação de próteses totais por micro-ondas pode ser utilizada com sucesso para

## *Resumo*

tratar e prevenir o aparecimento de estomatite protética em pacientes diabéticos, apresentando a mesma efetividade de um método clássico de tratamento com antifúngico tópico.

**Palavras-chave:** Estomatite sob prótese; *Candida*; Desinfecção; Micro-ondas; Prótese Total; Diabetes Mellitus



SANITÁ PV. Denture stomatitis in diabetic patients: *Candida* spp. prevalence and efficacy of treatments with nystatin and denture microwave disinfection [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## *Abstract*

The aim of this in vivo study was to evaluate: 1. the prevalence of *Candida* spp. in well-controlled type 2 diabetic patients and compare it to that found in non-diabetics with/without denture stomatitis; 2. the efficacy of two treatments of denture stomatitis in diabetic patients: topical nystatin and denture microwave disinfection. Two hundred and ten denture wearer patients were divided into three groups of study. The control group - CG was formed by 90 individuals without diabetes or denture stomatitis and the experimental groups were formed by patients with denture stomatitis, being 80 non-diabetics - DSND and 40 well-controlled type 2 diabetics - DSD. Mucosal characteristics of denture stomatitis patients were classified in types I, II, and III, according to Newton's criteria. Mycological samples were taken from the dentures and cultured in CHROMagar's plates. *Candida* spp. were identified by micro-cultivation, hypertonic Sabouraud broth, and bioMérieux ID32C assays. Results were analyzed by means of Bonferroni corrected confidence interval, Fisher's exact test, and Chi-square analysis of several proportions ( $\alpha=0.05$ ). The 40 diabetic patients were divided into two groups (n=20) and submitted to two treatments for denture stomatitis: NYS group – patients were treated with topical nystatin, 4 times a day, for 14 days; MW group – patients had their dentures microwaved (650W / 3 minutes), 3 times per week, for 14 days. Mycological samples were taken from the palates and the tissue surface of the dentures for quantification and identification of *Candida* spp. and standardized photographs of the palates were taken for the clinical analysis. Microbiological and clinical evaluations were repeated at baseline, the end of treatments (day-14), and follow up (day-30, day-60, day-90). Microbiological data were evaluated by ANOVA using a random

## *Abstract*

effects statistical model, Tukey's post hoc test, and Chi-square test, while clinical results were analyzed by Mann-Whitney and Fisher's exact tests ( $\alpha=0.05$ ). According to the results, *C. albicans* was the most predominant species isolated in CG, DSND, and DSD groups ( $p<0.016$ ), followed by *C. tropicalis* and *C. glabrata* ( $p>0.05$ ). No significant differences were found in *Candida* spp. prevalence between DSND and DSD ( $p>0.05$ ). The percentage frequencies of *C. albicans* and *C. tropicalis* in denture stomatitis groups (DSND and DSD) were significantly higher ( $p<0.01$ ) than those in CG and the prevalence of *C. tropicalis* was significantly higher ( $p<0.05$ ) in Newton's type III patients. Both NYS and MW treatments were considered successful in reducing the clinical signs of denture stomatitis and significantly reduced the values of cfu/mL from the palates and dentures at day-14 and day-30. Forty percent of patients had no signs of denture stomatitis at the end of both treatments. No significant differences ( $p>0.05$ ) in the microbiological and clinical outcomes were revealed between the two treatments. It was concluded that the prevalence of *Candida* spp. was similar between diabetic and non-diabetic patients with denture stomatitis. Despite *C. albicans* was the most commonly isolated organism, the prevalence of *C. tropicalis* increased in patients with denture stomatitis and in those with the highest degree of inflammation, suggesting that this species may play an important role in the progression of this infection. In addition, denture microwave disinfection was as effective as nystatin on the treatment of well-controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis.

**Keywords:** Stomatitis, Denture; *Candida*; Disinfection; Microwaves; Denture, Complete; Diabetes Mellitus



# 1 *Introdução*

# 1 Introdução

As espécies do gênero *Candida*, sobretudo a *C. albicans*, vivem como comensais em diversas regiões do organismo na maioria dos indivíduos saudáveis<sup>89</sup>. No entanto, sob determinadas condições ambientais, esses microorganismos se transformam em patógenos oportunistas, podendo colonizar mucosas, invadir tecidos e causar infecções<sup>17</sup>. A infecção da cavidade bucal associada à *Candida* spp., denominada candidose bucal, é considerada a infecção fúngica mais comum entre humanos, principalmente idosos e usuários de próteses totais<sup>2</sup>. A candidose bucal, quando associada à utilização de próteses removíveis, parciais ou totais, é denominada estomatite protética, lesão bucal mais comumente observada em usuários de próteses removíveis<sup>5,21</sup>. Clinicamente, a estomatite protética se caracteriza pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos na mucosa palatina, por áreas eritematosas generalizadas e por hiperplasia papilar no palato em casos mais avançados de inflamação<sup>70</sup>.

Existem vários fatores, sistêmicos e locais, que são considerados predisponentes ao aparecimento da estomatite protética<sup>5,6,10,13,16,26,27,30,31,38,44,49,50,54,60,66,67,77,87,92,97</sup>. Entre os fatores sistêmicos, destaca-se o diabetes mellitus, uma desordem metabólica que tem sido considerada uma das doenças crônicas mais relevantes em nível mundial<sup>48</sup>. Estima-se que o número de indivíduos com diabetes na população mundial irá superar 330 milhões no ano de 2025<sup>51</sup>. Devido às alterações na produção de insulina pelo pâncreas, que modifica o metabolismo de proteínas, lipídios, sais minerais e, principalmente, de glicose<sup>48</sup>, múltiplas comorbidades e maior risco de mortalidade têm sido relacionados aos pacientes portadores desta desordem metabólica crônica<sup>3</sup>. Além disso, as consequências desta doença se relacionam ao aparecimento de diversas alterações locais na mucosa oral, favorecendo o aparecimento de infecções bucais importantes<sup>54</sup>. A candidose bucal é uma das infecções oportunistas mais comumente diagnosticadas em indivíduos diabéticos<sup>94</sup> e sua relação com o diabetes tem sido extensivamente

## 1 Introdução

estudada na literatura<sup>10,13,26,30,31,38,40,41,44,45,49,50,56,59,67</sup>.

O mecanismo pelo qual o diabetes predispõe a colonização bucal por *Candida* ainda não foi totalmente estabelecido. No entanto, é reconhecido que os altos níveis de glicose na saliva dos pacientes diabéticos favorecem o crescimento das leveduras devido ao maior número de receptores disponíveis para as espécies de *Candida*<sup>13</sup>. A adesão dos micro-organismos à superfície das células epiteliais é reconhecida como pré-requisito para o processo de colonização e infecção por *Candida*<sup>27</sup> e as células bucais dos pacientes diabéticos apresentam maior aderência à *C. albicans* em comparação às células de pacientes não-diabéticos<sup>26,30</sup>. A degeneração micro-vascular nos capilares da lâmina própria da mucosa bucal<sup>38</sup> e a redução no processo de fagocitose dos neutrófilos<sup>97</sup>, observadas nos pacientes com diabetes, também favorecem a colonização por *Candida* spp., tornando-os mais susceptíveis às infecções<sup>38,97</sup>. Tem sido demonstrado, ainda, que a hipossalivação é frequentemente observada nestes pacientes<sup>49,77</sup> e a saliva apresenta capacidade de inibir a adesão de células de *Candida* às células do epitélio bucal<sup>14,87</sup>. Assim, é provável que a redução do fluxo salivar, associada ao diabetes, também seja um fator relacionado ao aumento da colonização por *Candida* spp.<sup>49,92</sup>. Considerando esses aspectos, vários estudos demonstraram que os pacientes diabéticos, além de serem mais susceptíveis à candidose oral<sup>10</sup>, apresentam uma maior colonização de *Candida* na cavidade bucal quando comparados aos indivíduos saudáveis<sup>10,31,49,50,67</sup>.

Considerando os fatores de risco locais, a maioria das infecções fúngicas bucais acomete pacientes usuários de próteses totais<sup>27,66</sup>. Diversos estudos verificaram uma maior incidência de infecções por *Candida* e elevados níveis de *Candida* spp. em diabéticos usuários de próteses totais<sup>44,50,60</sup>. Como as espécies de *Candida* são capazes de aderir à resina acrílica<sup>14</sup>, a superfície interna das próteses acaba se tornando um reservatório de micro-organismos<sup>5,8,14,16,27</sup> e passa a ser colonizada por um biofilme complexo e consistente<sup>66</sup>, favorecendo sua proliferação e disseminação<sup>8,16,27,69</sup>. Ainda, o contato deste biofilme com a mucosa de suporte promove trauma aos tecidos<sup>39,55</sup>, tornando-os menos resistentes às infecções, pois aumenta sua permeabilidade às toxinas infecciosas dos micro-



## 1 Introdução

organismos<sup>55</sup>. A presença de uma prótese na cavidade oral acarreta, ainda, na diminuição do fluxo<sup>87</sup> e pH<sup>16,55</sup> salivares e impede a limpeza das superfícies teciduais pela ação mecânica da língua<sup>14</sup>. Todos esses fatores, associados às alterações locais e sistêmicas relacionadas ao diabetes, fazem com que o paciente diabético portador de próteses removíveis se torne ainda mais susceptível às infecções por *Candida*<sup>30,40,44,50,60</sup>.

Diferentes espécies de *Candida* têm sido frequentemente isoladas da cavidade oral dos pacientes com diabetes. À semelhança do que ocorre em indivíduos saudáveis, a *C. albicans* é a espécie mais comumente isolada da cavidade bucal de diabéticos, podendo ser encontrada em mais de 80% dos pacientes<sup>10,26,40,60</sup>. No entanto, a epidemiologia das infecções por *Candida* tem sido alterada. Diversos estudos demonstraram a emergência de espécies não-*albicans*, que têm sido isoladas da cavidade oral de pacientes diabéticos<sup>10,26,30,31,40,41,44,50,56,60,67</sup> e portadores de estomatite protética<sup>22,61,80,93,96</sup>. Além disso, espécies não-*albicans* têm sido isoladas com maior frequência de pacientes diabéticos portadores de próteses totais em comparação àqueles com dentes naturais<sup>41,49,50,56,60</sup>. Estudos relataram que, dentre as espécies não-*albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. colliculosa*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* e *C. dubliniensis* foram isoladas tanto de pacientes diabéticos<sup>10,30,31,40,41,44,56,60,67</sup> quanto de não-diabéticos<sup>22,61,80,93,96</sup>.

Uma variedade de fatores relacionados às cepas das diferentes espécies de *Candida*, como capacidade de adesão às células epiteliais e superfícies acrílicas<sup>17,57-59,85</sup>, hidrofobicidade da superfície celular<sup>52,57,65,85</sup>, produção de enzimas degradativas específicas<sup>17,58,67,76</sup> e capacidade de desenvolver biofilme<sup>21,68,73,78,79</sup>, é reconhecida por promover a virulência destes micro-organismos e pode ser responsável pela alteração epidemiológica verificada nas infecções por *Candida*. Outro fator relevante relacionado às diferentes espécies de *Candida* e que pode interferir na epidemiologia das infecções é o desenvolvimento de resistência antimicrobiana<sup>7,43,47,62</sup>. Estudos têm demonstrado que o uso descontrolado de medicações, especialmente os “azóis”, resultaram no aparecimento de micro-organismos resistentes<sup>7,43,47,62</sup>. De acordo com Goldman et

## 1 Introdução

al.<sup>43</sup>, o aparecimento de cepas resistentes ocorre por meio de mutações genéticas. Além disso, autores<sup>7,47,62</sup> sugerem que outro mecanismo de resistência seria a substituição de cepas mais sensíveis por outras intrinsicamente resistentes aos medicamentos, como *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Chandra et al.<sup>21</sup> também verificaram que cepas de *C. albicans* associadas a biofilme apresentaram resistência a antifúngicos tópicos e sistêmicos. O aparecimento de resistência entre as espécies de *Candida*, associado aos diversos fatores de virulência presentes nestes micro-organismos, tem implicações importante nas taxas de mortalidade dos pacientes infectados<sup>1,23,25,28,42,63,98</sup>. Tem sido demonstrado que mais de 90% dos casos de fungemia são atribuídos às *Candida* spp.<sup>1,25</sup> e que o número de mortes como resultado desta infecção sistêmica pode variar entre 40% a 80% entre os indivíduos imunocomprometidos<sup>1,23,25,28,42,63</sup>. Além disso, uma elevada taxa de mortalidade tem sido verificada entre os pacientes diabéticos com fungemia (67%)<sup>23</sup>. Dentre as espécies de *Candida*, a *C. tropicalis* tem se destacado como um dos principais agentes etiológicos da fungemia<sup>23,25,42,63,98</sup>, resultando em taxas de mortalidade superiores às da *C. albicans* e *C. glabrata*<sup>25,42,63</sup>. Assim, uma identificação precisa e uma avaliação da prevalência clínica de *Candida* spp. em grupos específicos de pacientes são essenciais para se determinar estratégias de prevenção, controle e tratamento da candidose oral, prevenindo o desenvolvimento de fungemia e, conseqüentemente, melhorando as taxas de mortalidade e morbidade associadas a esta infecção oportunista.

Atualmente, o tratamento da candidose oral inclui a utilização de terapia antifúngica tópica e medicação antifúngica sistêmica. Nos casos em que a terapia tópica for instituída, agentes como nistatina, clorexidina e miconazol podem ser utilizados<sup>8,11,12,53,69</sup>. Entretanto, apesar desses medicamentos serem eficazes para aliviar os sinais e sintomas clínicos da estomatite associada à *Candida* spp., muitas vezes não eliminam completamente os micro-organismos<sup>8,11,12,53,69</sup>, levando ao insucesso do tratamento. Outro fator responsável pela ocorrência de insucesso do tratamento tópico é a redução do poder de ação do antifúngico devido aos efeitos diluentes da saliva e movimentos da língua, o que mantém a medicação em uma concentração sub-terapêutica<sup>8</sup>, podendo levar a re-

## 1 Introdução

colonização do micro-organismo e infecção recorrente. Além disso, os antifúngicos tópicos geralmente apresentam posologia de doses múltiplas e seu sabor desagradável pode causar náusea, reduzindo a cooperação dos pacientes na sua utilização<sup>12</sup>. Nos casos em que a terapia antifúngica sistêmica for recomendada, medicações como itraconazol e fluconazol são frequentemente indicadas<sup>12,53</sup>. Entretanto, essas medicações devem ser prescritas com cautela, pois podem induzir efeitos colaterais hepatotóxicos e nefrotóxicos<sup>55</sup>. É importante também enfatizar que o aparecimento de resistência antimicrobiana, frequentemente relacionado ao uso descontrolado dessas medicações<sup>7,43,47,62</sup>, é considerado a principal causa das falhas na terapia com antifúngicos<sup>21</sup>.

Independentemente de sua eficácia, as medicações tópicas e sistêmicas apenas tratam a cavidade oral, não reduzindo a colonização das próteses dentárias pelos fungos<sup>8,69</sup>. Dessa forma, outro problema comumente observado e associado à terapia antifúngica é a recorrência da infecção logo após a suspensão do tratamento<sup>8,11,12,53,69</sup>. Considerando esses aspectos, e para superar as limitações e evitar os efeitos colaterais das medicações convencionais, cuidados de higienização e desinfecção das próteses totais dos pacientes têm sido recomendados para o tratamento da estomatite protética<sup>8,53,69,96</sup>. Nesse contexto, a irradiação das próteses totais por micro-ondas tem se destacado, por ser um método físico de desinfecção, seguro, simples e de custo reduzido, cuja efetividade tem sido demonstrada por estudos *in vitro*<sup>33,64,86,88</sup>. Próteses totais inoculadas com diferentes bactérias e *Candida* spp., incluindo as intrinsicamente resistentes *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*, foram esterilizadas pela irradiação por micro-ondas durante 3 minutos a 650W<sup>33,64,86</sup>. Um recente estudo *in vivo* também observou que este regime de irradiação inativou biofilme das próteses de 30 indivíduos sem estomatite protética<sup>82</sup>. Evidências de outros estudos clínicos demonstraram a efetividade da desinfecção das próteses totais por micro-ondas no tratamento da estomatite protética associada à *Candida* spp.<sup>8,69,96</sup> Banting, Hill<sup>8</sup> e Neppelenbroek et al.<sup>69</sup> demonstraram, ainda, que os pacientes que tiveram suas próteses irradiadas apresentaram redução significativa na recorrência desses micro-organismos sobre a superfície interna das próteses após a suspensão do

## 1 Introdução

tratamento, reduzindo, conseqüentemente, os riscos de re-infestação dos tecidos adjacentes. É importante enfatizar que este regime de desinfecção por micro-ondas (3 minutos a 650W) não causou efeitos deletérios sobre a resistência à flexão<sup>81</sup>, dureza<sup>18</sup>, porosidade superficial<sup>71</sup> e estabilidade dimensional<sup>9</sup> dos materiais utilizados para a confecção de próteses dentárias. Dessa maneira, com base nos resultados destes estudos, um protocolo efetivo, seguro e sem a utilização de medicações foi estabelecido, tanto para a prevenção quanto para o tratamento da estomatite protética.

Apesar da desinfecção de próteses por energia de micro-ondas contribuir significativamente para o tratamento da estomatite protética em indivíduos sem alterações sistêmicas<sup>8,69,96</sup>, sua efetividade não foi avaliada em diabéticos. Nestes pacientes, devido às complicações locais e sistêmicas desencadeadas pelo diabetes<sup>13,26,30,38,49,77,97</sup>, as infecções apresentam um curso mais complexo e a efetividade deste método de desinfecção pode ser imprevisível. Além disso, o conhecimento da prevalência das diversas espécies de *Candida* nos pacientes diabéticos é essencial para se determinar a etiologia da infecção, uma vez que as espécies apresentam diferentes graus de virulência e respondem de maneira variada frente às diversas terapias disponíveis<sup>89</sup>. Apesar de a prevalência de *Candida* spp. ter sido avaliada em diferentes grupos de pacientes<sup>10,22,26,27,40,41,44,49,50,56,60,61,76,93,96</sup>, poucos estudos<sup>30,67</sup> identificaram a microbiota oral de *Candida* spp. em pacientes diabéticos portadores de estomatite protética e compararam com aquela verificada em não-diabéticos com estomatite protética.



*2 Proposição*

## 2 *Proposição*

Com base nas informações obtidas da literatura, os objetivos desta investigação in vivo foram realizar:

1. Um estudo clínico epidemiológico transversal, para avaliar a prevalência das diferentes espécies de *Candida* em pacientes diabéticos do tipo 2 controlados, portadores de estomatite protética, e compará-la a de pacientes não diabéticos com/sem estomatite protética;

2. Um estudo clínico paralelo randomizado estratificado duplo-cego longitudinal, que testou a hipótese de que a desinfecção de próteses totais por energia de micro-ondas poderia ser igualmente efetiva à terapia antifúngica com nistatina para o tratamento de estomatite protética em pacientes diabéticos do tipo 2 controlados. Comparações foram feitas com relação à redução da colonização por *Candida* na mucosa palatina e superfície protética dos pacientes e à resolução dos sinais clínicos da infecção. A prevalência das espécies de *Candida* identificadas neste período de controle posterior foi também verificada.



*3 Capítulos*

## *3.1 Capítulo 1*

### ***Candida* spp. prevalence in well-controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis\***

Paula Volpato Sanitá DDS, MSc<sup>1</sup>

Ana Cláudia Pavarina DDS, MSc, PhD<sup>2</sup>

Eunice Teresinha Giampaolo DDS, MSc, PhD<sup>3</sup>

Mariana Montenegro Silva DDS, MSc, PhD<sup>4</sup>

Ewerton Garcia de Oliveira Mima DDS, MSc, PhD<sup>5</sup>

Daniela Garcia Ribeiro DDS, MSc, PhD<sup>6</sup>

Carlos Eduardo Vergani DDS, MSc, PhD<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PhD Student, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Associate Professor, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Professor, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Assistant Professor, School of Dentistry, Camilo Castelo Branco University, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>5</sup>Assistant Professor, School of Dentistry, São Francisco University, Bragança Paulista, SP, Brazil.

<sup>6</sup>Assistant Professor, Department of Dentistry, Ponta Grossa State University, Ponta Grossa, PR, Brazil.

**Corresponding author:** Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

**Address for correspondence:** R. Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil, CEP 14801903

Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP –

Univ Estadual Paulista

Business Phone 55 16 33016410; Home Phone 55 16 33245520; Fax 55 16 33016406;

E-mail vergani@foar.unesp.br

---

\*Artigo publicado no periódico **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. 2011; 111: 726-733. (Anexo 1)



### 3.1 *Capítulo 1*

#### **Abstract**

*Objectives:* this study compared the prevalence of *Candida* spp. in diabetics and non-diabetics, with/without denture stomatitis. *Study design:* mycological samples were taken from the dentures of 90 healthy subjects (CG), 80 denture stomatitis non-diabetics (DSND), and 40 denture stomatitis diabetics (DSD) for identification of *Candida* spp. Results were analyzed by Fisher's exact test, Bonferroni corrected confidence interval, and Chi-square test ( $\alpha=0.05$ ). *Results:* *C. albicans* was the predominant species isolated (81.9%;  $p<0.016$ ) and no significant differences ( $p>0.05$ ) were observed between *C. tropicalis* and *C. glabrata* prevalence's (15.71 and 15.24%, respectively). The prevalence of *C. albicans* and *C. tropicalis* in denture stomatitis groups were significantly higher ( $p<0.01$ ) than in CG. The prevalence of *C. tropicalis* significantly increased with the highest degree of inflammation ( $p<0.05$ ). *Conclusions:* the prevalence of *Candida* spp. was similar between diabetics and non-diabetics patients with denture stomatitis. *C. tropicalis* may play a role in the progression of denture stomatitis.

#### **Introduction**

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder that is becoming one of the most important chronic diseases worldwide. It has been estimated that the number of adults with diabetes in the world will rise to 300 million in the year 2025.<sup>1</sup> The relation between diabetes and oral candidiasis has been extensively studied in the literature,<sup>2-13</sup> particularly because diabetic patients are more susceptible to fungal infections than those without diabetes.<sup>2-4,10</sup> Yeast adhesion to epithelial cell surfaces is recognized as an essential first step in the process of candidal colonization and subsequent infection.<sup>14</sup> Salivary glucose levels in diabetic patients favors yeast growth due to increased number of available receptors for *Candida*.<sup>15</sup> Consequently, buccal cells from diabetic patients have shown an increased adherence of *C. albicans* compared to buccal cells from non-diabetics.<sup>3,4</sup> The micro-vascular degeneration found in histological examination of diabetic patients may also predispose to *Candida* colonization,<sup>16</sup>

### 3.1 *Capítulo 1*

making them more susceptible to infections. Another host factor that may promote the oral carriage of *Candida* in diabetics is the possible defects in candidacidal activity of neutrophils, particularly in the presence of glucose.<sup>17</sup> Reduced salivary flow, associated with diabetes, may also play a role in *Candida* colonization and, consequently, in the pathogenesis of oral candidiasis in these patients.<sup>8</sup>

The presence of a denture in the oral cavity, associated with the local alterations of the oral mucosa and the systemic complications, may render the denture wearer patient with diabetes even more prone to candidal infection.<sup>4,5,7,10,11</sup> A significantly higher incidence of *Candida* infection and increased levels of *Candida* spp. were found in diabetic patients wearing removable denture.<sup>7,10,11</sup> The presence of a removable denture may decrease the salivary pH and saliva flow rate, and impede the mechanical cleaning of the soft tissue surfaces by the tongue.<sup>18</sup> In addition, denture induced trauma may reduce tissue resistance against infection because of the increase in permeability of the epithelium to soluble candidal antigens and toxins.<sup>19</sup> Moreover, the tissue surface of the acrylic resin denture acts as a reservoir that harbors microorganisms, enhancing their infective potential and aggravating a previously existing condition.<sup>14,18</sup> For this reason, both systemic and local predisposing factors might promote an increase in the number of microorganisms and hence the risk of oral candidiasis in diabetics, especially in those patients wearing removable dentures.

Different *Candida* species have been frequently isolated from the oral cavities of patients with diabetes. *C. albicans* is the most commonly recovered species in diabetic patients, with a prevalence of up to approximately 80%.<sup>2,3,5,11</sup> This oral fungal pathogen is the most virulent of the *Candida* species<sup>20</sup> and is able to grow as biofilm, which consists of a complex community of cells embedded in a matrix of extracellular polysaccharide.<sup>21</sup> These cells exhibit distinctive phenotypic properties from planktonic cells and increased resistance to antimicrobial agents.<sup>21,22</sup> The epidemiology of *Candida* infections has changed with emergence of non-*albicans* species, which have been increasingly described both in compromised and noncompromised hosts.<sup>2-7,9-13,23-27</sup> Non-*albicans* species have been consistently observed in diabetics patients<sup>2-7,9-13</sup> and in those with

### 3.1 *Capítulo 1*

denture stomatitis.<sup>23-27</sup> Multiple isolations of *Candida* species, including *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. colliculosa*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, and *C. rugosa* were recorded in diabetic patients.<sup>2,4-7,9,11,12</sup> *C. dubliniensis* has also been isolated from the oral cavities of diabetic patients.<sup>11,13</sup> In addition, diabetic patients with dentures had more non-*albicans* *Candida* species isolated than dentate diabetic patients.<sup>6,9-11</sup> Similar findings have been observed in non-diabetic denture wearer patients with denture stomatitis, where *C. tropicalis* and *C. glabrata* were the non-*albicans* species most isolated.<sup>23,25,27</sup>

A number of yeast-related factors, such as adhesion to host cells and acrylic surfaces,<sup>20,28-31</sup> cell-surface hydrophobicity,<sup>28,31-33</sup> and secretion of several degradative enzymes<sup>12,20,29,34</sup> are recognized to promote the virulence of *Candida* spp. and may explain the changes in *Candida* infections epidemiology. Another important factor related to these different species of *Candida* is the development of drug resistance. Along with this species diversity and long-term administration of medications, strains with elevated virulence and acquired resistance against antifungal drugs might colonize the oral cavity.<sup>35,36</sup> Studies have demonstrated that the widespread use of medications, especially azoles, has promoted selection of resistant species by shifting colonization to more naturally resistant *Candida* species, such as *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, and *C. krusei*.<sup>35,36</sup> The emergence of resistance among *Candida* isolates to currently available antifungal drugs, associated to epidemiological changes in *Candida* flora, has important implications for mortality.<sup>37-44</sup> It has been demonstrated that more than 90% of the fungemia cases were attributable to *Candida* species<sup>37,38</sup> and the number of deaths as a result of fungemia has ranged from at least 40% to almost 80% in immunocompromised hosts.<sup>37-43</sup> In addition, a high crude mortality was also observed among non-immunocompromised patients (60%)<sup>40</sup> and those with diabetes (67%).<sup>39</sup> *C. tropicalis* has been reported to be one of the leading *Candida* species other than *C. albicans* to cause fungemia.<sup>38,39,41,43,44</sup> Therefore, an accurate identification and the evaluation of the clinical prevalence of *Candida* spp. in specific groups of patients are essential to determine strategies for control and

### 3.1 *Capítulo 1*

management of oral candidal infection and, hence, improve the mortality rate associated with this infection. Although there have been numerous studies evaluating the prevalence of *Candida* spp. in different groups of patients,<sup>2,3,5-11,13,14,23-27</sup> there have been only a few studies<sup>4,12</sup> that compared the prevalence in denture wearers meeting specific criteria for type 2 diabetes and denture stomatitis with that in non-diabetic denture wearers with denture stomatitis. Thus, the aim of this cross-sectional study was to compare the prevalence of *Candida* spp. in well-controlled type 2 diabetic and non-diabetic denture wearer patients, with and without denture stomatitis.

#### **Subjects and Methods**

##### *Subjects*

In the present study, subjects were selected either from staff and patients of the UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, or recruited from the general population of the Araraquara metropolitan area. Individuals who had received or were currently receiving treatment with antibiotics, antifungals or steroids in the past 3 months; patients with anaemia, immunosuppression or cancer therapy (radio- or chemotherapy); and those wearing the same denture for more than 30 years were excluded. A total of 210 voluntary patients were selected to participate in the present study. The protocol of the project was approved by the Ethics Committee of the Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista (06/2006 - 0004.0.199.174-06 SISNEP), and each subject signed an informed consent form. Personal, medical, and dental histories of the patients (age and gender of the patients, medication use, smoking habit, and denture age) were recorded. Two risk factors for denture stomatitis were considered in this study: the age of the dentures<sup>45</sup> and smoking habit.<sup>6,46</sup>

A comprehensive oral examination of the 210 patients was performed by the same investigator, who was blinded to all clinical information and the diabetic state of the subjects, and their mucosal characteristics were classified according to the criteria proposed by Newton<sup>47</sup>: 0, absence of palatal

### 3.1 *Capítulo 1*

inflammation; 1 (Type I), petechiae dispersed throughout all or any part of palatal mucosa in contact with the denture (localized simple inflammation); 2 (Type II), macular erythema without hyperplasia (generalized simple inflammation); and 3 (Type III), diffuse or generalized erythema with papillary hyperplasia (inflammatory papillary hyperplasia).

According to the systemic condition of the patients and the characteristics of their palatal mucosa, the 210 volunteers were divided into three groups of study: control group (CG) was formed by 90 individuals without diabetes and with healthy palatal mucosa; experimental groups were formed by 80 non-diabetic patients diagnosed with denture stomatitis according to Newton's criteria<sup>47</sup> (DSND) and by 40 diabetic patients also with denture stomatitis according to Newton's criteria<sup>47</sup> (DSD).

Diabetic patients were evaluated in relation to their medical care of diabetes and only those with well-controlled type 2 diabetes were selected. Based on the recommendations of the Standards of Medical Care in Diabetes – 2007,<sup>48</sup> four clinical chemistry tests were used to assess the degree of diabetic control: the fasting blood glucose level, the postprandial capillary plasma glucose, the glycosylated haemoglobin level, and the serum lipids. Serum creatinine and urine tests were also assessed to evaluate the systemic health condition of the diabetic individuals. All tests were taken before clinical and mycological procedures. Only patients fulfilling the recommended goals for the tests (Table I) were selected.

#### *Clinical and Mycological procedures*

Oral swabs samples were collected from tissue surface of the upper denture of all patients.<sup>9,23,25,26</sup> Each swab was placed into a test tube containing 5 mL of 0.9% sterile saline and vortexed for 1 minute to suspend the organisms from the swab. An aliquot (50 µL) from this suspension was spread plated on CHROMAgar *Candida*<sup>2,9,10,23,25,26</sup> and incubated at 30°C for 5 days. Colonies were presumptively identified by colony color. Thereafter, biochemical tests were performed to confirm all identifications. One colony of each color type

### 3.1 *Capítulo 1*

on CHROMAgar *Candida* was transferred onto fresh Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for purity. After 48 h at 37°C, yeasts isolates were identified using the following biochemical tests: carbohydrate assimilation pattern using the API ID32C system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) and morphological characteristics produced on Corn Meal Agar with Tween 80. In addition, green colonies on CHROMAgar *Candida* were submitted to hipertonic Sabouraud broth test for discriminating *C. albicans* and *C. dubliniensis*.<sup>49</sup>

#### *Statistical analysis*

Demographic characteristics of the patients and the risk factors were statistically analyzed to ensure homogeneity between the groups by means of 1-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (age of patients), Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test (age of dentures), and Fisher's exact test (gender and smoking habit). Bonferroni corrected confidence interval, Fisher's exact test, and Chi-square analysis of several proportions were used to compare the percentage of different species of *Candida* among experimental groups, the percentage of diabetics and non-diabetics in relation to the Newton's types of denture stomatitis, and the distribution of *Candida* spp. in relation to Newton's classification. Differences were considered statistically significant at a value of  $P < .05$ .

#### **Results**

The demographic characteristics of the 210 complete denture wearer patients and the risk factors for denture stomatitis are described in Table II. The mean age of the patients was 62.5 years (range, 59.6 to 65.5) at the time of the initial evaluation. In all groups, the number of female patients was more than 3 times higher than that of male patients, with no significant differences among the groups ( $P = .247$ ). Patients in the CG had their dentures placed more recently than those in DSND and DSD (Dunn's multiple comparisons test;  $P < .0001$ ). Few smokers participated in this study and no significant differences were found in their distribution among the three groups of study ( $P = .910$ ).

### 3.1 *Capítulo 1*

Considering all the patients together, *C. albicans* was the predominant yeast, isolated from 81.9% of the participants ( $P < .016$ , after Bonferroni correction). *C. glabrata* and *C. tropicalis* were isolated from 15.71% and 15.24% of the 210 participants, respectively, with no statistical differences between them ( $P > .05$ ; 95% Bonferroni corrected confidence interval: *C. albicans* 0.75, 0.88; *C. tropicalis* 0.08, 0.19; and *C. glabrata* 0.09, 0.20). When the distribution of *Candida* spp. within each group was analyzed (Table III), *C. albicans* was also the predominant yeast in all groups ( $P < .016$  after Bonferroni correction). Regardless of the group, *C. glabrata* and *C. tropicalis* were the non-*albicans* species most frequently isolated, with no significant differences between them ( $P > .05$ ). The percentage frequencies of *C. albicans* and *C. tropicalis* in denture stomatitis groups (DSND and DSD) were significantly higher than those in CG ( $\chi^2$  test;  $P < .01$ ), while there were no significant differences in the percentage of frequency of *C. glabrata* observed in the three groups of patients ( $P > .05$ ).

Twenty percent of DSND and 38% of DSD patients had Newton's Type I, 61% and 53% had Newton's Type II, and 19% and 10% had Newton's Type III, respectively, with no significant differences between groups of patients (Fisher's exact test;  $p > 0.09$ ). Since no significant differences were found between the two groups of patients with denture stomatitis, either in terms of *Candida* spp. prevalence or in Newton's types, patients were pooled and the frequency distribution of *Candida* spp. in the different types of denture stomatitis was evaluated. The  $\chi^2$  test for the comparison of several proportions revealed that the frequency distribution of *C. tropicalis* significantly increased ( $P < .01$ ) relative to the highest degree of inflammation (Table IV). The prevalence of *C. albicans* ( $P = .4015$ ) and *C. glabrata* ( $P = .2939$ ) was not influenced by the degree of inflammation.

Several study participants had more than one species of yeast on the dentures surfaces. For the 210 patients sampled, yeast mixtures isolated were *C. albicans* + *C. glabrata* (40.4%), *C. albicans* + *C. tropicalis* (36.5%), and *C. albicans* + *C. glabrata* + *C. tropicalis* (19.2%). The frequency distribution of

### 3.1 *Capítulo 1*

mixed species populations observed in CG (14.4%) was significant lower ( $P < .01$ ) than that observed in the 120 patients with denture stomatitis (32.5%).

#### **Discussion**

A higher percentage of female patients was observed in the present investigation and this result agrees with previous studies.<sup>7,10,24</sup> It has been found that elderly women presented more oral lesions than men<sup>50</sup> and that the hormonal factor and the great incidence of iron deficiency in women could be responsible for that disparity.<sup>18,51</sup> In addition, this difference can be explained by the fact that women seek dental treatment at a higher rate than men.<sup>52</sup> The mean age of the dentures, in the CG, was considered satisfactory (4.5 years-old) and lower than in DSND (15.1 years-old) and DSD (13.7 years-old). The age of dentures has been related to the occurrence of denture stomatitis.<sup>45</sup> Moreover, tissue trauma, frequently present in patients with poorly fitting dentures and non-balanced occlusion, can affect the occurrence of this infection.<sup>51</sup> Old dentures are also more difficult to keep clean because of the greater tendency to porosities in the denture base,<sup>45</sup> favoring *Candida* colonization. Therefore, it is reasonable to suppose that patients of DSND and DSD groups were more susceptible to denture stomatitis than those of CG. Smoking habit has also been found to be an important local factor in oral candidiasis.<sup>6,46</sup> Tobacco smoking associated with denture friction on the oral mucosa alters the mucosal surface, leading to contamination by *Candida* spp.<sup>46</sup> However, the percentage of non-smokers in all groups of this study was considerably high and, probably, this risk factor had no influence on the outcomes determined in this study.

Not surprisingly, of the 210 patients evaluated, 81.9% (172 patients) harbored *C. albicans*, which was by far the predominant yeast isolated. This finding is in agreement with previous reports.<sup>2,3,5,9,11,12,23,26</sup> *C. albicans* was also isolated from 64% of the patients without denture stomatitis, which was increased to 93 and 100% in the groups of denture stomatitis patients (DSND and DSD, respectively). In agreement with these results, Coco et al.<sup>23</sup> demonstrated that *C. albicans* was isolated from 75% of the patients without denture stomatitis



### 3.1 *Capítulo 1*

and from 81% of those with clinical signs of the infection. *C. albicans* expresses several virulence factors that contribute to its pathogenesis and very high prevalence. These factors include host recognition biomolecules (adhesins), morphogenesis (the reversible transition between unicellular yeast cells and filamentous, growth forms), and aspartyl proteases and phospholipases production.<sup>20,29</sup> Phenotypic switching is accompanied by changes in antigen expression, colony morphology, and tissue affinities in *C. albicans*, which might provide cells with a flexibility that results in the adaptation of the organism to the hostile conditions imposed by the host and treatment modality.<sup>20</sup> In addition, *C. albicans* has the ability to adhere to mucosal and denture surfaces, which is considered as the first step in the pathogenesis of denture stomatitis.<sup>14</sup>

Despite *C. albicans* is still the most frequently isolated species from patients with *Candida* infections,<sup>2-6,9,11-13,23-27</sup> the growing prevalence of non-*albicans* species is clearly a concern. In the current study, *C. glabrata* and *C. tropicalis* were isolated from 15.71% and 15.24% of both, healthy and denture stomatitis patients, respectively. Vanden Abbeele et al.<sup>26</sup> also observed that *C. albicans* was the commonest yeast found on patients' dentures, followed by *C. glabrata* and *C. tropicalis*. In another study, *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* represented more than 80% of isolates from clinical infections.<sup>10</sup> In terms of frequency distribution, some studies have shown that *C. tropicalis* was the second most prevalent species identified.<sup>5,9,24,25</sup> However, contrasting results have been found in other studies, in which *C. glabrata* was the most common yeast after *C. albicans*.<sup>4,6,23,26,27</sup> In the present investigation, there were no significant differences between the prevalence of *C. tropicalis* and *C. glabrata* in all patient groups. The differences in findings among studies are likely to be related to a combination of factors, such as sample techniques employed<sup>10,23-27</sup> and culture media used.<sup>53</sup> Conventional sampling techniques used in various studies include oral rinses.<sup>7,10,23</sup> Although this sampling technique provides adequate qualitative information, it can be argued whether adherent biofilm cells are removed during this procedure or loosely adherent cells residing at the peripheries of the biofilm are detached. To overcome this limitation, swabbing of the denture

### 3.1 *Capítulo 1*

fitting surfaces was used for sampling in this investigation.<sup>9,23,25,26</sup> Because CHROMagar *Candida* is generally more sensitive than other media in detecting mixed populations of yeasts,<sup>53</sup> this improved culture media was used in the present study<sup>2,9,10,23,25,26</sup> and provided differential staining and highlighted colonial morphological variations between *Candida* species, thus increasing the sensitivity of detection of yeasts.

Further, a large variation in species frequency has been reported in different regions of the world.<sup>54,55</sup> While several investigators reported that *C. tropicalis* is one of the most common non-*albicans* species isolated in Brazil and South America,<sup>38,39,41,54,55</sup> the literature contains substantial data indicating that *C. glabrata* is found much more frequently in North America.<sup>54,55</sup> Although these non-*albicans* species are in general less virulent than *C. albicans*,<sup>20,30,32-34</sup> it has been reported that *C. tropicalis* and *C. glabrata* have the ability to cause fungemia in humans<sup>41,43,44</sup> and that they are associated with a higher mortality rate than *C. albicans*.<sup>38,41,43</sup> Therefore, the pathogenicity of these species cannot be underestimated and more attention has to be paid to their appearance. It is important to mention that, in the present investigation, the species *C. dubliniensis* was not detected among all *Candida* isolates. This result agrees with other studies in which this species was not found in elderly individuals,<sup>24,26</sup> in denture wearers with and without denture stomatitis,<sup>23,27,34</sup> and in diabetic patients.<sup>2,4,5,7-9,12</sup> However, *C. dubliniensis* has been isolated in both diabetic<sup>10,11,13</sup> and non-diabetic patients.<sup>25</sup> This disparity may be related to problems with identification techniques, as *C. dubliniensis* and *C. albicans* have similar phenotypic characteristics making distinction between them difficult for conventional mycology laboratory testing. In the present investigation, the fact that only the hypertonic Sabouraud broth test<sup>49</sup> was performed for the discrimination between these two species may be considered a limitation of this study. The isolates of both species produce a green color on CHROMagar *Candida* and chlamydoconidia on Corn Meal Agar with Tween 80. Therefore, whether present, *C. dubliniensis* isolates could have been misidentified as *C. albicans*. In further

### 3.1 *Capítulo 1*

studies, polymerase chain reaction should be conducted to facilitate the differential diagnosis between these two species.

In the present study, no significant differences in *Candida* spp. prevalence were found between denture stomatitis patients with and without diabetes. Contrasting results have been reported in previous studies, in which diabetic patients were found more likely to have a higher prevalence of *Candida* spp. than non-diabetics.<sup>2-4,8-10</sup> However, it is important to mention that either poorly-controlled diabetic individuals were included in these studies (patients with glycosylated haemoglobin level higher than 7% or fasting blood glucose level higher than 130 mg/dL, for example)<sup>3,4,9</sup> or the degree of diabetic control was not reported.<sup>2,8,10</sup> In the present investigation, only well-controlled type 2 diabetic patients were included and this may help explain the results obtained here. Therefore, all patients with denture stomatitis were pooled and the distribution of the oral yeasts was analyzed in relation to Newton's classification of the infection.<sup>47</sup> The results showed that the frequency distribution of *C. tropicalis* significantly increased relative to the highest degree of inflammation (Table IV). These results, combined with the evidence for enhanced frequency distribution of *C. tropicalis* in DSND and DSD groups (Table III), suggest that the higher frequency of this species in denture surfaces may play a role in the progression of denture stomatitis. It has been suggested that species more resistant to therapeutic approaches may emerge in patients with candidiasis, especially those with recurrent infections.<sup>35,36</sup> In addition, *C. tropicalis* has demonstrated to display higher potential for dissemination and mortality rates than *C. albicans* and other species.<sup>38,39,41,43,44</sup> Several studies demonstrated that *C. tropicalis* is one of the most commonly isolated non-*albicans* species in dentures wearers,<sup>9,25,26</sup> in patients with denture stomatitis,<sup>25,27</sup> and in diabetics patients with<sup>4,12</sup> and without<sup>5,7,9,10</sup> denture stomatitis. Although the reason for the increased incidence of infections due to *C. tropicalis* is not completely understood, it could be attributed to some virulence factors associated with this species. Different *C. tropicalis* strains have demonstrated a high cell-surface hydrophobicity, which is involved in the adherence of microorganisms to different surfaces and considered

### 3.1 *Capítulo 1*

an important pathogenic attribute of yeasts.<sup>32,33</sup> It has been demonstrated that *C. tropicalis* obtained from the oral cavity of denture wearers with denture stomatitis were more adherent to buccal epithelial cells than those obtained from patients without signs of disease.<sup>30</sup> *C. tropicalis* strains seem to grow rapidly in the human body because of their high sucrose assimilation ability.<sup>56</sup> Other important virulence factor of this species is its capability to produce degradative enzymes, such as phospholipase<sup>12</sup> and proteinase,<sup>12,34</sup> which are directly correlated to the invasion and destruction of host tissue.<sup>20,29</sup> The ability of *C. tropicalis* strains to form biofilm on different surfaces<sup>57,58</sup> is another potential virulence trait, which may increase their resistance to antifungal treatment.<sup>21,22</sup> Although these specific virulence factors related to *C. tropicalis* may help explain the results obtained in the present study, further investigations will be required to examine and better understand the mechanism of pathogenicity of this *Candida* species.

Several study participants had more than one species of yeast on the dentures surfaces. The frequency distribution of mixed species populations observed in CG (14.4%) was significant lower than that observed in the 120 patients with denture stomatitis (32.5%). The yeast associations noted in the present study were *C. albicans* together with either *C. tropicalis* and/or *C. glabrata*, confirming trends found at other institutions<sup>2,5,27</sup>. Whether these combination of yeasts contribute to enhanced pathogenicity remains to be elucidated. The majority of patients with denture stomatitis had a chronic disease process that required prolonged and multiple treatments, which favor the emergence of other non-*albicans* species and formation of mixed biofilms.<sup>35,36</sup> The biofilm-associated resistance<sup>21,22</sup> may explain the high recurrence rates that are often associated with this type of infection. Further, several virulence factors have been associated with non-*albicans Candida* strains, such as the ability to adhere and colonize different substrates (host cells and acrylic surfaces), forming mixed biofilm, secretion of degradative enzymes, and development of drug resistance.<sup>28,35,36,57,58</sup> The complex interactions between these three species are not well defined, but the findings from the present study suggest that a synergistic

### 3.1 *Capítulo 1*

relationship may be involved with the enhanced pathogenic potential of these combinations, facilitating the onset of the infection.

In conclusion, non-*albicans* species was identified in both, healthy and denture stomatitis patients, with and without diabetes mellitus. *C. albicans* and *C. tropicalis* strains were more prevalent in diabetic and non-diabetic patients with denture stomatitis than in the healthy ones. In patients with severe denture stomatitis, *C. tropicalis* was more frequent. The knowledge of prevalence species distribution, rapid species identification, antifungal susceptibility testing and the development of new antifungal drugs are mandatory to achieve a decrease in *Candida* infections and an increase in quality of life of denture wearer individuals with and without type 2 diabetes mellitus.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by FAPESP - São Paulo Research Foundation (Grants: 05/03226-3, 05/02384-4, 05/04695-7 and 06/02842-5).

#### **References**

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-31.
2. Belazi M, Velegaki A, Fleva A, Gidarakou I, Papanau L, Baka D, et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses* 2005;48:192-6.
3. Darwazeh AMG, Lamey PJ, Samaranayake LP, Mac-Farlane TW, Fisher BM, MacRury SM, et al. The relationship between colonisation, secretor status and in vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetics. *J Med Microbiol* 1990;33:43-9.
4. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1996;25:411-5.

### 3.1 *Capítulo 1*

5. Fisher BM, Lamey PJ, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Frier BM. Carriage of *Candida* species in the oral cavity in diabetic patients: relationship to glycaemic control. *J Oral Pathol* 1987;16:282-4.
6. Fongsmut T, Deerochanawong C, Prachyabrued W. Intraoral *Candida* in Thai diabetes patients. *J Med Assoc Thai* 1998;81:449-53.
7. Gonçalves RH, Miranda ET, Zaia JE, Giannini MJ. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients. *Mycopathologia* 2006;162:83-9.
8. Kadir T, Pisiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbuker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiological and systemic factors. *J Oral Rehabil* 2002;29:452-7.
9. Lotfi-Kamran MH, Jafari AA, Tafti-Falah A, Tavakoli E, Falahzadeh MH. *Candida* colonization on the denture of diabetic and non-diabetic patients. *Dent Res J* 2009;6:23-7.
10. Khosravi AR, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. *J Mycol Med* 2008;18:83-8.
11. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:181-5.
12. Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP, Pereira LJ. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. *Mycopathologia* 2010;169:215-23.
13. Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM, et al. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med* 2000;29:86-90.
14. Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J* 1970;129:151-6.

### 3.1 *Capítulo 1*

15. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988;318:1315-21.
16. Farman AG, Nutt G. Oral *Candida*, debilitating disease and atrophic lesions of the tongue. *J Biol Buccale* 1976;4:203-26.
17. Wilson RM, Reeves WG. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. *Clin Exp Immunol* 1986;63:478-84.
18. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990;48:61-9.
19. Budtz-Jorgensen E. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. *Acta Odontol Scand* 1990;48:37-43.
20. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001;9:327-35.
21. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005;4:633-8.
22. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:53-9.
23. 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;23:377-83.
24. de Resende MA, de Sousa LV, de Oliveira RC, Koga-Ito CY, Lyon JP. Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. *Mycopathologia* 2006;162:39-44.
25. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguía A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol* 2009;54:127-31.
26. Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology* 2008;25:222-8.

### 3.1 *Capítulo 1*

27. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology* 2005;22:168-76.
28. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS* 2002;110:601-10.
29. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:632-8.
30. Lyon JP, Resende MA. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. *Mycoses* 2007;50:21-4.
31. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS* 1995;103:707-13.
32. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun* 1985;50:97-101.
33. Minagi S, Miyake Y, Fujioka Y, Tsuru H, Suginaka H. Cell surface hydrophobicity of *Candida* species as determined by the contact-angle and hydrocarbon-adherence methods. *J Gen Microbiol* 1986;132:1111-5.
34. Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med* 2008;37:587-92.
35. Arevalo MP, Arias A, Andreu A, Rodriguez C, Sierra A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against *Candida* spp. *J Chemother* 1994;6:226-9.
36. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol* 2002;40:3135-9.



### 3.1 *Capítulo 1*

37. Abelson JA, Moore T, Bruckner D, Deville J, Nielsen K. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. *Pediatrics* 2005;116:61-7.
38. Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect* 2000;45:69-72.
39. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:281-6.
40. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:377-84.
41. Goldani LZ, Mário PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J Infect* 2003;46:155-60.
42. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 1992;15:414-21.
43. Meunier-Carpentier F, Kiehn TE, Armstrong D. Fungemia in the immunocompromised host. Changing patterns, antigenemia, high mortality. *Am J Med* 1981;71:363-70.
44. Wingard JR, Merz WG, Saral R. *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 1979;91:539-43.
45. Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol* 1981;10:65-80.
46. Arendorf TM, Walker DM, Kingdom RJ, Roll JR, Newcombe RG. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leukoplakia. *Br Dent J* 1983;155:340-3.
47. Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *Br Dent J* 1962;112:357-60.
48. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2007. *Diabetes Care* 2007;30(suppl 1):S4-S41.

### 3.1 *Capítulo 1*

49. Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:85-6.
50. Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J Oral Pathol Med* 2003;32:571-5.
51. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil* 2007;34:448-55.
52. Dorey JL, Blasberg B, MacEntee MI, Conklin RJ. Oral mucosal disorders in denture wearers. *J Prosthet Dent* 1985;53:210-13.
53. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996;34:58-61.
54. Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:470-4.
55. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:747-51.
56. Okawa Y, Miyauchi M, Kobayashi H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1507-10.
57. Mutluay MM, Oğuz S, Orstavik D, Fløystrand F, Doğan A, Söderling E, et al. Experiments on in vivo biofilm formation and in vitro adhesion of *Candida* species on polysiloxane liners. *Gerodontology* 2010; 27:283-91.
58. Paulitsch AH, Willinger B, Zsalatz B, Stabentheiner E, Marth E, Buzina W. In-vivo *Candida* biofilms in scanning electro

### 3.1 Capitulo 1

#### Tables

Table I. Summary of recommendations for adults with diabetes<sup>48</sup>

Test	Goal value
Fasting blood glucose level	90 – 130 mg/dL
Postprandial plasma glucose	< 180 mg/dL
Glycosylated haemoglobin level	< 7%
Serum lipids:	
- LDL	< 100 mg/dL
- Triglycerides	< 150 mg/dL
- HDL	> 40 mg/dL
Serum creatinine	0.4 – 1.3 mg/dL
Urine:	
- Protein	Absent
- Glucose	Absent
- Nitrite	Absent
- Leukocytes	< 10 units / mm <sup>3</sup>

Table II. Descriptive analysis of demographic characteristics and risk factors

	Demographic characteristics		Risk factors	
	Mean age (years-old)	Gender (% of <i>female</i> )	Mean age of dentures (years-old)	% of non-smokers
CG (n=90)	65.5 <sup>a</sup>	72.3 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	86.7 <sup>a</sup>
DSND (n=80)	59.6 <sup>b</sup>	77.5 <sup>a</sup>	15.1 <sup>b</sup>	85.0 <sup>a</sup>
DSD (n=40)	62.4 <sup>ab</sup>	87.5 <sup>a</sup>	13.7 <sup>b</sup>	87.5 <sup>a</sup>
<i>p</i> -value	<0.0002*	0.247 <sup>‡</sup>	<0.0001 <sup>†</sup>	0.910 <sup>‡</sup>

CG, healthy control group; DSND, denture stomatitis without diabetes; DSD, denture stomatitis with diabetes.

\*One-way analysis of variance; <sup>†</sup>Kruskal- Wallis test; <sup>‡</sup>Fisher's exact test.

<sup>a,b</sup>In columns, values with the same letter were not statistically different ( $P > .05$ ).

### 3.1 *Capítulo 1*

Table III. Frequency distribution (%) of *Candida* spp. in relation to the groups of study

	CG	DSND	DSD
<i>C. albicans</i>	64 <sup>a</sup>	93 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i>	2 <sup>a</sup>	28 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>
<i>C. glabrata</i>	14 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>

Values for *C. tropicalis* and *C. glabrata* were not significantly different ( $P > .05$ ; Bonferroni-corrected 95% confidence intervals: CG: *C. albicans* 0.51-0.76, *C. tropicalis* 0.001-0.09, and *C. glabrata* 0.07-0.25; DSND: *C. albicans* 0.82-0.98, *C. tropicalis* 0.16-0.41, and *C. glabrata* 0.10-0.33; and DSD: *C. albicans* .89-01.0, *C. tropicalis* 0.07-0.40, and *C. glabrata* 0.02-0.27).

Abbreviations as in Table II.

<sup>a,b</sup>In rows, values with the same letter were not statistically different ( $\chi^2$  test:  $P > .05$ ).

Table IV. Frequency distribution (%) of *Candida* spp. in different types of denture stomatitis

	Type I	Type II	Type III	<i>P</i> value
<i>C. albicans</i>	100	94.3	94.7	0.4015
<i>C. tropicalis</i>	25.8	18.6	57.9	< 0.01
<i>C. glabrata</i>	9.7	15.7	26.3	0.2939

Significant difference only between types 2 and 3 for *C. tropicalis*.

## *3.2 Capítulo 2*

### **Denture microwave disinfection versus nystatin in treating well-controlled type 2 diabetics with denture stomatitis. A randomized clinical trial\***

Paula Volpato Sanitá DDS, MSc, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista<sup>1</sup>

Ana Lúcia Machado DDS, MSc, PhD, Professor, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista<sup>1</sup>

Ana Cláudia Pavarina DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista<sup>1</sup>

Elaine Maria Sgavioli Massucato DDS, MSc, PhD, Assistant Professor, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista<sup>1</sup>

Arnaldo Lopes Colombo DDS, MSc, PhD, Professor, Division of Infectious Diseases, Federal University of São Paulo, UNIFESP<sup>2</sup>

Carlos Eduardo Vergani DDS, MSc, PhD, Professor, Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>R. Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil, CEP 14801-903.

<sup>2</sup>R. Dr. Diogo de Faria, 822, São Paulo, SP, Brazil, CEP 04037-002.

**Corresponding author:** Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

**Address for correspondence:** R. Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil, CEP 14801903

Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School

Phone 55 16 33016542; Fax 55 16 33016406; E-mail [vergani@foar.unesp.br](mailto:vergani@foar.unesp.br)

---

\*Artigo submetido para publicação e em fase de revisão no periódico **The International Journal of Prosthodontics** (Anexo 2)

## 3.2 Capitulo 2

### Summary

**Aims:** this randomized clinical trial compared the effectiveness of denture microwave disinfection and nystatin on the treatment of well-controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis in terms of microbiological and clinical outcomes. **Methods:** diabetic patients wearing maxillary complete dentures with denture stomatitis (n=40) were divided into two groups. NYS group: patients were treated with topical nystatin, 4 times/day for 14 days; MW group: patients had their denture microwaved (650W for 3 min), 3 times/week for 14 days. Mycological samples were taken from the palates and dentures of the patients for quantification and identification of *Candida* and standardized photographs of the palates were taken for the clinical analysis. Evaluations were repeated at baseline, the end of treatments (day-14), and follow up (day-30, day-60, day-90). Microbiological data were evaluated by ANOVA using a random effects statistical model, Tukey's post hoc test, and Chi-square test ( $\alpha=0.05$ ). Clinical results were analyzed by Mann-Whitney test and Fisher's exact test ( $\alpha=0.05$ ). **Results:** both treatments were considered successful in reducing the clinical signs of denture stomatitis, significantly reduced the values of cfu/mL from the palates and dentures at day-14 and day-30, and 40% of treated patients were cured at the end of treatments. No significant differences ( $p>0.05$ ) in the microbiological and clinical outcomes was revealed between the two groups of study. *C. albicans* was the most predominant ( $p<0.01$ ) species isolated, followed by *C. tropicalis* and *C. glabrata*. **Conclusions:** denture microwave disinfection was as effective as nystatin on the treatment of diabetic patients with denture stomatitis.

**Keywords:** Diabetes mellitus; Denture stomatitis; Complete denture; Microwaves; Nystatin

### Introduction

Diabetes mellitus is considered a global public health problem, and the number of adults with diabetes worldwide is expected to increase to 300 million in the next 15 years<sup>1</sup>. This chronic metabolic disorder causes multiple comorbidities and increases the risk of death in those whom it affects. Besides

## 3.2 *Capítulo 2*

damaging many organs and systems in the body<sup>2</sup>, the consequences of diabetes are strongly associated with several local alterations in the oral mucosa, which favor the development of important infections. Oral candidiasis is one of the most common opportunistic infections encountered in the diabetic patients<sup>3</sup>, who are more susceptible to fungal infections<sup>4</sup> and show a higher prevalence of *Candida* colonization in the oral cavity compared with non-diabetic individuals<sup>4-9</sup>. A significantly higher incidence of *Candida* infection and increased levels of *Candida* spp. were also found in diabetic patients wearing complete dentures<sup>4,10,11</sup>, increasing their vulnerability to candida-induced denture stomatitis. In addition, diabetic patients with dentures had more non-*albicans* *Candida* species isolated than dentate diabetics<sup>7,8,11</sup>. *Candida* spp. have the ability to adhere to the denture tissue surface, which then acts as a reservoir, favoring yeast proliferation and enhancing their infective potential<sup>12,13</sup>. Dentures may also induce trauma<sup>14</sup>, thus increasing the permeability of the epithelium to soluble candidal antigens and toxins. As a result, the association of a complete denture and the local and systemic complications of the diabetes can increase the incidence of oral *Candida* disorders and the susceptibility of the denture wearer diabetic patient.

Usually, denture stomatitis has been treated with topical application of nystatin, chlorhexidine, or miconazole before systemic drugs are used<sup>12,13,15-17</sup>. Nevertheless, failure of topical therapy is not infrequent, especially because of the diluent effect of saliva and movements of the tongue, both of which serve to reduce antifungal agents to sub-therapeutic concentrations<sup>12</sup>. In addition, topical agents frequently require multiples doses and their taste may cause nausea, which can lower the patient's compliance<sup>16</sup>. If a systemic approach is required, triazole drugs, such as fluconazole, are frequently used<sup>16,17</sup>. However, these medications must be administered with caution because they may cause hepatotoxic and nephrotoxic side effects<sup>18</sup>. It is also important to emphasize that the widespread use of these medications have promoted selection of resistant species by the development of mutations in yeasts<sup>19</sup> or by shifting colonization to more naturally resistant *Candida* species, such as *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, and *C. krusei*<sup>20,21</sup>, reducing the effectiveness of the treatment. The clinical relevance of

## 3.2 *Capítulo 2*

this epidemiologic shift is need for establishment of new strategies for control and management of infections caused by the different *Candida* spp.

While antifungal drugs are aimed at treating the oral mucosa, they do not eradicate the *Candida* that colonizes the denture<sup>12,13</sup>. Thus, the recurrence of infection shortly after treatment has been frequently observed and is attributed to re-emergence of the original infecting strain<sup>12,13,15-17</sup>. For all these reasons, and aiming to overcome the limitations and avoid the side-effects of these standard medications, strict denture disinfection measures have been recommended to the treatment of denture stomatitis<sup>12,13,17,22</sup>. Microwave irradiation is a simple and inexpensive physical method of denture disinfection, which effectiveness has been demonstrated in vitro<sup>23,24</sup>. Dentures inoculated with different bacteria and *Candida* spp., including the intrinsically resistant *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, and *C. krusei*, were sterilized by microwave irradiation for 3 minutes at 650W<sup>23,24</sup>. A recent in vivo study showed that this microwave regimen inactivated the denture biofilm of 30 individuals, who were not diagnosed with denture stomatitis<sup>25</sup>. Moreover, emerging evidence from other clinical studies showed the effectiveness of microwave disinfection of complete dentures in treating patients with denture stomatitis<sup>12,13,22</sup>. The risks of re-infestation of the denture tissue surface and re-infection of the adjacent soft tissue were dramatically reduced for patients whose dentures were microwaved<sup>12,13</sup>. It is important to state that this microwave disinfection regimen (3 minutes/650W) had no detrimental effect on the flexural strength<sup>26</sup>, hardness<sup>27</sup>, dimensional stability<sup>28</sup>, and porosity<sup>29</sup> of the denture materials. Therefore, from these studies, an effective, drugless, and safe protocol for the treatment and prevention of denture stomatitis was established.

Although effective in non-compromised patients, denture microwave disinfection for treating denture stomatitis has not yet been evaluated in diabetics. In these patients, the increased number of available receptors for *Candida* due to salivary glucose levels<sup>30</sup> and the micro-vascular degeneration found in oral mucosa of diabetic patients<sup>31</sup> are local factors that facilitate the process of candidal adhesion, colonization, propagation, and mucosal infection. A



## 3.2 *Capítulo 2*

decrease in salivary flow rate consequent to diabetes may further enhance candidal colonization<sup>7</sup>, since saliva possesses several secretory components that inhibit *Candida* cell adhesion to the epithelial cells<sup>32</sup>. Some systemic factors, such as a dysfunction in candidacidal activity of neutrophils<sup>33</sup> due to decreased phagocytosis, intracellular killing, bactericidal activity, and chemotaxis, may also render the diabetic person even more prone to candidal infection. For these reasons, the course of infection in diabetic patients is more complicated and the effectiveness of microwave disinfection in treating denture stomatitis may be more complex and unpredictable. This randomized clinical study tested the hypothesis that microwave disinfection of complete dentures could be as effective as the more conventional topical antifungal medication (nystatin) on the treatment of well-controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. The effectiveness was assessed microbiologically, through the reduction in *Candida* counts on the palates and dentures surfaces, and clinically, by means of resolving the clinical signs of the infection. The prevalence of *Candida* spp. identified in these diabetics was also evaluated.

### **Materials and Methods**

#### *Study design*

This was a two group, parallel, randomized clinical trial comparing the effectiveness of denture microwave disinfection and nystatin on the treatment of diabetic patients with denture stomatitis. The procedures carried out in study follow the criteria of Resolution 196/96 of the Brazilian Health Ministry, which regulates research involving human subjects. The project was approved by the Ethics Committee of the Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista (number 06/2006). All participants were made aware of the objectives of the study as well as probable risks and benefits. All subjects voluntarily entered the study and signed an informed consent form before their enrollment.

## *3.2 Capítulo 2*

### *Participants*

In the present study, patients were recruited from UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, and from public health centers in Araraquara city. Only well-controlled type 2 diabetic patients, ranging between 18 and 75 years-old, wearing maxillary complete dentures, and diagnosed with denture stomatitis were included. A comprehensive oral examination of the patients was performed by the same investigator and their mucosal characteristics were initially classified according to the criteria proposed by Newton: Type I (initial stage of localized pin-point hyperaemia); Type II (diffuse erythema confined to the denture-bearing surface); and Type III (inflammatory papillary hyperplasia)<sup>34</sup>. All patients were also initially evaluated in relation to their medical care of diabetes. Based on the recommendations of the Standards of Medical Care in Diabetes – 2007<sup>35</sup>, four clinical chemistry tests were performed to assess the degree of diabetic control: the fasting blood glucose level, the postprandial capillary plasma glucose, the glycosylated haemoglobin level, and the serum lipids. Serum creatinine and urine tests were also carried out to evaluate the systemic health condition of the diabetic individuals. Only patients fulfilling the recommended goals for the tests (Table 1) and the inclusion criteria were selected. Individuals who had received or were currently receiving treatment with antibiotics, antifungals or steroids in the past 3 months; patients with anaemia, immunosuppression or cancer therapy (radio- or chemotherapy); and those wearing the same denture for more than 30 years were excluded from the study<sup>13</sup>. Personal, medical, and dental histories of the patients were recorded. Data collection was done at Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil.

### *Sample size calculation and Randomization*

Sample size calculation was performed by using data from a pilot study, for which 10 patients were recruited (five in each group of study) and different tests were performed. First, sample size was calculated by using a two-way analysis of variance (ANOVA) using a random effects statistical model with

## 3.2 *Capítulo 2*

repeated measures over the time. One factor was group, with 2 levels (NYS and MW group). Another factor was time period, with 5 levels (baseline, day-14, day-30, day-60, and day-90). A minimal sample size of 20 patients in each group enabled detection of an effect size of 0.25 and a within correlation of -0.15, at an  $\alpha$ -value of 0.05, with 86% statistical power. A stochastic simulation by the Monte Carlo method using 12.000 replications was used to determine the power of the Fisher Exact and Mann-Whitney tests, also used to analyze the pilot results. The sample size of 20 patients in each group would allow detection of a difference between groups at an  $\alpha$ -value of 0.05, with at least 89% statistical power.

In order to create groups of patients that were similar with regard to baseline characteristics that could influence prognosis other than the treatment being considered, namely risk factors, a stratified randomization was used. The following risk factors were considered in this study: age of the dentures<sup>14</sup>, smoking habits<sup>36</sup>, xerostomia<sup>7,14,32</sup>, denture hygiene habits<sup>37</sup>, and nocturnal wear of the dentures<sup>14</sup>. Denture hygiene was classified as good (absence of plaque) and poor (presence of removable and/or non-removable plaque on the inner and/or outer denture surface).

### *Interventions*

According to the stratified randomization list, the 40 diabetic patients were randomly assigned to one of the two experimental groups. Patients in the group NYS were treated with topical antifungal medication (nystatin, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brazil). Patients were instructed to remove their dentures from the oral cavity and rinse with 1 mL of the suspension (100.000 UI/mL) for one minute, four times a day, during 14 days. Patients were informed not to swallow the suspension following rinsing. In the group MW, each patient had its maxillary complete denture individually immersed in a beaker containing 200 mL of sterile distilled water. Each beaker was placed on the rotational plate in a domestic microwave oven (Model Sensor Crisp 38, Brastemp, Manaus, AM, Brazil) and irradiated at 650W for 3 minutes<sup>23-25</sup>, three times per week, for 14 days. After treatment, patients from both groups

## 3.2 *Capítulo 2*

were followed up monthly for 3 months. Over the experimental period, all patients were instructed to scrub their dentures with coconut soap followed by toothpaste after every meal, and immerse the dentures in filtered water (200 mL) overnight. Patients received verbal and written instructions describing these routine care procedures and how to use the medication.

In order to control the diabetes strictly over the 3-month duration of this study, the fasting blood glucose level and the postprandial capillary plasma glucose were also performed every month, while the glycosylated haemoglobin level was measured again at 90 days follow up.

### *Outcomes*

The primary outcomes of interest were the *Candida* colony counts from the palates and dentures surfaces, quantified in cfu/mL, and severity of infection of the palatal mucosal, classified according to the criteria proposed by Newton<sup>34</sup> (0, absence of palatal inflammation; or Types I, II, and III), measured before treatments (baseline), at the end of treatments (day-14), and at follow up (day-30, day-60, and day-90). The second outcome was the prevalence of *Candida* spp. identified in the two groups of diabetics at the same intervals.

### *Microbiological procedures*

Oral swabs samples were collected from the palates and tissue surfaces of the dentures of all patients<sup>4,13,17,22,25</sup>. Each swab was placed into a test tube containing 5 mL of 0.9% sterile saline and vortexed for 1 minute to suspend the organisms from the swab. For the quantification of *Candida* counts, the microbial material of the palates and dentures was diluted using 0.9% sterile saline as diluent ( $10^{-1}$  to  $10^{-3}$ ). Aliquots of the original sample suspension and each dilution (25  $\mu$ L) were plated, in duplicate, on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) containing chloramphenicol. The plates were incubated at 30°C for 48 hours, microbial colony counts of each plate were quantified using a digital colony counter (CP 600 Plus; Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brazil), and the number of colony forming units per mL

## 3.2 *Capítulo 2*

(cfu/mL) was then calculated. Colonies were also submitted to identification procedures for *Candida* spp. Aliquot of 50  $\mu$ L from the original sample suspension from the palates and dentures was spread plated on CHROMAgar *Candida*<sup>4,8,25</sup> and incubated at 30°C for 5 days. Colonies were presumptively identified by colony color and macro-morphology. Thereafter, biochemical tests were performed to confirm all identifications. One colony of each color type on CHROMAgar *Candida* was transferred onto fresh SDA for purity. After 48 hours at 30°C, yeasts isolates were identified by the pattern of assimilation of a variety of carbon and nitrogen sources, using the ID32C yeast identification system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)<sup>4,22</sup>, and by the micro-morphological characteristics produced on corn meal agar with Tween 80<sup>4,25</sup>. In addition, green colonies on CHROMAgar *Candida* were submitted to hipertonic Sabouraud broth test<sup>38</sup> for discriminating *C. albicans* and *C. dubliniensis*. All microbiological procedures were carried out by the same operator.

### *Clinical procedures and blinding*

The clinical assessment of the efficacy of the different treatments was carried out by taking standardized color photographs of the palatal mucosa of each patient. These photos were taken before treatments (baseline), at the end of treatments (day-14), and at follow up (day-30, day-60, and day-90). All the photographs were taken with the same digital camera (Canon EOS Rebel XTI, Canon, Tokyo, Japan), by the same operator, and under the same conditions (place, light, angle, and patient position) to facilitate their reproducibility. After standardization of the images, two independent observers were engaged to blind-analyze the five photographs taken from each patient. In this blind-analysis, the observers were instructed to classify the mucosal characteristics of each patient according to the criteria proposed by Newton<sup>34</sup>. Observers were blind to risk factors, treatment group, and period of evaluation.

## 3.2 *Capítulo 2*

### *Statistical analysis*

Demographic characteristics of the patients and the risk factors were statistically analyzed to ensure homogeneity between the groups by means of Student's T test, Fisher's exact test, and Wilcoxon's signed rank test. Differences were considered statistically significant at a value of  $p < 0.05$ .

The numbers of cfu/mL obtained in the microbiological tests were  $\log_{10}$  transformed ( $\log_{10}$ cfu/mL) to achieve a normal distribution. A two-way analysis of variance (ANOVA) using a random effects statistical model was performed to determine whether the treatments differed significantly in their effects on the  $\log_{10}$ cfu/mL values, over the time (baseline; day-14; day-30; day-60; and day-90). The values obtained from the palates and dentures were analyzed separately. When differences were found, Tukey's post hoc test was implemented and  $p < 0.05$  was taken as significant. Clinical significance between groups was determined by the effect size, which was determined by taking the standardized mean difference on  $\log_{10}$ cfu/mL between pre- and post-treatment results for each group and dividing by the standard deviation of pre-treatment result<sup>39</sup>. To interpret the resulting number, this general guide was used:  $< 0.1$ =trivial effect;  $0.1$ – $0.3$ =small effect;  $0.3$ – $0.5$ =moderate effect; and  $> 0.5$ =large difference effect<sup>13</sup>.

The percentage of different species of *Candida* isolated from the palates and dentures were compared by a non-parametric Chi-square test. Differences were considered statistically significant at a value of  $p < 0.05$ .

The clinical efficacy of the treatments was evaluated by a blind-analysis of the five color photographs taken from the palatal mucosa of each patient. The evaluation of the mucosal characteristics of each photo of each patient by the two blind-observers was scored (0, types I, II, and III) and their degree of correlation and concordance were estimated to provide a measure of the reliability and validity of the results. The Kappa measure of agreement ( $\kappa$ ) evaluated the inter-observer concordance and its values range between 0 and 1 (perfect match,  $\kappa = 1$ ; almost perfect,  $0.81 < \kappa < 1$ ; substantial,  $0.61 < \kappa < 0.80$ ; moderate,  $0.41 < \kappa < 0.60$ ; fair,  $0.21 < \kappa < 0.40$ ; slight,  $0 < \kappa < 0.20$ ; no concordance,  $\kappa = 0$ )<sup>40</sup>. The Kendall's rank correlation coefficient ( $\tau$ ) evaluated the inter-observer

### 3.2 *Capítulo 2*

correlation, that is, the similarity of scores when ranked by each of the observer, and its values range between -1 and 1 (perfect agreement,  $\tau = 1$ ; no correlation,  $\tau = 0$ ; perfect disagreement,  $\tau = -1$ )<sup>41</sup>. The coefficient of concordance (%) was calculated to provide the percentage of exact same scores among the observers. The analysis of the degree of correlation and concordance inter-observers was performed considering the scores recorded for the period of treatment (baseline and day-14) and for the whole trial period (baseline; day-14; day-30; day-60; and day-90).

The degrees of severity of the mucosal characteristics of patients scored at baseline from the groups NYS and MW were compared by Fisher's exact test to ensure homogeneity between the groups ( $\alpha=0.05$ ). To analyze the magnitude of the treatment's effect on the evolution of the disease over the time, a categorical variable was created. This categorical variable was represented by the decrease/increase in infection rates from each period (day-14; day-30; day-60; and day-90) in relation to baseline. The following general categories were used: (+) decrease in infection score by 1 point (i.e. type III to II, type II to I, or type I to 0); (++) decrease in infection score by 2 points (i.e. type III to I, or type II to 0); (+++) decrease in infection score by 3 points (i.e. type III to 0); (No) no change in infection status; (-) increase in infection score by 1 point (i.e. type I to II, or type I to III); (- -) increase in infection score by 2 points (i.e. type I to III). The percentage of patients in each category was determined for each period and comparisons between the groups were made by Mann-Whitney test ( $\alpha=0.05$ ). In addition, the percentages of "cured patients" and "patients with recurrence" were also compared between the two groups of study by means of the Fisher's exact test ( $\alpha=0.05$ ). "Cure" was considered absence of palatal infection and was evaluated over the time. "Recurrence" was considered increase in infection at day-90 in relation to day-14, day-30, or day-60. In the present study, the magnitude of the treatment's effect on the disease over the time was also measured by percent improvement. It was defined that a 30% improvement or greater corresponded to a clinically significant difference<sup>13</sup>. The outcome measure of success was defined as

## 3.2 *Capítulo 2*

the increase of 30% in the proportion of patients with decrease in infection score by 2 and 3 points at the end of treatment and at the follow up.

### **Results**

#### *Demographic characteristics and risk factors*

Table 2 shows that, at the time of the initial evaluation, the mean age of patients was  $62.6 \pm 7,45$  years-old (ranged from 48 to 75 years-old) for the NYS group and  $62.2 \pm 6,69$  years-old (ranged from 46 to 72) for MW group. In both groups, the number of female patients was higher than that of male patients, the mean age of dentures was greater than 10 years, most patients complained of xerostomia, and few smokers participated. Before the onset of the study, a large percentage of patients wore their dentures at night and at least 50% of the patients from the two groups showed poor denture hygiene habits. Stratified randomization ensured that the subsamples for the 2 treatments were well balanced for both, demographic characteristics and risk factors, since the statistical analysis showed homogeneity between the two groups of study ( $p>0.05$ ).

#### *Microbiological outcomes*

The mean values of *Candida* colony counts in  $\log_{10}\text{cfu/mL}$  obtained from the palates and dentures of both treatment groups are given in Table 3. Two-way ANOVA showed that there were no significant differences in the mean values of  $\log_{10}\text{cfu/mL}$  when the factor treatment group (NYS or MW) was analyzed for both, palates ( $p=0.3888$ ) and dentures ( $p=0.2551$ ), while statistically significant differences ( $p<0.01$ ) were found when the factor period of time was evaluated (Table 4). Tukey's post hoc test (Table 3) showed that both treatments reduced significantly the mean values of  $\log_{10}\text{cfu/mL}$  from the palates and dentures at day-14 ( $p=0.0293$  and  $p<0.001$ , respectively) and day-30 ( $p=0.0371$  and  $p<0.001$ , respectively). At day-60 and day-90, the mean values of  $\log_{10}\text{cfu/mL}$  from the palates and dentures were not significantly different



## 3.2 *Capítulo 2*

( $p>0.05$ ) from their respective baseline data. It can also be observed from Table 3 that the effect size of treatments was large for the palates of NYS group (0.98) and moderate for the palates of MW group (0.48). For the dentures, the effect size was very large for both groups (NYS group=2.85; MW group=2.12).

Table 5 shows that *C. albicans* was the main species encountered ( $p<0.01$ ), occurring in 43% and 75.5% of the palates and dentures, respectively. *C. tropicalis* and *C. glabrata* were the most common non-*albicans* species isolated from the samples from the palates and dentures, with no significant differences between their prevalence ( $p>0.05$ ). The frequencies distributions of *C. albicans* and *C. tropicalis* isolated from the dentures were significant higher than those obtained from the palates ( $p<0.01$ ). In addition, significant higher yeast-negative samples were collected from the palates ( $p<0.01$ ). Other *Candida* species (*lusitanae*, *colliculosa*, *famata*, *parapsilosis*, *krusei*, *pelliculosa*, *sake*, *rugosa*, *zeylanoides*, *utilis*, and *guilliermondi*) and additional yeasts from the genus *Cryptococcus* (*laurentii*, *humicola*, and *albidus*), *Saccharomyces* (*cerevisiae* and *kluverii*), *Kloeckera apiculata*, and *Rhodotorula* were detected at a lower rate. Fifteen participants (37.5%) had more than one species of yeast isolated from the palates and dentures. The yeast mixtures isolated were *C. albicans* + *C. tropicalis* (41%), *C. albicans* + *C. glabrata* (25%), and *C. albicans* + *C. glabrata* + *C. tropicalis* (14%).

### *Clinical outcomes*

Considering the scores recorded for the period of treatment (baseline and day-14), there were substantial degree of concordance ( $\kappa=0.61$ )<sup>40</sup> and excellent degree of correlation ( $\tau = 0.85$ ; coefficient of concordance=75%)<sup>41</sup> inter-observers. When the whole trial period was evaluated, there was a decrease in the degree of concordance ( $\kappa=0.42$ ), which is still considered moderate<sup>40</sup>. The degree of correlation inter-observers during this period ( $\tau = 0.77$ ; coefficient of concordance=60%) was also satisfactory<sup>41</sup>, indicating a similar consistent trend between the observers' scores. Illustrative images of the photos scored by the observers are given in Figures 1 and 2. A comprehensive description of the

## 3.2 *Capítulo 2*

frequency distribution of the Newton's classification for denture stomatitis over the time is given in Figures 3 and 4. Fisher's exact test showed homogeneity between the two groups of study ( $p=0.6514$ ) for the mucosal characteristics of patients at baseline. Mann-Whitney test showed no significant differences ( $p>0.05$ ) between the magnitude of the clinical efficacy of NYS and MW on the evolution of the disease over the time (Table 6). Both treatments were considered successful in treating denture stomatitis. At least, 50% of all treated patients showed a decrease in infection score from the end of treatments (day-14) to day-60. At the end of the follow up (day-90), approximately 42% of treated patients still showed a decrease in infection score, whereas around 60% of patients demonstrated signs of infection. Among them, 46% showed no change and 13% increased their infection score. Fisher's exact test showed that there were no significant differences in the percentage of "cured patients" among the two groups of treatment (Table 7). At the end of treatments, 40% of patients from NYS and MW groups were cured. At the follow up periods, NYS group showed 20% of cured patients. In MW group, 30% of patients were cured at day-30 and day-60, and 25% at day-90. Considering the percentage of patients with recurrence, Fisher's exact test showed that there were no significant differences between the two groups of treatment (Table 7). At day-90, 40% of patients from NYS group and 55% from MW group showed increase in infection score after treatment.

### **Discussion**

In the sample of the present investigation, the mean age of the patients was 62.4 years. This is in agreement with other studies<sup>5,6,13</sup> and also to the observation that older patients had an increased risk of yeast infection due to the greater number of denture wearers from the sixth decade of life<sup>4,8</sup>. In both groups evaluated here, the number of female patients was more than 5 times higher than that of male patients. Other studies also found that denture stomatitis was observed more often in women than in men<sup>6,8,13,14,42</sup>. The hormonal factor and the great incidence of iron deficiency in women<sup>12,14</sup> as well as the fact that women seek dental treatment at a higher rate than men<sup>43</sup> have been suggested as

## 3.2 *Capítulo 2*

responsible for this greater incidence. With the regard of the risk factors, the mean age of dentures was greater than 10 years in both groups, with similar values. The age of dentures has been related to a higher occurrence of denture stomatitis<sup>14,42</sup>. Recently, it was verified that only 25% of individuals using dentures for less than one year were diagnosed with denture stomatitis, while more than 84% of those using dentures for more than 5 years had the disease<sup>42</sup>. When considering the other risk factors for denture stomatitis, a large percentage of patients complained of xerostomia and were non-smokers. Before the onset of the study, nocturnal wear of denture was observed for a large percentage of patients and at least 50% of them showed poor denture hygiene habits. Over the experimental period, all patients were instructed to scrub their dentures with coconut soap followed by toothpaste after every meal, and immerse the dentures in filtered water overnight. Although these recommendations may constitute a form of prevention of denture stomatitis, evidence from the study of Neppelenbroek et al.<sup>13</sup> indicated that scrubbing the dentures after every meal and immersing the dentures in filtered water overnight for 30 days had no effect on proportion of mycelial forms and cfu/mL of *Candida* from the palates and dentures of the patients with denture stomatitis. Further, it was shown that inflammation severity of their palatal mucosa was not improved. Since no statistical significant differences between the groups of study for the risk factors were found, their potential contribution in the development of denture stomatitis<sup>7,14,32,36,37</sup> was similar in both groups and, probably, had no influence on the outcomes.

No significant differences in the microbiological and clinical outcomes of treatments were revealed between the two groups of study. Thus, the hypothesis tested was accepted. In terms of reducing the *Candida* counts at the end of the treatments, both nystatin and microwave disinfection significantly reduced the values of cfu/mL from the palates and dentures. In addition, the cfu/mL of the palates and dentures remained lower than the baseline levels at day-30 of the follow up, regardless of treatments. These findings are in agreement with those from Webb et al.<sup>22</sup>, who verified that microwave disinfection of dentures in a daily basis during 1 week reduced the numbers of *Candida* on cultures from the

## 3.2 *Capítulo 2*

palates and dentures of patients with denture stomatitis. Treatment with nystatin for 14 days also decreased the amount of yeast colonies from the palates and dentures of the patients<sup>15</sup>. Combining microwave disinfection of complete dentures and topical use of nystatin<sup>12</sup> or miconazole<sup>13</sup> also reduced the cfu/mL values and the invasive form of *Candida* (pseudohyphae) from the palates and dentures.

The mechanisms of action of the treatments used in the present investigation are very different. Nystatin, a polyene antimycotic drug, inhibits the biosynthesis of ergosterol and creates pores in the fungal membrane<sup>44-46</sup>, thus affecting the integrity of the yeast cell wall, causing leakage of intracellular constituents<sup>46</sup>. These changes would not only reduce the ability of candidal adhesion to buccal epithelial cells<sup>45</sup> and denture acrylic surfaces<sup>44</sup>, but also suppress active budding and multiplication<sup>44,45</sup>. Further, nystatin can perturb germ tube formation<sup>47</sup>, modulate the cell surface hydrophobicity<sup>48</sup>, and suppress the proteolytic activity of *Candida*<sup>49</sup>. Unlike nystatin, microwave irradiation is a physical method for prosthesis disinfection and its lethal action is well established in the literature<sup>13,23-25</sup>. Although the mechanism of destruction is not completely understood, the lethal effects of such radiation has been attributed to a combination of effects. Some investigators stated that the extremely elevated internal temperatures produced by the vibration of water molecules of the microbial cells, when they are exposed to microwaves, is responsible for the changes in cell morphology and cell disintegration<sup>50</sup>. In addition, depending on the composition and volume of their surrounding medium, the cells may be selectively heated by microwave irradiation<sup>51</sup>. Others believe that non-thermal mechanisms are also involved<sup>51,52</sup> and that microwaves may cause a mechanical disruption of the cell wall, due to the oscillations of the cells in electromagnetic field<sup>52</sup>. A recent study also verified that microwave irradiation of *Candida* suspensions produced changes in structural integrity and permeability of cell membrane and cell metabolism, resulting in cell death<sup>53</sup>. Although both treatments were effective in reducing the colonization of the palates and dentures, microwave disinfection may provide further advantages over nystatin. Nystatin acts on the

### 3.2 *Capítulo 2*

oral mucosa, which is often less colonized than the dentures<sup>12,13,22</sup>. The multiple daily dosing regimen and unpleasant taste may have implications for compliance<sup>16</sup>. Further, the therapeutic concentration of nystatin can be reduced by the diluent effect of saliva and the cleansing action of the oral musculature, leading to failure of topical therapy<sup>12</sup>. While nystatin is fungicidal, investigations have demonstrated that microwave irradiation produces a broad, non-selective activity against several microorganisms, including several *Candida* spp.<sup>23-25</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>23,25</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>23,25</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>23</sup>, and *Escherichia coli*<sup>51</sup>. In spite of infection by *Candida* being considered the main etiologic factor of denture stomatitis, the presence of other microorganisms may also be secondarily involved in the pathogenesis of this lesion<sup>17,54-56</sup>. In denture stomatitis, the bacteria possibly favour the adhesion of blastospores (commensal) to the tissue surfaces of dentures by co-aggregation<sup>56</sup>. With fungal adhesion, there is an increase in microflora virulence by synergetic interaction, and the blastospores alter their morphology to mycelial, which results in damage to the epithelial cells and consequently, invasion of the buccal tissues<sup>56</sup>. This suggests that the treatment of denture stomatitis by means of microwave irradiation should simultaneously eliminate the mycelia *Candida* and inhibit bacterial growth in the tissue surfaces of dentures<sup>22</sup>. Finally, one of the most important advantages of microwave irradiation is, given that it is a physical method of disinfection, the emergence of resistant microorganisms would be avoided.

Similar to the findings obtained from non-compromised patients<sup>4,9,14,22</sup>, *C. albicans* was by far the predominant yeast isolated from the dentures and palates of the diabetics of this study. *C. albicans* is also the most commonly species isolated in diabetics<sup>4,6-8,10,11</sup>, in diabetics with denture stomatitis<sup>5,9</sup>, and in denture wearers, with or without denture stomatitis<sup>14,22</sup>. This species is the most virulent and pervasive of all the *Candida* spp.<sup>57</sup>, which is the reason for its pre-eminent position in the hierarchy of prevalence. As observed by other investigators<sup>5,6,8,10,11,14,22</sup>, in the current study, non-*albicans* species were also isolated from both, the palates and dentures, with *C. tropicalis* and *C. glabrata* being the most prevalent<sup>5,8,10,14,22</sup>. The pathogenicity of *C. tropicalis* and

### 3.2 *Capítulo 2*

*C. glabrata* cannot be underestimated, since these two non-*albicans* species have the ability to cause fungemia in humans and are associated with a higher mortality rate than *C. albicans*<sup>58,59</sup>. Therefore, more attention has to be paid to their appearance. Additional yeasts from the genus *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, and *Rhodotorula* were also detected, which is in agreement to other reports<sup>8,9,14</sup>. In the present study, 37.5% of patients had more than one species of yeast on their palates and dentures. The yeast associations noted in the present study were *C. albicans* together with either *C. tropicalis* and/or *C. glabrata*, confirming trends found at other institutions<sup>4,7,14,22</sup>. These findings demonstrated that these microorganisms were not only growing as single-species biofilms, but also as structured biofilm communities, in both the palates and dentures. This recalls the importance of biofilm development by different species of *Candida* in the pathogenesis of denture stomatitis, since it has the ability to increase resistance of yeasts to antimicrobial agents and immune challenge<sup>60</sup>, facilitating the onset of the infection. It is important to emphasize that both treatments reduced significantly the density of colonization of the palates and dentures, showing that MW and NYS are effective against biofilms of *Candida* spp., including the intrinsically resistant *C. glabrata* and *C. krusei* identified here.

The frequencies distributions of *C. albicans* and *C. tropicalis* isolated from the dentures were significantly higher than those obtained from the palates, and significantly higher yeast-negative samples were collected from the palates. These results are consistent with those of the cfu/mL assay, which showed that the palatal cultures exhibited, under all conditions, lower cfu/mL than the denture cultures. This difference has also been reported by others<sup>12,13,22</sup> and can be partially attributed to the sample technique (swab sampling) employed in the present study<sup>4,13,17,22,25</sup>. A recent study, which evaluated the cellular interactions of the yeast-epithelial interphase using a reconstituted human oral epithelium model, verified that *C. albicans* yeasts can invade the tissue through the hyphal penetration into the superficial epithelium together with features of cellular internalization of yeasts<sup>61</sup>. Thus, it can be supposed that swabbing of the palatal mucosa using a delicate cotton swab may not have removed all *Candida* cells.

### 3.2 *Capítulo 2*

Hence, as for oral rinse technique, that has also been used for sampling of the mouth for *Candida*<sup>6,8</sup>, this technique may be limited in providing precise quantitative information from palatal mucosa. Virulence factors of *Candida* spp. that enhance their adherence potential on acrylic surfaces (cell-surface hydrophobicity<sup>62</sup> and ability to form biofilm<sup>60</sup>) can also be suggested as a contributing factor for the colony count difference between the palates and dentures. Despite this difference, mucosal infection in denture stomatitis has been mainly associated with the proliferation of mycelial forms of *Candida* on the tissue surfaces of removable dentures<sup>12,13</sup>, reinforcing that the inactivation of the biofilms attached to the denture surfaces is essential to prevent and treat this disease.

When assessed by clinical scoring, both treatments were considered successful in treating denture stomatitis from diabetic patients. At least 50% showed an improvement in infection score from the end of treatments (day-14) to day-60 and a consistently high percentage of patients (40%) were cured at the end of treatments. These results agree with previous studies which reported that the erythema surface of the palatal mucosa was significantly reduced in non-compromised patients after treatments with nystatin<sup>15</sup> and microwave irradiation<sup>12,13,22</sup>. Despite the high rates of cure and improvement of infection, at the end of the follow up (day-90), some patients from both NYS (40%) and MW (55%) groups showed a recurrence of the clinical signs of denture stomatitis. One may ask whether the practitioner should use both microwave and nystatin regimen to enhance the therapeutic efficacy, regardless the risks of using antimycotic medications. However, this seems to be unlikely, since a recurrence rate of 56% was reported by Banting and Hill when microwave disinfection of complete dentures and the use of topical nystatin were combined<sup>12</sup>. Likewise, another investigation reported a 40% recurrence rate when denture microwave disinfection was combined with topical miconazole<sup>13</sup>. It is also important to emphasize that the density of colonization does not necessarily correlate with clinical candidiasis<sup>6,8,11</sup>. In fact, although in this study the mean number of yeast colonies cultured from palates and dentures at day-90 was similar to that at admission, at least 20% of all

### 3.2 *Capítulo 2*

patients had no clinical signs of denture stomatitis. Since the present investigation did not assess the presence of invasive form (mycelial) of *Candida*, which is an indicative of infection, the positive samples in cured patients may be related to non-invasive forms (blastospore) of *Candida* grown on culture medium<sup>12</sup>. There are some explanations for why the clinical and antimycotic effects of nystatin and microwave disinfection were temporary. Reinfection may have occurred via supply of new organisms from exogenous sources<sup>17</sup>. Also, a significant proportion of patients harbor an abundance of yeasts in the oral cavity, even in the absence of clinical signs of infection<sup>6,8,11</sup>, which may lead to re-contamination of the dentures and re-infestation of the adjacent soft tissue.

Due to the increasing resistance<sup>19-21</sup>, the limited power of action<sup>12,13,16</sup>, and the toxicity<sup>18</sup> of some antifungal drugs, new alternatives in the treatment of denture stomatitis are welcome. The present study demonstrated that microwave disinfection of complete dentures, by itself, was as effective as nystatin, the more conventional topical antifungal medication, in reducing the *Candida* counts and the clinical signs of the infection in well-controlled type 2 diabetic patients. Besides being effective, denture microwave irradiation is simple, fast, safe, and inexpensive, since requires only a domestic microwave oven and water. The potential relevance of these results to the large population of the poorly-controlled diabetics remains unknown. The systemic and local predisposing factors found in diabetics without an adequate metabolic control might promote an increase in the number of microorganisms and hence the risk of oral candidiasis. Many studies have shown that diabetics are more susceptible to fungal infections<sup>4</sup> and *Candida* colonization<sup>4-9</sup> than non-diabetics, and that an inadequately controlled diabetes is related to a higher colonization of *Candida*<sup>7</sup> and to a more severe degree of denture stomatitis<sup>5</sup>. The well-controlled type 2 diabetic patients from the present investigation responded well to both treatments, with outcomes comparable to those expected in non-compromised patients<sup>12,13,15,16,22</sup>. This corroborates with the observations of Richardson et al.<sup>63</sup> that a good metabolic control can guide the diabetic individual to a life without or with fewer disease-related complications. Moreover, the results also suggested that when a good



## 3.2 Capítulo 2

metabolic control is established, then the diabetic patient may be treated using the same methods used for non-diabetic individuals. Therefore, general health care of diabetics should receive increasing recognition for its importance in the treatment of denture stomatitis. This disease is one of the most frequent opportunistic infections found in denture wearer diabetic patients and it may extend regionally and result in a systemic infection that is associated with high mortality rates<sup>58,59</sup>. Hence, the prevention of colonization of the oropharynx, even in well-controlled diabetics, is also critically important in preventing systemic infections due to *Candida* and, consequently, the disease-related complications commonly associated with diabetes mellitus. Given all of the above, it is imperative that health professionals, including dentists and physicians, aggressively manage the oral health and the diabetes of these individuals, thus providing a better quality of life.

### Conclusions

1. Both microwave disinfection and nystatin treatments significantly reduced the cfu/mL from the palates and dentures at day-14 and day-30 and were considered successful in reducing the clinical signs of denture stomatitis.
2. Microwave disinfection of complete upper dentures was as effective as nystatin on the treatment of well-controlled diabetic patients with denture stomatitis.
3. *C. albicans* was the most predominant species isolated from well-controlled diabetic patients with denture stomatitis, followed by *C. tropicalis* and *C. glabrata*.
4. The frequencies distributions of *C. albicans* and *C. tropicalis* isolated from the dentures were significant higher than those obtained from the palates.

### Acknowledgments

This work was supported by FAPESP - São Paulo Research Foundation (Grants: 2006/02842-5 and 2007/03895-8) and CNPq - National Council of Scientific and Technological Development (Grant 470337/2007-9).

## 3.2 *Capítulo 2*

### Figures Legends

Figure 1. Palatal mucosa of a patient from NYS group at baseline (A), day-14 (B), day-30 (C), day-60 (D), and day-90 (E).

Figure 2. Palatal mucosa of a patient from MW group at baseline (A), day-14 (B), day-30 (C), day-60 (D), and day-90 (E).

Figure 3. Percentage (%) of NYS patients scored according to Newton's criteria<sup>34</sup> for denture stomatitis.

Figure 4. Percentage (%) of MW patients scored according to Newton's criteria<sup>34</sup> for denture stomatitis.

### References

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-1431.
2. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation Geneva: WHO 1999.
3. Vasconcelos BC, Novaes M, Sandrini FA, Maranhão Filho AW, Coimbra LS. Prevalence of oral mucosa lesions in diabetic patients: a preliminary study. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008;74:423-428.
4. Belazi M, Velegraki A, Fleva A, Gidarakou I, Papanau L, Baka D, et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses* 2005;48:192-196.
5. Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jørgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;90:81-86.

### 3.2 *Capítulo 2*

6. Gonçalves RH, Miranda ET, Zaia JE, Giannini MJ. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients. *Mycopathologia* 2006;162:83-89.
7. Kadir T, Pisiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbuker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil* 2002;29:452-457.
8. Khosravi AR, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. *J Mycol Med* 2008;18:83-88.
9. Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP, Pereira LJ. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. *Mycopathologia* 2010;169:215-223.
10. Fisher BM, Lamey PJ, Samaranyake LP, MacFarlane TW, Frier BM. Carriage of *Candida* species in the oral cavity in diabetic patients: relationship to glycaemic control. *J Oral Pathol* 1987;16:282-284.
11. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:181-185.
12. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist* 2001;21:4-8.
13. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil* 2008;35:836-846.
14. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil* 2007;34:448-455.
15. Bergendal T, Isacsson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res* 1980;88:446-454.

### 3.2 *Capítulo 2*

16. Blomgren J, Berggren U, Jontell M. Fluconazole versus nystatin in the treatment of oral candidosis. *Acta Odontol Scand* 1998;56:202-205.
17. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent* 1994;72:283-288.
18. Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1993;2:17-22.
19. Goldman GH, Ferreira MES, Marques ER, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infec Dis* 2004;50:25-32.
20. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998;85:558-564.
21. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol* 2002;40:3135-3139.
22. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology* 2005;22:168-176.
23. 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;18:611-617.
24. Sanitá PV, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Machado AL. Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses* 2009;52:154-160.
25. 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;37:666-672.
26. Ribeiro DG, Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Flexural strength and hardness of relined and denture base acrylic resins after

### 3.2 *Capítulo 2*

different exposure times of microwave disinfection. *Quintessence Int* 2008;39:833-840.

27. Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. *J Prosthet Dent* 2005;93:483-487.

28. Basso MF, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Compagnoni MA. Influence of microwave disinfection on the linear dimensional stability of complete dentures: a clinical study. *Int J Prosthodont* 2010;23:318-320.

29. Novais PM, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Jorge JH. The occurrence of porosity in reline acrylic resins. Effect of microwave disinfection. *Gerodontology* 2009;26:65-71.

30. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988;318:1315-1321.

31. Farman AG, Nutt G. Oral *Candida*, debilitating disease and atrophic lesions of the tongue. *J Biol Buccale* 1976;4:203-226.

32. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med* 2006;23:455-459.

33. Wilson RM, Reeves WG. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. *Clin Exp Immunol* 1986;63:478-484.

34. Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *Br Dent J* 1962;112:357-360.

35. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2007. *Diabetes Care* 2007;30(suppl 1):S4-S41.

36. Arendorf TM, Walker DM, Kingdom RJ, Roll JR, Newcombe RG. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leukoplakia. *Br Dent J* 1983;155:340-343.

37. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002;29:1115-1119.

### 3.2 *Capítulo 2*

38. Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:85-86.
39. Coe R. It's the Effect Size, Stupid? What effect size is and why it is important? Paper presented at the Annual Conference of the British Educational Research Association, University of Exeter, England, 12-14 September 2002 - <http://www.leeds.ac.uk/educol/documents/00002182.htm>
40. Landis JR and Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-174.
41. Kendall MG. Rank Correlation Methods. Griffin: London, 1970.
42. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol* 2011;49:208-211.
43. Dorey JL, Blasberg B, MacEntee MI, Conklin RJ. Oral mucosal disorders in denture wearers. *J Prosthet Dent* 1985;53:210-213.
44. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol* 1998;43:999-1007.
45. Ellepola AN, Panagoda GJ, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:358-363.
46. Surarit R, Shepherd MG. The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1987;25:403-413.
47. Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. *J Oral Pathol Med* 1998;27:213-219.
48. Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *Arch Oral Biol* 1998;43:879-887.

### 3.2 *Capítulo 2*

49. Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol* 1996;44:311-316.
50. Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios* 1994;78:55-59.
51. Watanabe K, Kakita Y, Kashige N, Miake F, Tsukiji T. Effect of ionic strength on the inactivation of microorganisms by microwave irradiation. *Lett Appl Microbiol* 2000;31:52-56.
52. Carrol DE, Lopez A. Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems. *J Food Sci* 1969;34:320-324.
53. Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DMP. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses* 2007;50:140-147.
54. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:E27–E39.
55. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:345-351.
56. Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anticandidal chalcones. *Aust Dent J* 1997;42:343-346.
57. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001;9:327-335.
58. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:281-286.

## 3.2 *Capítulo 2*

59. Meunier-Carpentier F, Kiehn TE, Armstrong D. Fungemia in the immunocompromised host. Changing patterns, antigenemia, high mortality. *Am J Med* 1981;71:363-370.
60. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 2001;80:903-908.
61. Jayatilake JA, Samaranayake YH, Samaranayake LP. An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 2005;34:240-246.
62. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun* 1985;50:97-101.
- Richardson A, Adner N, Nordström G. Persons with insulin-dependent diabetes mellitus: acceptance and coping ability. *J Adv Nurs* 2001;33:758-763

### Tables

Table 1. Summary of recommendations for adults with diabetes mellitus<sup>35</sup>

Test	Goal value
Fasting blood glucose level	90 – 130 mg/dL
Postprandial plasma glucose	< 180 mg/dL
Glycosylated haemoglobin level	< 7%
Serum lipids:	
- LDL	< 100 mg/dL
- Triglycerides	< 150 mg/dL
- HDL	> 40 mg/dL
Serum creatinine	0.4 – 1.3 mg/dL
Urine:	
- Protein	Absent
- Glucose	Absent
- Nitrite	Absent
- Leukocytes	< 10 units / mm <sup>3</sup>



3.2 *Capítulo 2*

Table 2. Demographic characteristics and risk factors

	Demographic characteristics		Risk factors				
	Mean age (years-old)	Gender (% of female)	Mean age of dentures (years-old)	% of patients with xerostomia	% of non-smokers	% of patients with nocturnal wear of dentures	% of patients with poor hygiene habits
<b>NYS</b>	62.6	85	13.1	60	85	80	55
<b>MW</b>	62.2	90	14.3	75	90	75	50
<b>p-value</b>	0.870*	>0.999**	0.370***	0.500**	>0.999**	>0.999**	0.763**

\*Student's T test; \*\*Fisher's exact test; \*\*\* Wilcoxon's signed rank test

Table 3. Mean values and standard deviation of *Candida* colony counts in log<sub>10</sub>cfu/mL from the palates and dentures following treatments

Group	Location	Period					Effect size
		Baseline	day-14	day-30	day-60	day-90	
<b>NYS</b>	Palate	1.21 (1.33)	0.30 (0.75)*	0.37 (0.76)*	0.59 (0.83)	0.85 (1.12)	0.98
	Denture	4.38 (1.04)	1.59 (1.86)*	2.91 (1.08)*	3.27 (1.54)	3.34 (1.81)	2.85
<b>MW</b>	Palate	0.99 (1.17)	0.59 (1.08)*	0.58 (1.09)*	0.98 (1.16)	1.26 (1.14)	0.48
	Denture	3.80 (0.86)	1.45 (1.69)*	2.62 (1.96)*	3.56 (1.85)	3.67 (1.87)	2.12

\*Significant different from baseline by Tukey's post hoc test ( $p < 0.05$ )

### 3.2 Capítulo 2

Table 4. ANOVA using a random effects statistical model for mean values of  $\log_{10} \text{ufc/mL}$  from the palates and dentures

		GL num	GL denom	F-value	p-value
<b>Palates</b>	<b>(Intercept)</b>	1	156.0000	56.8789	0.0000
	<b>Period of time</b>	4	156.0000	3.6765	0.0069*
	<b>Treatment</b>	1	38.0000	0.7600	0.3888
<b>Dentures</b>	<b>(Intercept)</b>	1	156.0000	647.5690	0.0000
	<b>Period of time</b>	4	156.0000	21.9381	0.0000*
	<b>Treatment</b>	1	38.0000	1.3351	0.2551

\*Significant differences at  $p < 0.05$

Table 5. Frequency distribution (%) of different species identified in the palates and dentures

	Palatal mucosa	Denture surface
<i>C. albicans</i>	43 <sup>a</sup>	75.5 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i>	2 <sup>b</sup>	13.5 <sup>bc</sup>
<i>C. glabrata</i>	4.5 <sup>bc</sup>	6 <sup>b</sup>
<b>Other</b>	8.5 <sup>c</sup>	11.5 <sup>bc</sup>
<b>Yeast-negative samples</b>	53 <sup>a</sup>	20 <sup>c</sup>

Horizontal bars connect values that were not significantly different ( $p > 0.05$ )

Vertically, values designated with the same superscript were not significantly different ( $p > 0.05$ )

\*Other *Candida* species and yeasts from the genus *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, and *Rhodotorula*

3.2 *Capítulo 2*

Table 6. Percentage of patients allocated to each category in each period, for both groups

Period of time*	Category	Group		<i>p</i> -value**
		NYS	MW	
<b>day-14 – baseline</b>	+	40	25	0.8182
	++	20	15	
	+++	0	5	
	<i>No</i>	40	40	
	–	0	15	
	--	0	0	
<b>day-30 – baseline</b>	+	45	20	1.0000
	++	5	30	
	+++	0	0	
	<i>No</i>	45	25	
	–	5	25	
	--	0	0	
<b>day-60 – baseline</b>	+	45	35	0.4394
	++	5	20	
	+++	0	5	
	<i>No</i>	50	20	
	–	0	15	
	--	0	5	
<b>day-90 – baseline</b>	+	45	5	0.6667
	++	5	20	
	+++	0	5	
	<i>No</i>	40	55	
	–	10	10	
	--	0	5	

\*The degree of severity of the infection scored on each period (day-14; day-30; day-60; and day-90) was compared to that scored at baseline; \*\* Mann-Whitney test

### 3.2 Capitulo 2

Table 7. Percentage of patients cured and with recurrence, for both groups

Group	CURE				RECURRENCE
	Period				Period*
	day-14	day-30	day-60	day-90	day-90 – day-60/30/14
NYS	40	20	20	20	40
MW	40	30	30	25	55
<b>p-value</b>	0.4815	0.4079	0.6548	0.820	0.5273

\*The degree of severity of the infection scored at day-90 in relation to day-14, day-30 or day-60

#### Figures



Figure 1. Palatal mucosa of a patient from NYS group at baseline (A), day-14 (B), day-30 (C), day-60 (D), and day-90 (E).

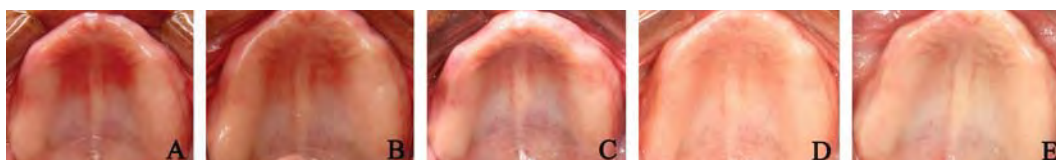


Figure 2. Palatal mucosa of a patient from MW group at baseline (A), day-14 (B), day-30 (C), day-60 (D), and day-90 (E).

### 3.2 Capitulo 2

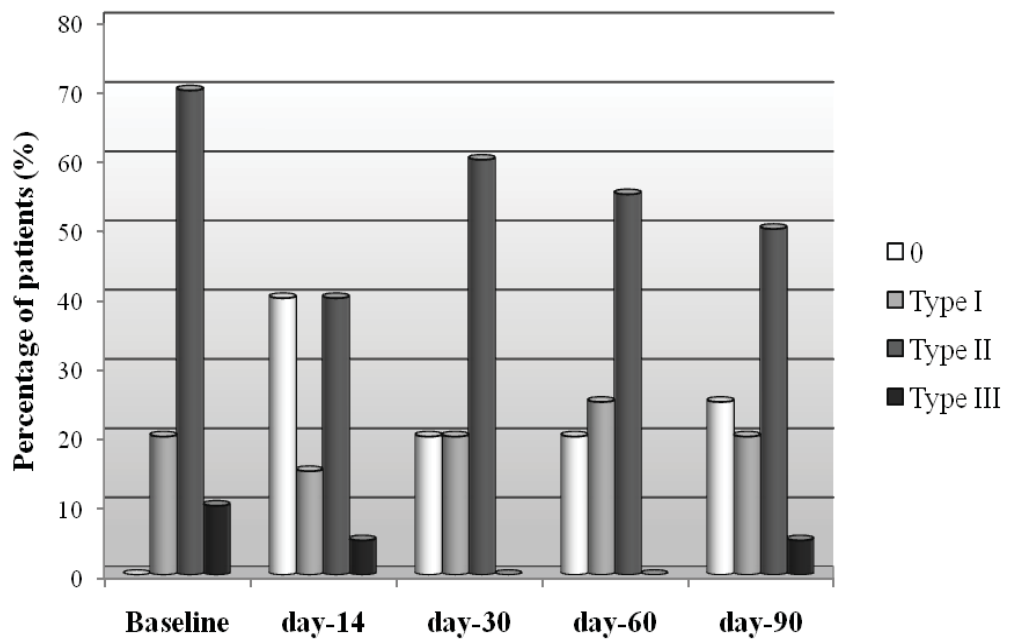


Figure 3. Percentage (%) of NYS patients scored according to Newton's criteria<sup>34</sup> for denture stomatitis.

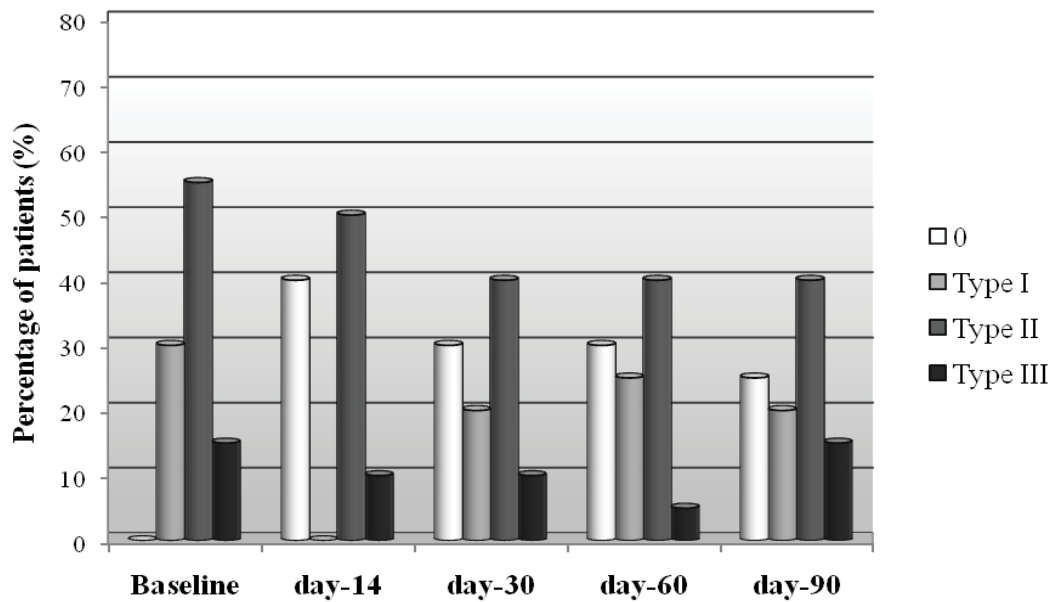


Figure 4. Percentage (%) of MW patients scored according to Newton's criteria<sup>34</sup> for denture stomatitis.



## *4 Discussão*

## *4 Discussão*

Na amostra do presente estudo, foram incluídos pacientes portadores de prótese total, sendo diabéticos e não-diabéticos, com mucosa oral saudável ou portadores de estomatite protética. De forma geral, a média de idade dos pacientes foi de 62 anos no momento da avaliação inicial, o que está de acordo com investigações prévias<sup>31,44,69</sup>. Tem sido observada uma maior prevalência de estomatite protética entre a sexta e a sétima décadas de vida, em razão do elevado número de usuários de próteses removíveis parciais e totais<sup>10,50,69</sup>. Foi observada, ainda, na amostra deste estudo, uma maior porcentagem de pacientes do sexo feminino, conforme verificado em estudos anteriores<sup>39,44,50,69,80,100</sup>. Não há ainda um consenso na literatura para explicar porque várias lesões bucais, incluindo a estomatite protética, são mais frequentes em mulheres do que em homens. No entanto, alterações hormonais, principalmente no período após a menopausa<sup>16,39</sup>, e a deficiência de ferro frequentemente encontrada nas mulheres<sup>16,39</sup>, que favorece o desenvolvimento de micro-organismos oportunistas, podem contribuir para a elevada prevalência de estomatite protética entre pacientes do sexo feminino. Além disso, essa diferença demográfica tem sido atribuída ao fato de as mulheres recorrerem mais assiduamente aos tratamentos odontológicos do que os homens<sup>29</sup>.

Com relação aos fatores considerados de risco para o aparecimento da estomatite protética, foram verificadas médias de idade das próteses totais em torno de 4,5 anos entre os pacientes sem estomatite protética e superior a 10 anos entre os diabéticos e não-diabéticos com estomatite protética. A idade das próteses totais tem sido relacionada à ocorrência da estomatite protética<sup>15,39,100</sup>. Um estudo recente verificou que apenas 25% dos indivíduos utilizando as mesmas próteses totais há menos de um ano foram diagnosticados com estomatite protética, enquanto que mais de 84% daqueles com a mesma prótese total há mais de cinco anos apresentavam a infecção<sup>100</sup>. Geralmente, próteses antigas apresentam suporte, estabilidade e retenção insatisfatórios,

#### 4 *Discussão*

resultando em trauma no tecido adjacente e favorecendo ainda mais o desenvolvimento da estomatite protética<sup>39</sup>. Além disso, a limpeza das próteses mais antigas é dificultada pela maior quantidade de porosidade na resina da base da prótese, o que também favorece a adesão e a colonização de *Candida*<sup>15</sup>. Assim, é provável que os pacientes com estomatite protética estivessem mais susceptíveis à infecção devido à elevada idade de suas próteses totais. Da mesma forma, o tabagismo tem sido considerado outro fator de risco local importante na etiologia da candidose oral<sup>6,41</sup>. Este hábito, associado à fricção das próteses removíveis sobre os tecidos de suporte, alteram a permeabilidade da superfície da mucosa, facilitando a contaminação por *Candida spp*<sup>6</sup>. A presença de xerostomia também foi avaliada entre os pacientes da amostra<sup>49,77,92</sup>, visto que a saliva é essencial para a manutenção da saúde orofaríngea<sup>14,87</sup>. No presente estudo, a porcentagem de pacientes não-fumantes foi elevada e a maioria dos pacientes diabéticos apresentou queixa de xerostomia. No entanto, não foram verificadas diferenças significantes entre os diferentes grupos de estudo obtidos. Assim, estes fatores de risco não interferiram nos resultados obtidos.

Este estudo comparou a prevalência das diferentes espécies de *Candida* isoladas dos pacientes diabéticos com aquela de não diabéticos com/sem estomatite protética. A *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada, identificada em 81,9% dos 210 pacientes. Este resultado está de acordo com relatos de outros autores<sup>10,22,26,30,31,39,40,44,49,50,56,60,61,67,76,93,96</sup>. Esta espécie apresenta vários fatores de virulência que contribuem para sua elevada patogenicidade e prevalência<sup>17</sup>. A *C. albicans* apresenta elevada capacidade de adesão à mucosa bucal<sup>37</sup> e, principalmente, à superfície das resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses removíveis<sup>8,22,34,93</sup>. O processo de adesão é considerado fundamental para a ocorrência da estomatite protética nos usuários de próteses. Este patógeno bucal também produz enzimas hidrolíticas, denominadas fosfolipase e proteinase, que atacam e degradam substratos e fosfolipídios comuns em todas as membranas celulares<sup>17,58,76</sup>. A *C. albicans* apresenta, ainda, capacidade de se desenvolver em uma variedade de formas morfológicas (polimorfismo celular), que variam desde células leveduriformes (blastóporos) comensais até células multicelulares



#### 4 *Discussão*

alongadas, em forma de tubo, denominadas pseudohifas ou hifas, responsáveis pela infecção<sup>90</sup>. Outro fator de virulência que favorece a elevada prevalência da *C. albicans* é sua habilidade de se desenvolver na forma de biofilme, que consiste em uma comunidade complexa de células microbianas embebidas em uma matriz extracelular de polissacarídeos<sup>21,32</sup>. Quando as células se organizam em biofilme, elas apresentam propriedades fenotípicas distintas em relação à forma planctônica e maior resistência aos agentes antimicrobianos<sup>21,32</sup>.

Apesar de a *C. albicans* ser a espécie mais comumente encontrada, tem sido verificado um aumento crescente na presença de espécies não-*albicans*<sup>22,31,39,40,44,50,60,93,96</sup>. No presente estudo, espécies não-*albicans* foram isoladas de pacientes diabéticos e não-diabéticos, com/sem estomatite protética. As seguintes espécies foram identificadas: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitane*, *C. famata*, *C. zeylanoides*, *C. colliculosa*, *C. pelliculosa*, *C. sake*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii* e *C. utilis*. No entanto, as mais comuns foram *C. tropicalis* (15,71%) e *C. glabrata* (15,24%). Esses resultados são semelhantes aos relatados em outros estudos, em que foi verificado que a *C. tropicalis* e a *C. glabrata* são as espécies não-*albicans* mais frequentemente identificadas em diabéticos<sup>30,31,40,41,50,56</sup> e não-diabéticos<sup>22,39,61,80,93,96</sup>. No presente estudo, não foram identificadas diferenças significantes entre as prevalências de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. No entanto, a porcentagem de distribuição destas espécies tem variado em diferentes estudos<sup>22,30,40,41,56,61,80,93,96</sup>. No estudo de Resende et al.<sup>80</sup>, 20% dos isolados identificados foram de *C. tropicalis*, enquanto a *C. glabrata* representou 9,33% dos isolados. Vanden Abbeele et al.<sup>93</sup> demonstraram que a *C. glabrata* e a *C. tropicalis* foram isoladas, respectivamente, de 44,1% e 19,1% dos indivíduos. Estas diferenças podem estar relacionadas à combinação de alguns fatores referentes às metodologias dos estudos, como técnica de coleta aplicada<sup>22,44,50,56,61,80,93,96</sup> e meios de cultura utilizados nos procedimentos de identificação<sup>4,74</sup>. Alguns autores utilizaram em seus estudos a técnica de coleta com bochechos orais<sup>22,44,50</sup>. Apesar de esta técnica proporcionar informações qualitativas adequadas da microbiota oral, é questionável se as células aderentes do biofilme microbiano são completamente removidas ou se

#### 4 *Discussão*

apenas aquelas localizadas na sua periferia se descolam durante o bocheho. Assim, para que informações quantitativas da microbiota oral fossem obtidas no presente estudo, a técnica utilizada para coleta da mucosa palatina e da superfície interna da prótese total foi a de swab oral<sup>22,56,61,93</sup>. No presente estudo, o meio de cultura CHROMagar foi utilizado para os procedimentos de identificação<sup>10,22,50,56,61,93</sup>. Este meio de cultura fornece informações relativas às características morfológicas e cromogênicas das diversas espécies de *Candida* e, por isso, tem sido considerado mais sensível do que outros meios para detectar diferentes espécies<sup>74</sup>.

Além dos fatores relacionados à metodologia do presente estudo, tem sido verificada uma grande variação epidemiológica entre *Candida* spp. nas diferentes regiões do mundo<sup>24,75</sup>. Tem sido verificado que a *C. tropicalis* é uma das espécies não-*albicans* mais comumente isoladas no Brasil e na América do Sul<sup>23-25,42,75</sup>, enquanto que *C. glabrata* apresenta maior prevalência na América do Norte<sup>24,75</sup>. Independentemente da variação epidemiológica, é importante enfatizar que, quando importantes fatores de virulência são considerados, a *C. tropicalis* e a *C. glabrata* são, em geral, menos virulentas que a *C. albicans*<sup>17,52,59,65,76</sup>. No entanto, essas espécies apresentam a habilidade de causar infecções fúngicas sistêmicas severas em humanos<sup>42,63,98</sup> e têm sido associadas a taxas de mortalidade maiores do que aquelas apresentadas pela *C. albicans*<sup>25,42,63</sup>. Assim, sua patogenicidade não deve ser subestimada e mais atenção deve ser direcionada ao seu envolvimento com as infecções.

Nas últimas décadas, além do aumento da presença de espécies não-*albicans* de *Candida* em indivíduos com diagnóstico de estomatite protética, tem sido verificada a associação entre diferentes espécies<sup>10,39,93,96</sup>. No presente estudo, as associações mais comumente identificadas foram *C. albicans* + *C. tropicalis*, *C. albicans* + *C. glabrata* e *C. albicans* + *C. tropicalis* + *C. glabrata*. Estas associações de espécies também foram identificadas por outros autores<sup>10,39,40,49,93,96</sup>. Estes resultados demonstram que esses micro-organismos se desenvolvem tanto na forma de biofilmes simples quanto como comunidades mistas estruturadas. Este fator favorece a patogênese da *Candida*, pois aumenta

#### 4 *Discussão*

sua resistência aos agentes antimicrobianos e à resposta do hospedeiro<sup>7,21,32,62,78,78</sup>, facilitando o aparecimento da infecção. As interações complexas entre essas três espécies de *Candida* não estão completamente definidas. No entanto, no presente estudo, a presença de populações mistas de *Candida* spp. nos pacientes não-diabéticos com mucosa oral saudável (14%) foi significativamente inferior àquela verificada nos pacientes com estomatite protética (32,5%). Esta diferença foi ainda maior quando foram considerados apenas os diabéticos portadores de estomatite protética (37,5%). Esses resultados sugerem que, provavelmente, exista uma relação sinérgica envolvida com a elevada patogenicidade destas combinações, o que facilita o início da infecção.

Neste estudo in vivo foi verificado, ainda, que não houve diferenças significantes na prevalência de *Candida* spp. entre os pacientes portadores de estomatite protética, com ou sem diabetes. Resultados contrastantes foram verificados em outros estudos, quando os diabéticos foram relacionados a uma maior prevalência de *Candida* spp.<sup>10,26,30,49,50,56</sup> Entretanto, é importante relatar que, nestes estudos, foram incluídos pacientes diabéticos não-controlados (pacientes com valores de hemoglobina glicosilada e glicose em jejum superiores a 7% ou 130 mg/dL, respectivamente)<sup>26,30,56</sup> ou o grau de controle do diabetes não foi informado<sup>10,49,50</sup>. No presente estudo, apenas pacientes diabéticos controlados foram incluídos, o que pode ter influenciado nos resultados. Dessa maneira, todos os indivíduos portadores de estomatite protética foram agrupados e a distribuição de *Candida* spp. foi avaliada com relação à severidade da infecção. Foi verificado que a prevalência de *C. tropicalis* foi significativamente superior nos pacientes com grau mais severo de inflamação (grau III de Newton). Estes resultados, combinados com a maior frequência desta espécie verificada nos pacientes com estomatite protética, sugerem que a *C. tropicalis* pode estar envolvida com a progressão da estomatite protética. Apesar de a razão desta superior prevalência não estar totalmente estabelecida, esses resultados poderiam ser atribuídos a alguns fatores de virulência deste micro-organismo. Diferentes cepas de *C. tropicalis* têm demonstrado elevados valores de hidrofobicidade celular, fator envolvido na capacidade de aderência dos micro-organismos<sup>52,65</sup>. Além disso, tem

#### 4 *Discussão*

sido verificado que cepas de *C. tropicalis* isoladas de pacientes usuários de próteses totais e portadores de estomatite protética apresentam maior capacidade de adesão às células epiteliais do que cepas isoladas de pacientes sem a infecção<sup>59</sup>. Outro importante fator de virulência desta espécie é a sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, como fosfolipase<sup>67</sup> e proteinase<sup>67,76</sup>, que estão diretamente relacionadas à invasão e destruição teciduais<sup>17,58</sup>. A habilidade da *C. tropicalis* de se desenvolver em biofilmes sobre diferentes superfícies<sup>26,73</sup> é outro importante fator relacionado ao aumento da resistência antifúngica<sup>21,78,79</sup>. A virulência desta espécie de *Candida* tem sido demonstrada em estudos clínicos, visto que o potencial de disseminação e as taxas de mortalidade associados à *C. tropicalis* são superiores àqueles verificados para a *C. albicans* e outras espécies<sup>23,25,42,63,98</sup>. Apesar de estes fatores explicarem parcialmente os resultados obtidos, outros estudos são necessários para o melhor entendimento do mecanismo de patogenicidade desta espécie de *Candida*.

A irradiação de próteses totais em micro-ondas, método físico de desinfecção, tem demonstrado ser capaz de inativar várias espécies microbianas<sup>33,64,86,88</sup> e, por isso, tem sido considerada como uma opção de tratamento para estomatite protética<sup>8,69,96</sup>. No presente estudo, não foram verificadas diferenças significantes na efetividade microbiológica e na clínica deste método de tratamento em comparação ao antifúngico tópico nistatina. Ambos os métodos de tratamento reduziram significativamente os valores de ufc/mL, tanto para as coletas da mucosa palatina quanto para as da prótese total, ao final dos tratamentos. Além disso, estes valores de ufc/mL permaneceram reduzidos até o dia 30 do controle posterior, independentemente do tratamento instituído. Os resultados do presente estudo são compatíveis com os de outros estudos clínicos<sup>8,69,96</sup>. Webb et al.<sup>96</sup> demonstraram que a desinfecção diária de próteses totais por micro-ondas, durante uma semana, reduziu significativamente os valores de *Candida* nas próteses totais e no palato de pacientes com diagnóstico de estomatite protética. O tratamento com antifúngico tópico nistatina também se mostrou efetivo na redução da colonização de *Candida* da mucosa palatina e da prótese de pacientes com estomatite protética<sup>11</sup>. Além disso, estudos

#### 4 *Discussão*

que associaram a irradiação de próteses totais por micro-ondas à utilização de nistatina<sup>8</sup> ou miconazol<sup>69</sup> para o tratamento da estomatite protética demonstraram resultados favoráveis.

A ação antimicrobiana de ambos os tratamentos instituídos ocorre de maneiras distintas. O efeito antifúngico da nistatina, substância pertencente ao grupo dos polienos, se relaciona à inibição da síntese do ergosterol, um esterol presente na membrana plasmática da célula fúngica importante para a manutenção da sua integridade e para diversas funções celulares<sup>34,37,91</sup>. Assim, quando presente em concentração suficiente, a nistatina provoca a formação de poros na membrana celular dos fungos, sobretudo do gênero *Candida*, alterando sua permeabilidade e levando à perda de componentes intra-celulares<sup>91</sup>. Essa alteração, em estudos in vitro, reduziu tanto a capacidade de adesão da *Candida* às células epiteliais da cavidade oral<sup>37</sup> e às superfícies das resinas acrílicas<sup>34</sup> quanto o crescimento e multiplicação das células fúngicas<sup>34,37</sup>. Além disso, a nistatina apresenta a capacidade de alterar a formação de tubo germinativo<sup>35</sup>, de modular a hidrofocidade celular<sup>36</sup> e de reduzir a atividade enzimática proteolítica da *Candida*<sup>99</sup>. Contrariamente à nistatina, a irradiação por micro-ondas é um método físico de desinfecção e sua ação letal tem sido relatada na literatura<sup>33,64,69,82,86,88</sup>. Os mecanismos pelos quais as micro-ondas promovem a inativação dos micro-organismos parecem estar relacionados a uma combinação de efeitos. Alguns autores<sup>20,46,72,84</sup> atribuem o efeito letal da irradiação ao calor gerado pelas micro-ondas (efeitos térmicos). Entretanto, efeitos não-térmicos também têm sido sugeridos para explicar a ação letal das micro-ondas sobre a atividade metabólica dos diferentes micro-organismos<sup>20,46,72,84,95</sup>. Rosaspina et al.<sup>84</sup> demonstraram que as micro-ondas promoveram alterações nos micro-organismos que levaram à completa destruição das células ao final da irradiação. De acordo com esses autores, quando as micro-ondas entram em contato com materiais contendo água, como as células microbianas, este líquido poderia absorver a radiação, fazendo as células vibrarem intensamente, levando a um aumento de sua energia interna<sup>84</sup>. Tem sido sugerido que, dependendo do meio circundante dos micro-organismos e da concentração dos compostos iônicos presentes no citoplasma celular, algumas

#### 4 *Discussão*

células poderiam ser aquecidas seletivamente pelas micro-ondas, gerando no seu interior uma temperatura maior que no meio circundante<sup>72,95</sup>. Além disso, a energia gerada pelas micro-ondas poderia causar uma oscilação muito rápida da célula microbiana, superando o limite elástico da estrutura celular, causando a sua ruptura<sup>20</sup>. Independente do mecanismo de ação, como resultado da irradiação, alterações morfológicas ocorreriam nas células, com sua consequente inativação. De fato, foi observado que a irradiação por micro-ondas de suspensões de *C. albicans* produziu alterações na integridade estrutural das células, modificando a permeabilidade da membrana celular e seu metabolismo, resultando em morte celular<sup>19</sup>. Assim, no presente estudo, a natureza da ação letal das micro-ondas sobre os micro-organismos pode ter sido uma combinação dos efeitos térmicos, moleculares, mecânicos ou de aquecimento seletivo.

Apesar de ambos os tratamentos instituídos terem sido eficazes para reduzir a colonização microbiana do palato e da prótese dos pacientes, a irradiação por micro-ondas apresenta algumas vantagens. A nistatina age apenas na superfície da mucosa palatina, geralmente menos colonizada que a superfície protética<sup>8,69,96</sup>. A necessidade da aplicação diária de várias doses da medicação, associada ao seu sabor desagradável, dificultam a cooperação do paciente no tratamento instituído<sup>12</sup>. Clinicamente, tem sido observado também que os medicamentos tópicos podem ter sua ação reduzida devido aos efeitos diluentes da saliva e dos movimentos da língua, os quais mantêm o medicamento em uma concentração subterapêutica<sup>8</sup>. Além disso, enquanto a nistatina é apenas fungicida, a irradiação por micro-ondas tem um efeito de amplo espectro, demonstrando-se letal contra vários micro-organismos, incluindo diferentes espécies de *Candida*<sup>33,82,86</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>33,64,82,88</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>33,64,82,88</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>33,64,88</sup> e *Escherichia coli*<sup>95</sup>. É importante salientar, também, que, considerando que a irradiação por micro-ondas é um método físico de desinfecção, a emergência de micro-organismos resistentes pode ser evitada com a sua utilização.

O parâmetro clínico utilizado para a avaliação da efetividade dos tratamentos instituídos foi a análise das fotografias intrabucais tomadas das

#### 4 *Discussão*

mucosas palatinas dos pacientes com estomatite protética. Esta análise demonstrou que os dois tratamentos instituídos foram efetivos no tratamento dos sinais clínicos da infecção nos pacientes diabéticos. Não houve diferenças estatisticamente significantes no número de pacientes curados após os dois tratamentos instituídos e nos períodos de controle posterior. Foi observada cura da estomatite protética em 40% dos indivíduos ao final dos tratamentos e ao menos 50% dos pacientes tratados apresentaram melhora no quadro clínico da estomatite protética do final dos tratamentos até o dia 60 do controle posterior. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que relataram uma redução significativa nas áreas eritematosas da mucosa palatina após o término do tratamento da estomatite protética de pacientes não-diabéticos com nistatina<sup>8,11</sup> e desinfecção por micro-ondas<sup>8,69,96</sup>. Apesar das elevadas taxas de cura e melhora clínica, ao final do controle posterior (90 dias), alguns pacientes submetidos ao tratamento com nistatina (40%) e irradiação por micro-ondas (55%) demonstraram recorrência dos sinais de inflamação da estomatite protética. A recorrência desta infecção também foi verificada por outros pesquisadores<sup>8,12,69</sup>. Banting, Hill<sup>8</sup> observaram que a re-infecção da mucosa palatina e da prótese total dos pacientes pela forma invasiva de *Candida* (pseudohifas) aumentou progressivamente durante os três meses de avaliação após um tratamento com nistatina associada à irradiação por micro-ondas. No entanto, é importante enfatizar que a densidade de colonização microbiana não necessariamente se relaciona ao aparecimento de estomatite protética<sup>44,50,60</sup>. De fato, o presente estudo demonstrou que, apesar de os valores de ufc/mL quantificados aos 90 dias de controle posterior serem similares àqueles na avaliação inicial (dia 0), ao menos 20% dos pacientes ainda apresentaram ausência de sinais clínicos dessa infecção. Além disso, visto que este estudo não avaliou a presença das formas invasivas de *Candida* (miceliais), que são indicativas de infecção, a recorrência microbiológica verificada pode estar relacionada à presença das formas não-invasivas (blastóporos) do micro-organismo no meio de cultura<sup>8</sup>. O efeito temporário dos tratamentos com nistatina e irradiação por micro-ondas, tanto na avaliação microbiológica quanto na clínica, pode ser atribuído a diferentes fatores. Uma

#### 4 *Discussão*

proporção significativa de pacientes apresenta colonização microbiana na cavidade oral, mesmo na ausência de sinais clínicos de infecção<sup>44,50,60</sup>. Além disso, por meio de fontes exógenas<sup>53</sup>, como alimentos e líquidos, novos micro-organismos podem ser levados à cavidade oral. Ambos os fatores resultam na re-contaminação da superfície da prótese dentária e na consequente re-infestação dos tecidos adjacentes.

Devido ao aumento na resistência<sup>7,43,47,62</sup>, ao limitado poder de ação<sup>8,12,69</sup> e à possibilidade de efeitos tóxicos<sup>55</sup> de algumas medicações antifúngicas, novas alternativas para o tratamento da estomatite protética são necessárias. Este estudo clínico demonstrou que a irradiação de próteses totais por micro-ondas pode ser utilizada com sucesso para tratar e prevenir o aparecimento de estomatite protética em pacientes diabéticos, apresentando a mesma efetividade de um método clássico de tratamento com antifúngico tópico. Além de ser altamente efetiva, a irradiação de prótese por micro-ondas é um método físico de desinfecção, simples, seguro e de baixo custo, visto que necessita apenas de um forno de micro-ondas e água. Muitos estudos têm demonstrado que os diabéticos são mais susceptíveis às infecções fúngicas<sup>10</sup> e à colonização por *Candida*<sup>10,31,44,49,50,67</sup> do que os não-diabéticos, e que um controle inadequado do diabetes está relacionado à maior colonização por *Candida*<sup>49</sup> e a uma maior severidade da estomatite protética<sup>31</sup>. No entanto, foi observado que os pacientes diabéticos controlados do tipo 2, tratados neste estudo, responderam de forma positiva a ambos os tratamentos instituídos, com resultados comparáveis àqueles verificados em pacientes sem comprometimento sistêmico<sup>8,11,12,69,96</sup>. Isto confirma as observações de Richardson et al.<sup>83</sup>, de que um bom controle metabólico pode guiar o paciente diabético a uma vida ausente de ou com menores complicações relacionadas a esta enfermidade. Além disso, os resultados obtidos sugerem que, quando um adequado controle metabólico é mantido, a abordagem junto ao paciente diabético pode ser realizada da mesma forma que àquele sem o diabetes. Dessa maneira, os cuidados sistêmicos relacionados ao diabetes devem receber atenção especial durante o tratamento da estomatite protética destes pacientes. Esta infecção fúngica é uma das infecções oportunistas mais comumente



#### 4 *Discussão*

encontradas em pacientes diabéticos usuários de próteses totais. Devido à proliferação fúngica na mucosa esofágica, a candidose bucal pode promover dificuldade de deglutição (disfagia), levando a desnutrição, prolongamento de estados hospitalares e baixa resistência imunológica<sup>2</sup>. Além disso, em indivíduos imunocomprometidos, a infecção pode se estender para o trato gastrointestinal superior ou para a corrente sanguínea, desencadeando fungemia, infecção sistêmica associada com elevados níveis de mortalidade<sup>23,63</sup>. Dessa forma, a prevenção da colonização fúngica da orofaringe, mesmo nos pacientes diabéticos controlados, é relevante para a prevenção de infecções sistêmicas relacionadas à *Candida* e, conseqüentemente, das complicações comumente relacionadas ao diabetes. Considerando essas informações, é imprescindível que os profissionais da área de saúde, incluindo médicos e dentistas, avaliem constantemente a qualidade da higiene oral e o controle metabólico de pacientes diabéticos, proporcionando, assim, melhores condições de vida a estes indivíduos.



## *5 Conclusão*

## 5 Conclusão

Com base nas condições experimentais, e considerando as limitações do presente estudo, foi possível concluir que:

1. Não houve diferenças significativas na prevalência das espécies de *Candida* entre os pacientes diabéticos do tipo 2 controlados e não-diabéticos, portadores de estomatite protética;
2. Os pacientes portadores de estomatite protética apresentaram prevalências significativamente superiores de *C. albicans* e *C. tropicalis* em comparação aos pacientes sem a referida infecção;
3. A espécie *C. tropicalis* apresentou prevalência significativamente superior nos pacientes com maior severidade da estomatite protética;
4. Tanto a nistatina quanto a irradiação por micro-ondas reduziram significativamente os valores de ufc/mL da mucosa palatina e da prótese total dos pacientes diabéticos do tipo 2 controlados, após 14 e 30 dias decorridos dos tratamentos;
5. Tanto a nistatina quanto a irradiação por micro-ondas reduziram significativamente a inflamação da mucosa palatina dos pacientes diabéticos do tipo 2 controlados;
6. Não foram encontradas diferenças significantes entre nistatina e irradiação por micro-ondas para o tratamento da estomatite protética de pacientes diabéticos do tipo 2 controlados.



## 6 Referências

## 6 Referências\*

1. Abelson JA, Moore T, Bruckner D, Deville J, Nielsen K. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. *Pediatrics*. 2005; 116: 61-7.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78: 455-9.
3. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998; 15: 539-53.
4. Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43: 85-6.
5. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979; 147: 267-72.
6. Arendorf TM, Walker DM, Kingdom RJ, Roll JR, Newcombe RG. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leukoplakia. *Br Dent J*. 1983; 155: 340-3.
7. Arevalo MP, Arias A, Andreu A, Rodriguez C, Sierra A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against *Candida* spp. *J Chemother*. 1994; 6: 226-9.
8. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001; 21: 4-8.
9. Basso MF, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Compagnoni MA. Influence of microwave disinfection on the linear dimensional stability of complete dentures: a clinical study. *Int J Prosthodont*. 2010; 23: 318-20.

---

\*De acordo com estilo Vancouver.

Disponível no site: [HTTP://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

## 6 Referências

10. Belazi M, Velegraki A, Fleva A, Gidakou I, Papanau L, Baka D, et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses*. 2005; 48: 192-6.
11. Bergendal T, Isacsson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1980; 88: 446-54.
12. Blomgren J, Berggren U, Jontell M. Fluconazole versus nystatin in the treatment of oral candidosis. *Acta Odontol Scand*. 1998; 56: 202-5.
13. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988; 318: 1315-21.
14. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974; 82: 151-90.
15. Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol*. 1981; 10: 65-80.
16. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48: 61-9.
17. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 327-35.
18. Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. *J Prosthet Dent*. 2005; 93: 483-7.
19. Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DMP. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses*. 2007; 50: 140-7.
20. Carrol DE, Lopez A. Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems. *J Food Sci*. 1969; 34: 320-4.
21. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80: 903-8.

## 6 Referências

22. 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; 23: 377-83.
23. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 34: 281-6.
24. Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22: 470-4.
25. Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect.* 2000; 45: 69-72.
26. Darwazeh AMG, Lamey PJ, Samaranayake LP, Mac-Farlane TW, Fisher BM, MacRury SM, et al. The relationship between colonisation, secretor status and in vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetics. *J Med Microbiol.* 1990; 33: 43-9.
27. Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J.* 1970; 129: 151-6.
28. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26: 377-84.
29. Dorey JL, Blasberg B, MacEntee MI, Conklin RJ. Oral mucosal disorders in denture wearers. *J Prosthet Dent.* 1985; 53: 210-3.
30. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25: 411-5.

## 6 Referências

31. Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jørgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 90: 81-6.
32. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 30-6.
33. 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; 18: 611-7.
34. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol.* 1998; 43: 999-1007.
35. Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. *J Oral Pathol Med.* 1998; 27: 213-9.
36. Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *Arch Oral Biol.* 1998; 43: 879-87.
37. Ellepola AN, Panagoda GJ, Samaranayake LP. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol Immunol.* 1999; 14: 358-63.
38. Farman AG, Nutt G. Oral *Candida*, debilitating disease and atrophic lesions of the tongue. *J Biol Buccale.* 1976; 4: 203-26.
39. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007; 34: 448-55.
40. Fisher BM, Lamey PJ, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Frier BM. Carriage of *Candida* species in the oral cavity in diabetic patients: relationship to glycaemic control. *J Oral Pathol.* 1987; 16: 282-4.



## 6 Referências

41. Fongsmut T, Deerochanawong C, Prachyabrued W. Intraoral *Candida* in Thai diabetes patients. J Med Assoc Thai. 1998; 81: 449-53.
42. Goldani LZ, Mário PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. J Infect. 2003; 46: 155-60.
43. Goldman GH, Ferreira MES, Marques ER, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004; 50: 25-32.
44. Gonçalves RH, Miranda ET, Zaia JE, Giannini MJ. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients. Mycopathologia. 2006; 162: 83-9.
45. Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM, et al. Insulin dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II. Prevalence and characteristics of *Candida* and candidal lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000; 89: 570-6.
46. Hiti K, Walochnik J, Faschinger C, Haller-Schober EM, Aspöck H. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. Cornea. 2001; 20: 467-70.
47. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998; 85: 558-64.
48. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. Bruxelles: International Diabetes Federation; 2006. 387 p.
49. Kadir T, Pisiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbuker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiological and systemic factors. J Oral Rehabil. 2002; 29: 452-7.
50. Khosravi AR, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. J Mycol Med. 2008; 18: 83-8.

## 6 Referências

51. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998; 21: 1414-31.
52. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985; 50: 97-101.
53. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994; 72: 283-8.
54. Lamey PJ, Darwaza A, Fisher BM, Samaranayake LP, Macfarlane TW, Frier BM. Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol*. 1988; 17: 354-7.
55. Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1993; 2: 17-22.
56. Lotfi-Kamran MH, Jafari AA, Tafti-Falah A, Tavakoli E, Falahzadeh MH. *Candida* colonization on the denture of diabetic and non-diabetic patients. *Dent Res J*. 2009; 6: 23-7.
57. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS*. 2002; 110: 601-10.
58. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102: 632-8.
59. Lyon JP, Resende MA. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. *Mycoses*. 2007; 50: 21-4.
60. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17: 181-5.

## 6 Referências

61. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. Arch Oral Biol. 2009; 54: 127-31.
62. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3135-9.
63. Meunier-Carpentier F, Kiehn TE, Armstrong D. Fungemia in the immunocompromised host. Changing patterns, antigenemia, high mortality. Am J Med. 1981; 71: 363-70.
64. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE. Effect of different exposure times of microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. J Prosthodont. 2008; 17: 312-7.
65. Minagi S, Miyake Y, Fujioka Y, Tsuru H, Suginaka H. Cell surface hydrophobicity of *Candida* species as determined by the contact-angle and hydrocarbon-adherence methods. J Gen Microbiol. 1986; 132: 1111-5.
66. Monroy TB, Maldonado VM, Martinez FF, Barrios BA, Quindos G, Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005; 10 (suppl 1): E27-39.
67. Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP, Pereira LJ. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. Mycopathologia. 2010; 169: 215-23.
68. Mutluay MM, Oğuz S, Orstavik D, Fløystrand F, Doğan A, Söderling E, et al. Experiments on in vivo biofilm formation and in vitro adhesion of *Candida* species on polysiloxane liners. Gerodontology. 2010; 27: 283-91.

## 6 Referências

69. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35: 836-46.
70. Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *Br Dent J.* 1962; 112: 357-60.
71. Novais PM, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Jorge JH. The occurrence of porosity in reline acrylic resins. Effect of microwave disinfection. *Gerodontology.* 2009; 26: 65-71.
72. Olsen CM. Microwaves inhibit bread mold. *Food Eng.* 1965; 37: 51-3.
73. Paulitsch AH, Willinger B, Zsalatz B, Stabentheiner E, Marth E, Buzina W. In-vivo *Candida* biofilms in scanning electron microscopy. *Med Mycol.* 2009; 47: 690-6.
74. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 58-61.
75. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 747-51.
76. Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37: 587-92.
77. Quirino MR, Birman EG, Paula CR. Oral manifestations of diabetes mellitus in controlled and uncontrolled patients. *Braz Dent J.* 1995; 6: 131-6.
78. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005; 4: 633-8.

## 6 Referências

79. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 53-9.
80. Resende MA, de Sousa LV, de Oliveira RC, Koga-Ito CY, Lyon JP. Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. *Mycopathologia.* 2006; 162: 39-44.
81. 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; 39: 833-40.
82. 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; 37: 666-72.
83. Richardson A, Adner N, Nordström G. Persons with insulin-dependent diabetes mellitus: acceptance and coping ability. *J Adv Nurs.* 2001; 33: 758-63.
84. Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios.* 1994; 78: 55-9.
85. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS.* 1995; 103: 707-13.
86. Sanitá PV, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Machado AL. Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses.* 2009; 52: 154-60.
87. Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc.* 2002; 50: 535-43.
88. Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont.* 2006; 3: 151-6.

## 6 Referências

89. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 332-70.
90. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004; 12: 317-24.
91. Surarit R, Shepherd MG. The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25: 403-13.
92. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M, de Uzeda M. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 149-54.
93. Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology.* 2008; 25: 222-8.
94. Vasconcelos BC, Novaes M, Sandrini FA, Maranhão Filho AW, Coimbra LS. Prevalence of oral mucosa lesions in diabetic patients: a preliminary study. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008; 74: 423-8.
95. Watanabe K, Kakita Y, Kashige N, Miake F, Tsukiji T. Effect of ionic strength on the inactivation of microorganisms by microwave irradiation. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31: 52-6.
96. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology.* 2005; 22: 168-76.
97. Wilson RM, Reeves WG. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. *Clin Exp Immunol.* 1986; 63: 478-84.
98. Wingard JR, Merz WG, Saral R. *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann Intern Med.* 1979; 91: 539-43.
99. Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol.* 1996; 44: 311-6.

## 6 Referências

100. Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011; 49: 208-11.





*Planejamento experimental,*

*Análise estatística e*

*Resultado*

# Capítulo 1

## Planejamento experimental e Análise estatística

O estudo descrito no Capítulo 1 foi do tipo epidemiológico observacional transversal. Todos os pacientes selecionados foram submetidos a uma única avaliação para se determinar a prevalência de *Candida* spp. das superfícies de suas próteses dentárias. Para o controle de estratificação dos fatores relacionados aos pacientes, as informações referentes à idade e gênero do paciente, idade da prótese total e uso de tabaco foram coletadas. Os resultados das identificações das espécies de *Candida* foram tabulados em uma planilha eletrônica criada em um programa computadorizado (Microsoft Excel 2007) previamente à análise estatística.

As características demográficas dos pacientes e seus fatores de risco foram analisados estatisticamente para avaliar sua homogeneidade de distribuição entre os grupos de estudo. A idade e gênero dos pacientes foram comparados entre os grupos de estudo pelos testes ANOVA, complementada pelo teste de Tukey, e Exato de Fisher, respectivamente ( $\alpha=0,05$ ). Com relação à distribuição dos fatores de risco entre os grupos, a idade das próteses foi verificada pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, e o hábito de tabagismo pelo teste Exato de Fisher ( $\alpha=0,05$ ).

Para a avaliação da prevalência das espécies de *Candida* identificadas, foi realizada uma estatística descritiva, onde as diferentes espécies foram organizadas por meio da frequência percentual com que apareceram entre os pacientes da amostra. As porcentagens das diferentes espécies de *Candida* identificadas de forma geral, considerando todos os pacientes do estudo, foram submetidas a comparações múltiplas por meio de Intervalos de confiança com correção de Bonferroni. Para a comparação das frequências percentuais de cada espécie de *Candida* identificada em cada grupo de estudo e entre esses grupos, foram utilizados o Intervalo de confiança de Bonferroni e o teste do Qui-

## Apêndice - Capítulo 1

Quadrado para análise de várias proporções, respectivamente. A distribuição dos diferentes graus de estomatite protética nos pacientes dos grupos EPND e EPD foi avaliada pelo teste Exato de Fisher e as frequências percentuais de cada espécie de *Candida* identificada nos diferentes graus de infecção foram comparadas pelo teste do Qui-Quadrado para análise de várias proporções. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes a um valor de  $\alpha=0,05$ .

### Resultado

As características demográficas e os fatores de risco dos 210 pacientes selecionados para este estudo estão descritos na Tabela A1. A média de idade de todos os pacientes foi de 62,5 anos no momento da avaliação inicial, variando de 59,6 a 65,5. Em todos os grupos de estudo, o número de pacientes do sexo feminino foi, ao menos, três vezes maior do que o de pacientes do sexo masculino, não havendo diferença entre os grupos ( $p=0,247$ ). As próteses totais dos pacientes do GC apresentaram idade média significativamente menor do que aquelas dos pacientes dos grupos EPND e EPD ( $p<0,0001$ ). Poucos pacientes fumantes participaram do estudo e não foram encontradas diferenças significantes na sua distribuição entre os três grupos de estudo ( $p=0,910$ ).

Tabela A1. Características demográficas e fatores de risco

	Característica demográfica		Fator de risco	
	Idade (anos)	Sexo (% de feminino)	Idade da prótese total (anos)	% de não-fumantes
<b>GC</b>	65,5 <sup>a</sup>	72,3 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>	86,7 <sup>a</sup>
<b>EPND</b>	59,6 <sup>b</sup>	77,5 <sup>a</sup>	15,1 <sup>b</sup>	85 <sup>a</sup>
<b>EPD</b>	62,4 <sup>ab</sup>	87,5 <sup>a</sup>	13,7 <sup>b</sup>	87,5 <sup>a</sup>
<b>valor de p</b>	<0,0002*	0,247***	<0,0001**	0,910***

\*ANOVA; \*\*teste de Kruskal-Wallis; \*\*\*teste Exato de Fisher

No sentido vertical, valores com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ( $p>0,05$ ).

Todas as espécies de *Candida* identificadas no estudo estão expostas abaixo nas Tabelas A2, A3 e A4.

*Apêndice - Capítulo 1*

Tabela A2. Espécies de *Candida* identificadas nas coletas das próteses totais dos pacientes do GC

Paciente	<i>Candida</i> spp.	Paciente	<i>Candida</i> spp.	Paciente	<i>Candida</i> spp.	Paciente	<i>Candida</i> spp.
1	-	19	-	37	Ca	55	Ca, Cg
2	Ca, Cg	20	-	38	-	56	Ca, Cg
3	-	21	Ca, Cg	39	Ca	57	-
4	Ca	22	-	40	-	58	Ca
5	-	23	Ca	41	-	59	-
6	Ca	24	-	42	Ca	60	Ca
7	Ca	25	-	43	-	61	Ca
8	Ca	26	Ca	44	Ca, Cg	62	Ca
9	Ca, Cg	27	Ca	45	Ca	63	Ca
10	-	28	Cg	46	Ca, Ct	64	Ca
11	-	29	-	47	Ca, Cg	65	Ca
12	Ca	30	Ca	48	-	66	Ca
13	Ca	31	Ca	49	Ca	67	Ca, Cg
14	-	32	-	50	-	68	Ca
15	Ca	33	Ca	51	Ca	69	Ca
16	Ca	34	Ca	52	-	70	-
17	Ca	35	-	53	Ca	71	Ca
18	Ca	36	Ca, Cg	54	Ca	72	Ca
						73	-
						74	Ca
						75	Ca, Cg, Ct
						76	Ca, Cg
						77	-
						78	Ca
						79	-
						80	Ca
						81	Ca
						82	Ca
						83	Ca
						84	Ca
						85	Ca
						86	-
						87	-
						88	Ca
						89	Ca, Cg
						90	Ca

Ca: *C. albicans* / Ct: *C. tropicalis* / Cg: *C. glabrata*.

Tabela A3. Espécies de *Candida* identificadas nas coletas das próteses totais dos pacientes do EPND

Paciente	<i>Candida</i> spp.	Paciente	<i>Candida</i> spp.	Paciente	<i>Candida</i> spp.	Paciente	<i>Candida</i> spp.
1	Ca, Ct	17	Ca	33	Ca, Cg	49	Ca
2	Ca	18	Ca	34	Ct	50	Ca
3	Ca	19	Ca	35	Ca	51	Ca, Ct
4	Ca, Ct	20	Ca, <i>lusitane</i> <i>parapsilosis</i>	36	Ca, Ct	52	Ca
5	Ca, Ct	21	Ca	37	Ca	53	Ca, Cg
6	Ca	22	Ca	38	Ca, Cg	54	Ca, Ct
7	Ca	23	Ca	39	Ca	55	Ca
8	Ca	24	Ca, Ct	40	Ca, Ct	56	Ca
9	Ca, Cg	25	Ca	41	Ca, Ct, Cg	57	Ca
10	Ca	26	Ca, Cg	42	Ca	58	Ca
11	Ca	27	Ca	43	Ca	59	Ca
12	Ca	28	Ca	44	Ca, <i>sphaerica</i>	60	Ca, Ct
13	Ca	29	Ca, Ct, Cg	45	Ca, Ct, Cg	61	Ca, Ct
14	Ca, Ct, Cg	30	Ca	46	Ca	62	Ca
15	Ca	31	Ca	47	Ca	63	Ca
16	Ca, Ct, Cg	32	Ca	48	Ca, Cg	64	Ca
						65	<i>rugosa</i>
						66	Ca
						67	-
						68	Ca
						69	Ct
						70	Ca, Ct
						71	Ca
						72	-
						73	Ca, Cg
						74	Ca, Ct
						75	Ca, Cg, Ct
						76	Ca, Ct, Cg
						77	Ca
						78	Ca
						79	Ca
						80	Ca

Ca: *C. albicans* / Ct: *C. tropicalis* / Cg: *C. glabrata*.

Tabela A4. Espécies de *Candida* identificadas nas coletas das próteses totais dos pacientes do EPD

Paciente	<i>Candida</i> spp.	Paciente	<i>Candida</i> spp.
1	Ca	21	Ca
2	Ca	22	Ca
3	Ca	23	Ca, Cg
4	Ca	24	Ca
5	Ca	25	Ca
6	Ca, Ct	26	Ca
7	Ca	27	Ca
8	Ca	28	Ca
9	Ca	29	Ca
10	Ca, Ct, Cg	30	Ca, Ct
11	Ca, Ct	31	Ca, Cg, Ct
12	Ca	32	Ca
13	Ca	33	Ca, Ct
14	Ca	34	Ca
15	Ca	35	Ca
16	Ca	36	Ca
17	Ca, Ct	37	Ca
18	Ca	38	Ca
19	Ca	39	Ca, Cg, Ct
20	Ca	40	Ca

Ca: *C. albicans* / Ct: *C. tropicalis* / Cg: *C. glabrata*.

## Apêndice - Capítulo 1

As principais espécies identificadas, nos três grupos, foram *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Outras espécies de *Candida* (*lusitanae*, *parapsilosis*, *sphaerica*, *rugosa*) também foram identificadas, em menores frequências percentuais. Na análise das espécies de *Candida* identificadas foi realizada, primeiramente, uma comparação da prevalência no geral, ou seja, considerando toda a amostra do estudo (n=210). Nesse contexto, a *C. albicans* foi a espécie predominante, tendo sido isolada em 81,9% dos indivíduos ( $p < 0,016$ , após correção de Bonferroni). As espécies *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram isoladas de 15,71% e 15,24% dos participantes, respectivamente, não tendo sido encontradas diferenças significantes entre sua prevalência ( $p > 0,05$ ). Os resultados dos Intervalos de confiança de Bonferroni desta análise estão expostos na Tabela A5.

Tabela A5. Intervalos de confiança após correção de Bonferroni para a prevalência das espécies de *Candida* identificadas em toda a amostra

Espécie	Intervalo de confiança das proporções (1- $\alpha$ /3%)	
	Limite inferior	Limite superior
<i>C. albicans</i>	0,7467	0,8781
<i>C. tropicalis</i>	0,0848	0,1928
<i>C. glabrata</i>	0,0878	0,1968

Quando a distribuição das espécies de *Candida* identificadas foi avaliada considerando cada grupo de estudo separadamente (Tabela A6), *C. albicans* também foi a espécie predominante ( $p < 0,016$ ). Independentemente do grupo avaliado, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram as espécies não-*albicans* mais frequentemente isoladas, não tendo sido encontradas diferenças significantes entre essas duas espécies ( $p > 0,05$ ).

*Apêndice - Capítulo 1*

Tabela A6. Intervalos de confiança após correção de Bonferroni para a prevalência das espécies de *Candida* identificadas em cada grupo de estudo

Espécie	Intervalo de confiança das proporções (1- $\alpha$ /3%)					
	GC		EPND		EPD	
	L. inf.	L. sup.	L. inf.	L. sup.	L. inf.	L. sup.
<i>C. albicans</i>	0,5136	0,7615	0,8243	0,9781	0,8872	1,000
<i>C. tropicalis</i>	0,0015	0,0925	0,1639	0,4105	0,0743	0,3908
<i>C. glabrata</i>	0,069	0,2550	0,1049	0,3277	0,0201	0,2687

L. inf.: limite inferior / L. sup.: limite superior.

Na comparação da prevalência de *Candida* spp. entre os três grupos de estudo, o teste do Qui-Quadrado para análise de várias proporções (Tabela A7) demonstrou que as frequências percentuais de *C. albicans* e *C. tropicalis* nos grupos de pacientes com estomatite protética (EPND e EPD) foram significativamente superiores do que aquelas verificadas no GC ( $p < 0,01$ ). Não houve diferenças significantes na prevalência de *C. glabrata* entre os três grupos de estudo ( $p > 0,05$ ).

Tabela A7. Frequência percentual (%) das diferentes espécies de *Candida* isoladas em cada grupo de estudo

Espécie	GC	EPND	EPD
<i>C. albicans</i>	64 <sup>a</sup>	93 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i>	2 <sup>a</sup>	28 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>
<i>C. glabrata</i>	14 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>

No sentido horizontal, valores com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Ambos os grupos de pacientes com estomatite protética foram avaliados quanto à distribuição dos diferentes graus da infecção entre os pacientes. Vinte por cento dos pacientes do grupo EPND e 38% do EPD apresentaram grau I de Newton, 61% e 53% apresentaram grau II de Newton e 19% e 10% apresentaram grau III de Newton, respectivamente. Considerando que não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos EPND e EPD, tanto na distribuição dos diferentes graus da infecção (teste Exato de Fisher;  $p > 0,09$ ) quanto na prevalência



## *Apêndice - Capítulo 1*

de *Candida* spp. (Tabela A7), os pacientes portadores de estomatite protética foram agrupados e as frequências percentuais das espécies de *Candida* nos diferentes graus de infecção foram avaliadas. De acordo com o teste do Qui-Quadrado para análise de várias proporções, a prevalência de *C. tropicalis* aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) no maior grau de infecção (Tabela A8). As prevalências de *C. albicans* e *C. glabrata* não foram influenciadas pela severidade da estomatite protética.

Tabela A8. Frequência percentual (%) das diferentes espécies de *Candida* em cada grau de estomatite protética

<b>Espécie</b>	<b>Grau I</b>	<b>Grau II</b>	<b>Grau III</b>	<b>valor de <i>p</i></b>
<i>C. albicans</i>	100 <sup>a</sup>	94,3 <sup>a</sup>	94,7 <sup>a</sup>	0,4015
<i>C. tropicalis</i>	25,8 <sup>ab</sup>	18,6 <sup>a</sup>	57,9 <sup>b</sup>	<0,01
<i>C. glabrata</i>	9,7 <sup>a</sup>	15,7 <sup>a</sup>	26,3 <sup>a</sup>	0,2939

No sentido horizontal, valores com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Coletas mistas, ou seja, mais de uma espécie de *Candida*, foram identificadas em vários pacientes incluídos na amostra. As misturas mais comumente identificadas foram *C. albicans* + *C. glabrata* (40,4%), *C. albicans* + *C. tropicalis* (36,5%) e *C. albicans* + *C. glabrata* + *C. tropicalis* (19,2%). A frequência de coletas mistas identificadas nos pacientes do GC (14,4%) foi significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) àquela identificada nos pacientes com estomatite protética (32,5%).

## Capítulo 2

### Planejamento experimental e Análise estatística

O estudo descrito no Capítulo 2 foi do tipo analítico, sendo um ensaio clínico paralelo randomizado estratificado duplo-cego longitudinal. Todos os pacientes foram avaliados periodicamente com relação às eficácias clínica e microbiológica de cada tratamento e às possíveis recorrências. Para o controle de estratificação dos fatores relacionados aos pacientes, as informações referentes à idade e gênero do paciente, idade da prótese total, presença de xerostomia, uso de tabaco, hábitos de higiene da prótese total e uso noturno da prótese total foram coletadas. Com o objetivo de se obter grupos de estudos homogêneos com relação às características demográficas e fatores de risco considerados, foi realizada uma randomização estratificada durante a distribuição dos pacientes. A eficácia dos tratamentos instituídos foi analisada por meio de avaliações microbiológicas e clínicas. Os resultados das quantificações de colônias viáveis, das identificações das espécies de *Candida* e das avaliações fotográficas pelos examinadores (duplo-cego) foram tabulados em uma planilha eletrônica criada em um programa computadorizado (Microsoft Excel 2007) previamente à análise estatística.

As características demográficas dos pacientes e seus fatores de risco foram analisados estatisticamente para avaliar sua homogeneidade de distribuição entre os grupos de estudo. A idade e o gênero dos pacientes entre os grupos foram avaliados pelos testes *T* de Student e Exato de Fisher ( $\alpha=0,05$ ), respectivamente. Com relação à distribuição dos fatores de risco entre os grupos, a idade das próteses foi verificada pelo teste de Wilcoxon e a presença de xerostomia e do hábito de tabagismo pelo teste Exato de Fisher ( $\alpha=0,05$ ).

Para a avaliação microbiológica, foram realizadas a quantificação de colônias viáveis e a identificação das espécies de *Candida*, tanto da cavidade bucal quanto das superfícies das próteses. Para a quantificação de colônias viáveis após a instituição dos tratamentos, foram determinados os valores

*Apêndice - Capítulo 2*

de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL). Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, para o número de colônias, foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. O valor de n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3) selecionada para a contagem do número de colônias e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição no momento das semeaduras das placas. No presente estudo,  $q = 0,025$ , já que foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  para cada diluição. Os valores de ufc/mL obtidos foram extremamente elevados, com distribuição diferente da normal. Assim, foram transformados para logaritmo na base dez, de maneira a se obter distribuição normal dos dados e garantir a esfericidade da matriz de variâncias e covariâncias. Esta avaliação quantitativa dos tratamentos instituídos foi realizada em tempos distintos: 0 (baseline), 14 dias, 30, 60 e 90 dias. Assim, o mesmo indivíduo, que foi aleatorizado para receber um dos tratamentos, teve medidas tomadas de tempos em tempos, caracterizando a correlação entre várias mensurações da variável  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  nas mucosas palatinas e próteses dos pacientes. Dessa maneira, este estudo foi caracterizado como longitudinal ou com medidas repetidas, com o interesse de saber se, ao longo do tempo, houve diferenças nos valores das contagens e se houve efeito dos tratamentos nos resultados. Para a análise estatística, estes resultados foram avaliados com um Modelo Linear com efeitos aleatórios (no tempo) e uma análise de variância – ANOVA, subjacente a este modelo, foi aplicada ( $\alpha=0,05$ ). Possíveis diferenças encontradas foram apontadas pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Além disso, a significância clínica dos tratamentos foi determinada pela magnitude de seu efeito, que foi determinada obtendo-se a diferença entre as médias de  $\log_{10}\text{cfu/mL}$  obtidas antes e após o tratamento e dividindo esse valor

## *Apêndice - Capítulo 2*

pelo desvio padrão dos valores de pré-tratamento\*. Para interpretar o valor da magnitude do efeito dos tratamentos, as seguintes referências foram utilizadas:  $<0,1$ = efeito trivial;  $0,1-0,3$ = efeito reduzido;  $0,3-0,5$ = efeito moderado; e  $>0,5$ = efeito amplo<sup>69</sup>.

Para a avaliação da prevalência das espécies de *Candida* identificadas, foi realizada uma estatística descritiva, onde as diferentes espécies foram organizadas por meio da frequência percentual com que apareceram entre os pacientes da amostra. Em seguida, foi aplicado o teste do Qui-Quadrado para análise de várias proporções ( $\alpha=0,05$ ), que apontou possíveis diferenças nas frequências percentuais de cada espécie de *Candida* identificada.

As avaliações clínicas por meio das fotografias intra-bucais dos pacientes foram também utilizadas para se verificar a eficácia dos tratamentos instituídos. Para isso, foram realizadas tomadas de fotografias intra-bucais da mucosa palatina de todos os pacientes, durante todos os períodos de avaliação. Todas as fotografias obtidas foram enviadas a dois examinadores (cirurgiões-dentistas especializados) para realização de um estudo duplo-cego. Os examinadores foram instruídos a analisar as cinco imagens obtidas de cada um dos pacientes e, em seguida, realizar uma avaliação fotográfica pelo método de comparação, desconhecendo o tratamento instituído para cada paciente avaliado e os possíveis fatores de risco presentes. Nessa avaliação fotográfica, a presença ou ausência da estomatite protética foram indicadas por meio da classificação de Newton<sup>70</sup>. Os dados obtidos da análise comparativa das fotografias intra-bucais de cada paciente foram denominados qualitativos indicadores do grau de inflamação, com valores de 0 a 3.

Para a análise da concordância e correlação entre os diferentes observadores foram mensurados a medida  $\kappa$  ou teste Kappa, o coeficiente de concordância e as medidas do teste de correlação de Kendall. A medida  $\kappa$  é uma

---

\*Coe R. It's the effect size stupid? What effect size is and why it is important? In: Annual Conference of the British Educational Research Association, University of Exeter, England, 12-14 September 2002. Available from: <http://www.leeds.ac.uk/educol/documents/00002182.htm> [cited 2011 June 2].

*Apêndice - Capítulo 2*

grandeza que avalia a concordância inter-observadores e seu domínio é definido entre  $-1$  e  $1$  (concordância perfeita,  $\kappa=1$ ; quase perfeita,  $0,81<\kappa<1$ ; substancial,  $0,61<\kappa<0,80$ ; moderada,  $0,41<\kappa<0,60$ ; razoável,  $0,21<\kappa<0,40$ ; fraca,  $0<\kappa<0,20$ ; sem concordância,  $\kappa=0$ )<sup>†</sup>. O teste de correlação de Kendall ( $\tau$ ) avaliou se houve ou não uma tendência de julgamentos iguais pelos observadores e seu domínio é definido entre  $-1$  e  $1$  (correlação perfeita,  $\tau =1$ ; sem correlação,  $\tau =0$ ; desacordo perfeito,  $\tau =-1$ )<sup>‡</sup>. O coeficiente de concordância é representado pela porcentagem de julgamentos idênticos obtidos pelos observadores. Estas mensurações foram realizadas considerando o período de tratamento (0 e 14 dias) e todos os períodos do estudo (0, 14, 30, 60 e 90 dias).

Após a determinação das medidas de concordância e correlação, foi feita a verificação de homogeneidade dos graus de inflamação entre os dois grupos de estudo, no tempo inicial, por meio do teste Exato de Fisher ( $\alpha=0,05$ ). Em seguida, os dados foram avaliados para a análise da evolução do grau de inflamação nos dois grupos de estudo, considerando todos os períodos de avaliação, e para a comparação entre a quantidade de cura e recidiva da infecção nos dois grupos. Para a verificação da evolução do grau de inflamação nos dois grupos foi feita uma análise destes graus com relação ao tempo inicial por meio da criação de variável categórica (Quadro A1), que avaliou a evolução da inflamação ao longo do tempo, sempre tendo como controle o tempo inicial. Dessa forma, para cada grupo de estudo, foi realizada uma mensuração do número de pacientes alocados em cada chave da variável categórica nos tempos de 14, 30, 60 e 90 dias. Em seguida, foi aplicado o teste de Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ) para comparação. Para a verificação da porcentagem de pacientes curados, foi considerado o número de pacientes com grau 0 de inflamação, em ambos os grupos, para todos os períodos pós-tratamento. Para a verificação da porcentagem de pacientes com recidiva, foi considerado o número de pacientes que apresentou piora no grau de

---

<sup>†</sup>Landis Jr and Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: 159-74.

<sup>‡</sup>Kendall MG. Rank correlation methods. London: Griffin; 1970.

## *Apêndice - Capítulo 2*

inflamação aos 90 dias com relação a cada um dos tempos (14, 30 e 60). Para essas análises foi realizado o teste Exato de Fisher ( $\alpha=0,05$ ).

Quadro A1. Chaves da variável categórica que avaliou a evolução da inflamação ao longo do tempo

<b>Avaliação</b>	<b>Chave</b>	<b>Evolução do grau de inflamação</b>
Melhora de 1 grau	M1	III-II / II-I / I-0
Melhora de 2 graus	M2	III-I / II-0
Melhora de 3 graus	M3	III-0
Estabilidade	E	I-I / II-II / III-III
Piora de 1 grau	P1	I-II / II-III
Piora de 2 graus	P2	I-III

### **Resultado**

As características demográficas e os fatores de risco dos pacientes de cada grupo estão estatisticamente descritos na Tabela A9. A média de idade de todos os pacientes foi de 62,4 anos no momento da avaliação inicial, variando de 62,2 a 62,6. Em ambos os grupos de estudo, o número de pacientes do sexo feminino foi cinco vezes maior do que de pacientes do sexo masculino. A média de idade das próteses totais dos pacientes foi superior a 10 anos em ambos os grupos e com valores similares. A maioria dos pacientes dos grupos NIS e MIC apresentou xerostomia e poucos pacientes fumantes participaram do estudo. Previamente ao início do estudo, uma maior porcentagem de pacientes utilizava sua prótese total durante a noite e ao menos 50% dos pacientes de ambos os grupos apresentavam hábitos de higiene insatisfatórios. A randomização estratificada garantiu homogeneidade entre os grupos de estudo para ambos, características demográficas e fatores de risco, visto que não foram encontradas diferenças significantes ( $p>0.05$ ).

*Apêndice - Capítulo 2*

Tabela A9. Características demográficas e fatores de risco

	Característica demográfica		Fator de risco				
	Idade (anos)	Sexo (% de feminino)	Idade da prótese total (anos)	% de pacientes com xerostomia	% de não-fumantes	% de pacientes com uso noturno da prótese	% de pacientes com higiene insatisfatória
<b>NIS</b>	62.6	85	13.1	60	85	80	55
<b>MIC</b>	62.2	90	14.3	75	90	75	50
<b>valor de <i>p</i></b>	0.870*	>0.999**	0.370***	0.500**	>0.999**	>0.999**	0.763**

\*teste *T* de Student / \*\*teste Exato de Fisher / \*\*\*teste de Wilcoxon.

Os resultados dos valores de ufc/mL após transformação logarítmica na base dez, obtidos das culturas micológicas da mucosa palatina e da prótese de todos os pacientes para os dois grupos de estudo, estão expostos nas Tabelas A10 e A11.

Tabela A10. Logaritmos decimais das contagens de *Candida*, em  $\log_{10}\text{ufc/mL}$ , dos pacientes do grupo NIS

Paciente	dia 0		dia 14		dia 30		dia 60		dia 90	
	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT
1	3,54	3,68	0	5,78	0	1,90	0	0	2,60	3,75
2	0	2,45	0	0	0	1,90	1,60	2,98	1,90	3,49
3	0	4,08	0	0	0	2,75	1,60	4,11	1,60	4,86
4	1,60	4,26	0	0	0	3,46	0	4,21	0	4,41
5	2,64	6,35	2,38	4,64	2,20	1,60	0	5,23	0	5,25
6	3,20	4,58	1,60	1,60	1,60	1,90	0	3,11	3,03	3,39
7	0	5,26	0	0	1,60	4,46	0	4,77	0	0
8	3,03	5,24	0	0	0	3,26	0	0	0	0
9	0	4,54	0	3,98	0	2,86	0	3,94	0	4,18
10	2,51	6,43	0	0	0	2,83	0	3,56	0	5,15
11	0	4,67	0	2,83	0	3,77	0	3,21	0	3,96
12	1,90	4,32	0	0	0	3,83	1,60	4,08	0	3,17
13	1,60	4,20	0	3,33	0	3,40	0	3,49	0	4,13
14	1,90	4,63	0	2,08	1,90	4,58	1,60	4,44	2,08	4,74
15	0	2,86	0	0	0	0	0	4,02	1,60	4,34
16	0	3,81	0	0	0	2,78	1,60	4,44	2,56	4,59
17	0	3,36	0	2,64	0	3,42	0	3,20	1,60	3,34
18	0	4,32	0	0	0	2,30	0	0	0	0
19	0	3,15	2,08	2,81	0	3,42	1,90	2,83	-	-
20	2,20	4,26	0	2,08	0	3,72	1,90	3,80	0	4,06

Pa: mucosa palatina / PT: superfície interna da prótese total superior.



Tabela A11. Logaritmos decimais das contagens de *Candida*, em  $\log_{10} \text{ufc/mL}$ , dos pacientes do grupo MIC

Paciente	dia 0		dia 14		dia 30		dia 60		dia 90	
	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT
1	2,20	4,13	0	2,45	0	4,61	0	6,41	2,64	6,35
2	2,08	4,68	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	3,80	0	2,20	0	4,02	1,60	3,58	1,60	4,62
4	2,56	3,94	0	1,60	0	3,09	0	4,21	0	4,70
5	0	2,81	0	1,60	0	0	0	1,60	0	2,81
6	0	4,41	0	0	0	1,60	1,60	3,43	1,90	4,13
7	0	3,44	0	0	0	3,17	0	5,23	0	5,23
8	1,60	4,39	0	0	0	0	0	0	1,60	0
9	1,60	3,80	3,08	5,29	3,08	5,58	2,30	3,61	1,90	5,55
10	0	2,81	2,30	3,43	2,64	3,11	2,78	5,33	1,90	3,86
11	3,19	5,09	0	0	0	4,48	0	3,83	3,24	2,90
12	1,90	3,94	2,64	2,60	1,60	4,37	1,90	4,98	1,90	4,63
13	2,38	4,61	0	0	0	0	1,60	4,82	1,60	4,58
14	0	3,11	0	0	0	0	0	3,74	0	4,80
15	0	3,58	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	3,83	0	0	0	3,23	2,56	5,38	2,68	5,06
17	0	2,45	1,60	3,53	1,60	3,51	2,92	4,30	1,6	4,6
18	0	2,08	0	0	0	3,45	0	3,23	0	1,90
19	2,20	5,42	2,20	4	2,75	5,27	2,20	4,26	2,64	3,94
20	0	3,62	0	2,20	0	2,88	0	3,24	0	3,72

Pa: mucosa palatina / PT: superfície interna da prótese total superior.

## Apêndice - Capítulo 2

O Modelo Linear com efeitos aleatórios (no tempo) e a análise de variância – ANOVA, subjacente a este modelo, foram aplicados ( $\alpha=0,05$ ) para as coletas obtidas da mucosa palatina e da prótese. Estes resultados são apresentados na Tabela A12.

Tabela A12. ANOVA do Modelo Linear com efeitos aleatórios para os dados de  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  da mucosa palatina e da prótese total

		GL num.	GL denom.	valor de F	valor de p
<b>Palato</b>	<b>(Intercept)</b>	1	156,0000	56,8789	0,0000
	<b>Tempo</b>	4	156,0000	3,6765	0,0069*
	<b>Tratamento</b>	1	38,0000	0,7600	0,3888
<b>Prótese</b>	<b>(Intercept)</b>	1	156,0000	647,5690	0,0000
	<b>Tempo</b>	4	156,0000	21,9381	0,0000*
	<b>Tratamento</b>	1	38,0000	1,3351	0,2551

GL num.: graus de liberdade do numerador; GL denom.: graus de liberdade do denominador

\*Valores significantemente diferentes pelo Teste ANOVA ao nível de 5%.

Os resultados indicaram que não foram encontradas diferenças significantes nas médias dos valores de  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  quando o fator tratamento foi avaliado (NIS ou MIC), tanto para as coletas da mucosa palatina ( $p=0,3888$ ) quanto da prótese ( $p=0,2551$ ). Por outro lado, houve diferenças estatísticas significantes para as médias dos valores de  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  obtidas nos diferentes tempos avaliados ( $p<0,01$ ). Dessa forma, foram realizadas comparações múltiplas das médias duas a duas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (Tabela A13). A aplicação deste teste demonstrou que ambos os tratamentos diminuiram significantemente os valores de  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  das coletas da mucosa palatina e da prótese no dia 14 ( $p=0,0293$  e  $p<0,001$ , respectivamente) e no dia 30 ( $p=0,0371$  e  $p<0,001$ , respectivamente). Nos dias 60 e 90, as médias dos valores de  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  obtidos da mucosa palatina e da prótese não diferiram significantemente ( $p>0,05$ ) dos valores obtidos no dia 0.

## Apêndice - Capítulo 2

Tabela A13. Valores de  $p$  do teste de Tukey para a comparação dos valores de  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  da mucosa palatina e da prótese nos diferentes tempos

Local da coleta	Tempo (dias)			
	0-14	0-30	0-60	0-90
Mucosa palatina	0,0293*	0,0371*	0,7545	0,9998
Prótese	<0,001*	<0,001*	0,0894	0,2455

\*Valores significantemente diferentes pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Estão descritos na Tabela A14 os valores de magnitude do efeito obtidos para cada tratamento. Estes valores indicaram que o efeito dos tratamentos sobre a redução dos valores de ufc/mL na mucosa palatina foi amplo para o grupo NIS e moderado para o grupo MIC. Ambos os tratamentos apresentaram amplo efeito sobre a superfície das próteses totais.

Tabela A14. Valores médios e desvio padrão das contagens de *Candida*, em  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  obtidos da mucosa palatina e prótese após os tratamentos

Grupo	Local da coleta	Período					Magnitude do efeito
		dia 0	dia 14	dia 30	dia 60	dia 90	
NIS	Palato	1.21 (1.33)	0.30 (0.75)	0.37 (0.76)	0.59 (0.83)	0.85 (1.12)	0,98
	Prótese	4.38 (1.04)	1.59 (1.86)	2.91 (1.08)	3.27 (1.54)	3.34 (1.81)	2,85
MIC	Palato	0.99 (1.17)	0.59 (1.08)	0.58 (1.09)	0.98 (1.16)	1.26 (1.14)	0,48
	Prótese	3.80 (0.86)	1.45 (1.69)	2.62 (1.96)	3.56 (1.85)	3.67 (1.87)	2,12

Todas as espécies de *Candida* identificadas no decorrer do estudo, em ambos os grupos de estudo, estão expostas abaixo nas Tabelas A15 e A16.

Tabela A15. Espécies de *Candida* identificadas nas coletas dos pacientes do grupo NIS

Paciente	dia 0		dia 14		dia 30		dia 60		dia 90	
	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT
1	Ca	Ca	0	<i>famata</i>	0	Ca	0	0	Ca	Ca
2	0	Ca	0	0	0	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
3	0	Ca	0	0	0	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
4	Ca	Ca	0	0	0	Ca	0	Ca	Ca	Ca
5	Ca	Ca	Ca	Ca, Ct, <i>paraplois</i>	Ca	Ca	Ca, Ct	Ca, Ct	Ca	Ca
6	Ca	Ca, Ct	Ca, <i>lusitaniae</i>	<i>krusei</i>	Ca	Ca	0	Ca, <i>zeylanoides</i>	Ca	Ca
7	0	Ca	0	0	Ca	Ca	0	Ca	0	0
8	Ca	Ca	0	0	Ca	Ca	0	0	Ca	0
9	0	Ca	0	Ca	0	Ca	0	Ca	0	Ca
10	Ca,Ct,Cg	Ca,Ct,Cg	0	0	0	Ca, Ct	0	Ca, Ct	0	Ct
11	0	Ca, Ct	0	Ca	0	Ca	0	Ca	0	Ca
12	Ca	Ca	0	0	0	Ca	Ca	Ca	0	Ca
13	Ca	Ca	0	Ca	0	Ca	0	Ca	Ca	Ca
14	Ca	Ca	0	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
15	0	Ca	0	0	0	0	Ca	Ca	Ca	Ca
16	Ca	Ca	0	0	0	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
17	0	Ca, Ct	0	Ca, Ct	0	Ca, Ct	0	Ca, Ct	Ca	Ca, Ct
18	0	Ca	0	0	<i>colliculosa</i>	<i>colliculosa,</i> <i>pelliculosa,</i> <i>sake, rugosa</i>	0	0	0	0
19	0	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	0	0
20	Ca	Ca	0	Ca	0	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca

Pa: mucosa palatina / PT: superfície interna da prótese total superior

Ca: *C. albicans* / Ct: *C. tropicalis* / Cg: *C. glabrata*.

Tabela A16. Espécies de *Candida* identificadas nas coletas dos pacientes do grupo MIC

Paciente	dia 0		dia 14		dia 30		dia 60		dia 90	
	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT	Pa	PT
1	Ca	Ca	Ca	Ca	0	Ca	0	Ca	Ca	Ca
2	Ca	Ca	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	Ca, Cg	0	Ca	0	Cg, <i>parapsilosis</i>	Cg	Ca, Cg	Ca, Cg	Ca, Cg
4	Ca	Ca	0	Ca	0	Ca	0	Ca	0	Ca
5	0	Ca	0	<i>parapsilosis</i>	0	0	0	Ca	0	Ca
6	Ca	Ca	Ca	0	0	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
7	0	Ca	0	0	0	Ca	Ca	Ca	0	Ca
8	Ca	Ca	0	0	0	0	0	0	Ca	0
9	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
10	0	Ca, Ct	Ca	Ca	Ca, <i>parapsilosis</i>	Ca	Ca, Cg	Ca, Cg	Ct	Ct
11	Ca	Ca, Cg, Ct	0	0	0	<i>lusitanae</i>	0	Ct	Ca, <i>parapsilosis</i>	Ca
12	Cg	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
13	Ca, Ct	Ca, Ct	0	0	0	0	Ca	Ca	Ca	Ca
14	0	Ca	0	0	0	0	<i>utilis</i>	Ca, Ct	0	Ca, Ct
15	0	Ca	0	0	0	0	0	0	0	0
16	Ca	Ca	0	0	0	<i>guilliermondii</i>	Ca	Ca, Ct	Ca	Ca, Ct
17	0	Ca	Ca	Ca, Ct, <i>lusitanae</i>	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
18	Ca	Ca	0	0	0	Ca	Ca	Ca	0	Ca
19	Ca, Cg	Ca, Cg, Ct	Ca	Ca, Cg, Ct	Ca, Cg	Ca, Cg, Ct	Ca, Cg	Ca, Cg	Ca, Cg	Ca, Cg, <i>famata</i>
20	0	Ca	0	Ca, Ct	0	Ca	0	Ca	0	Ca

Pa: mucosa palatina / PT: superfície interna da prótese total superior

Ca: *C. albicans* / Ct: *C. tropicalis* / Cg: *C. glabrata*.

## Apêndice - Capítulo 2

As principais espécies identificadas, em ambos os grupos, foram *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Outras espécies de *Candida* (*lusitanae*, *colliculosa*, *famata*, *parapsilosis*, *krusei*, *pelliculosa*, *sake*, *rugosa*, *zeylanoides*, *utilis* e *guilliermondi*) e micro-organismos dos gêneros *Cryptococcus* (*laurentii*, *humicola* e *albidus*), *Saccharomyces* (*cerevisiae* e *kluyverii*), *Kloeckera apiculata* e *Rhodotorula* (Tabela A17) também foram identificados em ambos os grupos de estudo, em menores frequências porcentuais.

Tabela A17. Outros micro-organismos identificados

Grupo	Coleta	Local da coleta	Micro-organismo
NIS	dia 0	Pa	<i>Rhodotorula</i>
NIS	dia 0	PT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NIS	dia 14	PT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NIS	dia 30	Pa	<i>Rhodotorula, Cryptococcus laurentii</i>
NIS	dia 30	PT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NIS	dia 60	Pa	<i>Kloeckera apiculata</i>
NIS	dia 60	PT	<i>Cryptococcus humicola</i>
NIS	dia 60	PT	<i>Cryptococcus humicola</i>
NIS	dia 60	PT	<i>Cryptococcus humicola</i>
NIS	dia 90	PT	<i>Cryptococcus humicola</i>
NIS	dia 90	Pa	<i>Cryptococcus humicola</i>
NIS	dia 90	PT	<i>Cryptococcus humicola</i>
NIS	dia 90	Pa	<i>Cryptococcus humicola</i>
NIS	dia 90	PT	<i>Saccharomyces kluyverii</i>
MIC	dia 0	PT	<i>Cryptococcus laurentii</i>
MIC	dia 0	Pa	<i>Cryptococcus albidus</i>
MIC	dia 0	Pa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MIC	dia 14	Pa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MIC	dia 60	PT	<i>Cryptococcus humicola</i>
MIC	dia 90	PT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MIC	dia 90	Pa	<i>Rhodotorula</i>
MIC	dia 90	Pa	<i>Rhodotorula</i>

Pa: mucosa palatina / PT: superfície interna da prótese total superior.

## Apêndice - Capítulo 2

De acordo com os resultados do teste do Qui-Quadrado para análise de várias proporções (Tabela A18), a *C. albicans* foi a espécie significativamente mais identificada ( $p < 0,01$ ), tendo sido isolada de 43% e 75,5% das mucosas palatinas e próteses, respectivamente. *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram as espécies não-*albicans* mais identificadas das coletas da mucosa palatina e prótese, não tendo sido encontradas diferenças significantes na sua frequência percentual ( $p > 0,05$ ). As prevalências de *C. albicans* e *C. tropicalis* isoladas das próteses foram significativamente superiores àquelas verificadas nas mucosas palatinas ( $p < 0,01$ ). Além disso, um número significativamente superior de coletas ausentes de micro-organismos foi verificado nas mucosas palatinas ( $p < 0,01$ ). Considerando os 40 pacientes incluídos na amostra, 15 (37,5%) apresentaram coletas mistas, ou seja, mais de uma espécie de *Candida* foi identificada. As misturas mais comumente identificadas foram *C. albicans* + *C. tropicalis* (41%), *C. albicans* + *C. glabrata* (25%) e *C. albicans* + *C. tropicalis* + *C. glabrata* (14%).

Tabela A18. Frequência porcentual (%) das diferentes espécies de *Candida* isoladas da mucosa palatina e da prótese

	Mucosa palatina	Prótese
<i>C. albicans</i>	43 <sup>a</sup>	75,5 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i>	2 <sup>b</sup>	13,5 <sup>bc</sup>
<i>C. glabrata</i>	4,5 <sup>bc</sup>	6 <sup>b</sup>
Outras*	8,5 <sup>c</sup>	11,5 <sup>bc</sup>
Coletas negativas	53 <sup>a</sup>	20 <sup>c</sup>

Barras horizontais conectam valores não significativamente diferentes ao nível de 5%

No sentido vertical, valores designados com as mesmas letras não são significativamente diferentes ao nível de 5%

\*Outras espécies de *Candida* e micro-organismos dos gêneros *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Kloeckera* e *Rhodotorula*.

O sumário dos valores do teste Kappa, das medidas do  $\tau$  de Kendall e do coeficiente de concordância, obtidos na análise de concordância entre os dois observadores, está exposto na Tabela A19. Considerando os escores

## Apêndice - Capítulo 2

obtidos durante o período de tratamento (0 e 14 dias), houve concordância substancial ( $\kappa=0,61$ )<sup>†</sup> e excelente correlação ( $\tau = 0.85$ )<sup>‡</sup> entre os observadores. Além disso, o coeficiente de concordância apresentou valor de 75%, ou seja, dos diagnósticos visuais auferidos, em 75% dos casos houve indicação do mesmo grau de inflamação pelos examinadores. Quando todos os períodos do estudo foram avaliados (0, 14, 30, 60 e 90 dias), houve uma diminuição no grau de concordância para um valor considerado, ainda, substancial ( $\kappa=0,42$ )<sup>†</sup>. Além disso, o coeficiente de concordância foi aproximadamente 60% e o valor de  $\tau$  de Kendall foi 0,77, indicando forte tendência de opinião semelhante entre os dois avaliadores. Imagens ilustrativas das fotografias intra-bucais das mucosas palatinas dos pacientes avaliadas pelos observadores estão expostas nas Figuras A1 e A2.

Tabela A19. Medidas de  $\kappa$ , coeficiente de concordância e  $\tau$  de Kendall, obtidas pela análise de concordância

Período de avaliação	Medidas		
	$\kappa$	Coefficiente de concordância	$\tau$
<b>Tratamento (0-14 dias)</b>	0,6155	75,00%	0,8581
<b>Todos (0, 14, 30, 60, 90 dias)</b>	0,4262	59,79%	0,7737

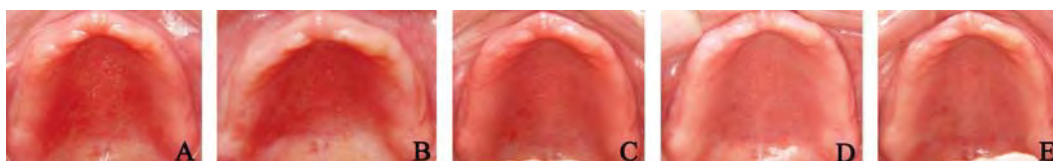


FIGURA A1. Fotografias intra-bucais da mucosa palatina de paciente do grupo NIS, realizadas no dia 0 (A), 14 (B) e nos controles posteriores de 30 (C), 60 (D) e 90 dias (E).

<sup>†</sup>Landis Jr and Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: 159-74.

<sup>‡</sup>Kendall MG. Rank correlation methods. London: Griffin; 1970.



*Apêndice - Capítulo 2*

FIGURA A2. Fotografias intra-buciais da mucosa palatina de paciente do grupo MIC, realizadas no dia 0 (A), 14 (B) e nos controles posteriores de 30 (C), 60 (D) e 90 dias (E).

A classificação dos graus da estomatite protética dos pacientes dos grupos NIS e MIC está exposta nas Tabelas A20 e A21. A classificação apresentada refere-se às avaliações clínicas das fotografias intra-buciais realizadas por um dos examinadores, devidamente calibrado. A aplicação do teste Exato de Fisher para a verificação de homogeneidade entre os dois grupos de estudo demonstrou que os diferentes graus de inflamação foram igualmente distribuídos no tempo inicial ( $p=0,6514$ ). A Tabela A22 descreve a aplicação do teste Mann-Whitney para verificar a evolução do grau de inflamação nos dois grupos ao longo do tempo por meio do número de pacientes que se enquadraram em cada chave da variável categórica previamente definida. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ) entre a magnitude da eficácia de ambos os tratamentos na evolução da infecção ao longo do tempo. Ambos os tratamentos foram considerados efetivos no tratamento da estomatite protética. A partir do dia 14 até o dia 60, pelo menos 50% dos pacientes tratados apresentaram uma diminuição no grau da infecção. Além disso, ao final do controle posterior de 90 dias, aproximadamente 42% dos pacientes tratados ainda apresentavam diminuição no grau de infecção.

*Apêndice - Capítulo 2*

Tabela A20. Grau da estomatite protética, antes de iniciar o tratamento, ao seu final e após 30, 60 e 90 dias do seu início, para os pacientes do grupo NIS

<b>Paciente</b>	<b>dia 0</b>	<b>dia 14</b>	<b>dia 30</b>	<b>dia 60</b>	<b>dia 90</b>
<b>1</b>	II	0	I	0	I
<b>2</b>	I	0	II	I	0
<b>3</b>	I	0	0	0	II
<b>4</b>	II	I	II	II	II
<b>5</b>	III	III	II	II	II
<b>6</b>	II	II	II	I	II
<b>7</b>	II	II	I	II	0
<b>8</b>	II	II	II	II	II
<b>9</b>	II	II	I	II	III
<b>10</b>	I	0	0	0	0
<b>11</b>	II	II	II	II	I
<b>12</b>	III	II	II	II	II
<b>13</b>	II	I	I	I	I
<b>14</b>	II	I	II	II	II
<b>15</b>	II	II	II	I	I
<b>16</b>	II	II	II	II	II
<b>17</b>	II	0	II	I	II
<b>18</b>	I	0	0	0	0
<b>19</b>	II	0	II	II	---
<b>20</b>	II	0	0	II	II

*Apêndice - Capítulo 2*

Tabela A21. Grau da estomatite protética, antes de iniciar o tratamento, ao seu final e após 30, 60 e 90 dias do seu início, para os pacientes do grupo MIC

<b>Paciente</b>	<b>dia 0</b>	<b>dia 14</b>	<b>dia 30</b>	<b>dia 60</b>	<b>dia 90</b>
<b>1</b>	I	II	I	III	III
<b>2</b>	III	II	II	0	0
<b>3</b>	II	II	0	0	II
<b>4</b>	II	0	0	I	0
<b>5</b>	II	II	0	I	0
<b>6</b>	II	II	II	II	II
<b>7</b>	II	II	I	I	III
<b>8</b>	II	II	0	0	0
<b>9</b>	II	0	0	0	0
<b>10</b>	II	III	III	I	II
<b>11</b>	I	0	0	II	I
<b>12</b>	II	0	II	II	II
<b>13</b>	III	0	I	II	III
<b>14</b>	I	0	I	II	I
<b>15</b>	I	0	II	0	II
<b>16</b>	II	II	III	II	II
<b>17</b>	I	II	II	II	I
<b>18</b>	III	III	II	II	II
<b>19</b>	II	II	II	0	II
<b>20</b>	I	0	II	I	I

*Apêndice - Capítulo 2*

Tabela A22. Número de pacientes em cada chave da variável categórica, em ambos os grupos de estudo

Período*	Chave	Grupo		valor de <i>p</i>
		NIS	MW	
14	P2	0	0	0,8182
	P1	0	3	
	E	8	8	
	M1	8	5	
	M2	4	3	
	M3	0	1	
30	P2	0	0	1,0000
	P1	1	5	
	E	9	5	
	M1	9	4	
	M2	1	6	
	M3	0	0	
60	P2	0	1	0,4394
	P1	0	3	
	E	10	4	
	M1	9	7	
	M2	1	4	
	M3	0	1	
90	P2	0	1	0,6667
	P1	2	2	
	E	7	11	
	M1	9	1	
	M2	1	4	
	M3	0	1	

\*Para a verificação da evolução da inflamação ao longo do tempo, todos os períodos pós-tratamento foram comparados com a situação no tempo inicial (0).

A quantidade de cura e recidiva da infecção para os dois grupos de estudo estão expostas na Tabela A23. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ) no número de pacientes curados após os dois tratamentos instituídos pelo teste Exato de Fisher. Ao final dos tratamentos, 40% dos pacientes de ambos os grupos estavam curados. Nos períodos de controle posterior, o grupo NIS apresentava 20% dos seus pacientes curados. No grupo

## *Apêndice - Capítulo 2*

MIC, 30% dos pacientes ainda estavam curados nos dias 30 e 60 e 25% estavam curados no dia 90. Também não foram identificadas diferenças significantes ( $p>0,05$ ) nas porcentagens de pacientes com recidivas entre os dois grupos de estudo. No dia 90, 40% e 55% dos pacientes dos grupos NIS e MIC, respectivamente, demonstraram piora do quadro clínico da infecção em comparação à situação clínica observada em cada um dos períodos avaliados.

Tabela A23. Número de pacientes curados e com recidiva, em ambos os grupos de estudo

<b>Grupo</b>	<b>CURA</b>				<b>RECIDIVA</b>
	<b>Período</b>				<b>Período*</b>
	<b>14</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>90 – 60/30/14</b>
<b>NIS</b>	8	4	4	4	8
<b>MW</b>	8	6	6	5	11
<b>valor de <math>p</math></b>	0,4815	0,4079	0,6548	0,820	0,5273

\*Para a verificação da porcentagem de recidiva, foi considerado o número de pacientes que apresentou piora no grau de inflamação aos 90 dias com relação ao grau observado em cada um dos tempos.



## **Candida spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis**

Paula Volpato Sanitá, DDS, MSc,<sup>a</sup> Ana Cláudia Pavarina, DDS, MSc, PhD,<sup>b</sup> Eunice Teresinha Giampaolo, DDS, MSc, PhD,<sup>c</sup> Mariana Montenegro Silva, DDS, MSc, PhD,<sup>d</sup> Ewerton Garcia de Oliveira Mima, DDS, MSc, PhD,<sup>e</sup> Daniela Garcia Ribeiro, DDS, MSc, PhD,<sup>f</sup> and Carlos Eduardo Vergani, DDS, MSc, PhD,<sup>c</sup> Araraquara, São Paulo, Bragança Paulista, and Ponta Grossa, Brazil  
UNESP-UNIV ESTADUAL PAULISTA, CAMILO CASTELO BRANCO UNIVERSITY, SÃO FRANCISCO UNIVERSITY, AND PONTA GROSSA STATE UNIVERSITY

**Objective.** The aim of this study was to compare the prevalence of *Candida* spp. in diabetics and nondiabetics with and without denture stomatitis (DS).

**Study design.** Mycologic samples were taken from the dentures of 90 healthy subjects (control group [CG]), 80 denture stomatitis nondiabetics (DSND), and 40 denture stomatitis diabetics (DSD; well controlled type 2) for identification of *Candida* spp. Results were analyzed by Fisher exact test, Bonferroni-corrected confidence interval, and  $\chi^2$  test ( $\alpha = .05$ ).

**Results.** *Candida albicans* was the predominant species isolated (81.9%;  $P < .016$ ), with *C. tropicalis* and *C. glabrata* demonstrating similar prevalence (15.71% and 15.24%, respectively). The prevalence of *C. albicans* and *C. tropicalis* in the DS groups were significantly higher ( $P < .01$ ) than in the CG. The prevalence of *C. tropicalis* significantly increased with the highest degree of inflammation ( $P < .05$ ).

**Conclusions.** The prevalence of *Candida* spp. was similar between diabetic and nondiabetic patients with DS. *Candida tropicalis* may play a role in the progression of DS. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;111:726-733)

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder that is becoming one of the most important chronic diseases worldwide. It has been estimated that the number of adults with diabetes in the world will rise to 300 million by the year 2025.<sup>1</sup> The relationship between diabetes and oral candidiasis has been extensively studied in the literature,<sup>2-13</sup> particularly because diabetic patients are more susceptible to fungal infections than those without diabetes.<sup>2-4,10</sup> Yeast adhesion to epithelial cell surfaces is recognized as an essential first step in the process of

candidal colonization and subsequent infection.<sup>14</sup> Salivary glucose levels in diabetic patients favors yeast growth owing to increased numbers of available receptors for *Candida*.<sup>15</sup> Consequently, buccal cells from diabetic patients have shown an increased adherence of *C. albicans* compared with buccal cells from nondiabetics.<sup>3,4</sup> The microvascular degeneration found in histologic examination of diabetic patients may also predispose to *Candida* colonization,<sup>16</sup> making them more susceptible to infections. Another host factor that may promote the oral carriage of *Candida* in diabetics is the possible defects in candidacidal activity of neutrophils, particularly in the presence of glucose.<sup>17</sup> Reduced salivary flow, associated with diabetes, may also play a role in *Candida* colonization and, consequently, in the pathogenesis of oral candidiasis in these patients.<sup>8</sup>

The presence of a denture in the oral cavity, associated with the local alterations of the oral mucosa and the systemic complications, may render the denture wearer patient with diabetes even more prone to candidal infection.<sup>4,5,7,10,11</sup> A significantly higher incidence of *Candida* infection and increased levels of *Candida* spp. were found in diabetic patients wearing removable dentures.<sup>7,10,11</sup> The presence of a removable denture may decrease the salivary pH and saliva flow rate and impede the mechanical cleaning of the soft

Supported by the São Paulo Research Foundation (grant: 05/03226-3, 05/02384-4, 05/04695-7, and 06/02842-5).

<sup>a</sup>PhD student, Araraquara Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista.

<sup>b</sup>Associate Professor, Araraquara Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista.

<sup>c</sup>Professor, Araraquara Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista.

<sup>d</sup>Assistant Professor, School of Dentistry, Camilo Castelo Branco University.

<sup>e</sup>Assistant Professor, School of Dentistry, São Francisco University.

<sup>f</sup>Assistant Professor, Department of Dentistry, Ponta Grossa State University.


Received for publication Nov 24, 2010; returned for revision Feb 14, 2011; accepted for publication Feb 19, 2011.

1079-2104/\$ - see front matter


© 2011 Mosby, Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.tripleo.2011.02.033

[Overview](#) | [Log out](#)



**Progress Report  
manuscript: 2754**

 [Help for this page](#)


**Manuscript title:** Denture microwave disinfection versus nystatin in treating well-controlled type 2 diabetics with denture stomatitis. A randomized clinical trial

**Manuscript type:** Original Article

**All Authors:** Carlos Eduardo Vergani, Paula Volpato Sanitá, Ana Lucia Machado, Ana Claudia Pavarina, Elaine Maria Sgavioli Massucato, Arnaldo Lopes Colombo,

**Keywords:** Diabetes mellitus; Denture stomatitis; Complete denture; Microwaves; Nystatin

**Download/view manuscript**

 1st manuscript submission file (287kB)

Status: **Reviews Completed**

Submission number: 2

Date Received: 2011-05-06

Weeks under review: 4

Requests sent: 2

Reviewers agreed: 2

Reviews completed: 2



### Anexo 3 Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Instituição

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

 CEP  
Comitê de Ética em Pesquisa

## Certificado

**Certificamos** que o projeto de pesquisa intitulado "**EFETIVIDADE DA DESINFECÇÃO DE PRÓTESES TOTAIS POR MICROONDAS NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA À CANDIDA SPP. DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS**", sob o protocolo nº 06/06, de responsabilidade do Pesquisador (a) **CARLOS EDUARDO VERGANI**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 01 (um) ano, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

**Certify** that the research project titled "**EFFECTIVENESS OF MICROWAVE DISINFECTION OF COMPLETE DENTURES ON THE TREATMENT OF CANDIDA-RELATED DENTURE STOMATITIS OF DIABETES MELLITUS PATIENTS**", protocol number 06/06, under Dr **CARLOS EDUARDO VERGANI** responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 01 (one) year when the final review of this study will occur.  
Araraquara, 07 de Junho de 2006.

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Mirian Aparecida Onofre**  
Coordenadora

## Anexo 4 Ficha clínica

**unesp**  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE ARARAQUARA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rua Humaitá, 1680 - CEP 14801-903 - Araraquara - SP - Brasil - FONE (16) 33016410 - FAX (16) 33016404

ID do paciente: \_\_\_\_\_

Grupo de Tratamento: \_\_\_\_\_

### FICHA CLÍNICA

**“Efetividade da desinfecção de próteses totais por microondas no tratamento da estomatite protética associada à *Candida* spp. de pacientes com diabetes mellitus”**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M ( ) F ( ) Raça: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Fones: \_\_\_\_\_

### HISTÓRIA DO DIABETES MELLITUS (TIPO II)

- Tempo de diagnóstico \_\_\_\_\_ - Tratamento: ( ) 1. Dieta, ( ) 2. Insulina, ( ) 3. Hipoglicemiantes

### QUESTIONÁRIO DE SAÚDE GERAL:

1. Está em tratamento médico: ( ) Não ( ) Sim \_\_\_\_\_

2. Está tomando algum medicamento? ( ) Não ( ) Sim

1. Antihipertensivos

5. Anticoagulantes

9. Antibióticos

2. Antidepressivos

6. Analgésicos

10. Anticoncepcionais

3. Ansiolíticos

7. Anticonvulsivantes

11. Outros

4. Antialérgicos

8. Corticóides

Descrição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Anexo 4

3. Apresenta algum problema de saúde relacionado aos seguintes sistemas? ( ) Não ( ) Sim

- |   |   |  |
|---|---|--|
| 1. Cardiovascular <input type="checkbox"/>  | 5. Neurológico <input type="checkbox"/>   | 9. Respiratório <input type="checkbox"/>         |
| 2. Endócrino <input type="checkbox"/>       | 6. Dermatológico <input type="checkbox"/> | 10. Gastrointestinal <input type="checkbox"/>    |
| 3. Genito-urinário <input type="checkbox"/> | 7. Psiquiátrico <input type="checkbox"/>  | 11. Músculo/esquelético <input type="checkbox"/> |
| 4. Hematológico <input type="checkbox"/>    | 8. Imunológico <input type="checkbox"/>   | 12. Outro <input type="checkbox"/>               |

Descrição: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

4. Vícios:

- Tabaco: ( ) Não ( ) Sim ( ) Ex-Tabagista Há quanto tempo? \_\_\_\_\_  
 Quantidade \_\_\_\_\_ ( ) Fuma ( ) Masca - Tipo \_\_\_\_\_  
 - Álcool: ( ) Não ( ) Sim ( ) Ex-Álcoolista Há quanto tempo? \_\_\_\_\_  
 Quantidade \_\_\_\_\_ - Tipo \_\_\_\_\_

### QUESTIONÁRIO DE SAÚDE BUCAL E AVALIAÇÃO DA(S) PRÓTESES:

1. Há quanto tempo é desdentado? Superior: \_\_\_\_\_ Inferior: \_\_\_\_\_  
 2. Há quanto usa prótese? Superior: \_\_\_\_\_ Inferior: \_\_\_\_\_  
 3. Há quanto tempo usa a(s) prótese(s) atual(is)? PT Superior: \_\_\_\_\_ Inferior: \_\_\_\_\_ - Tipo: \_\_\_\_\_  
 4. Frequência de uso: ( ) Contínuo ( ) Esporádico  
 4.1. Retira pra dormir? ( ) Não ( ) Sim  
 5. Condições da(s) prótese(s) atual(is):  
 - Suporte: ( ) Adequado ( ) Inadequado - Estabilidade: ( ) Adequada ( ) Inadequada  
 - Retenção: ( ) Adequada ( ) Inadequada - Adaptação: ( ) Adequada ( ) Inadequada  
 6. Condições de higienização da(s) prótese(s):  
 Superior: ( ) Boa ( ) Satisfatória ( ) Regular ( ) Insatisfatória  
 Placa: ( ) Não ( ) Sim - Cálculo: ( ) Não ( ) Sim  
 Inferior: ( ) Boa ( ) Satisfatória ( ) Regular ( ) Insatisfatória  
 Placa: ( ) Não ( ) Sim - Cálculo: ( ) Não ( ) Sim  
 7. Sente a boca seca? ( ) Não ( ) Sim  
 8. Condições de higiene bucal: ( ) Boa ( ) Satisfatória ( ) Regular ( ) Insatisfatória  
 8.1. Escovação da língua: ( ) Não ( ) Sim

## Anexo 4

### **1º. CONSULTA ( \_\_/\_\_/\_\_ ):**

**1. FOTOGRAFIAS INTRA-ORAIS – números:** \_\_\_\_\_

#### **2. AVALIAÇÃO INTRA-ORAL:**

- Estomatite protética: Grau: ( ) I ( ) II ( ) III

\* Sintomatologia dolorosa: ( ) Não ( ) Sim / \* Glossite rombóide mediana: ( ) Não ( ) Sim

\* Queilite angular: ( ) Não ( ) Sim

### **1º. RETORNO – fim do tratamento ( \_\_/\_\_/\_\_ ):**

**1. FOTOGRAFIAS INTRA-ORAIS – números:** \_\_\_\_\_

#### **2. AVALIAÇÃO INTRA-ORAL:**

- Estomatite protética: ( ) Presente ( ) Ausente / \* Grau: ( ) I ( ) II ( ) III

\* Sintomatologia dolorosa: ( ) Não ( ) Sim / \* Glossite rombóide mediana: ( ) Não ( ) Sim

\* Queilite angular: ( ) Não ( ) Sim

### **2º. RETORNO – 30 DIAS após o tratamento ( \_\_/\_\_/\_\_ ):**

**1. FOTOGRAFIAS INTRA-ORAIS – números:** \_\_\_\_\_

#### **2. AVALIAÇÃO INTRA-ORAL:**

- Estomatite protética: ( ) Presente ( ) Ausente / \* Grau: ( ) I ( ) II ( ) III

\* Sintomatologia dolorosa: ( ) Não ( ) Sim / \* Glossite rombóide mediana: ( ) Não ( ) Sim

\* Queilite angular: ( ) Não ( ) Sim

### **3º. RETORNO – 60 DIAS após o tratamento ( \_\_/\_\_/\_\_ ):**

**1. FOTOGRAFIAS INTRA-ORAIS – números:** \_\_\_\_\_

#### **2. AVALIAÇÃO INTRA-ORAL:**

- Estomatite protética: ( ) Presente ( ) Ausente / \* Grau: ( ) I ( ) II ( ) III

\* Sintomatologia dolorosa: ( ) Não ( ) Sim / \* Glossite rombóide mediana: ( ) Não ( ) Sim

\* Queilite angular: ( ) Não ( ) Sim

### **4º. RETORNO – 90 DIAS após o tratamento ( \_\_/\_\_/\_\_ ):**

**1. FOTOGRAFIAS INTRA-ORAIS – números:** \_\_\_\_\_

#### **2. AVALIAÇÃO INTRA-ORAL:**

- Estomatite protética: ( ) Presente ( ) Ausente / \* Grau: ( ) I ( ) II ( ) III

\* Sintomatologia dolorosa: ( ) Não ( ) Sim / \* Glossite rombóide mediana: ( ) Não ( ) Sim

\* Queilite angular: ( ) Não ( ) Sim

*Anexo 4***IRRADIAÇÕES:** \_\_\_\_/\_\_\_\_; \_\_\_\_/\_\_\_\_; \_\_\_\_/\_\_\_\_; \_\_\_\_/\_\_\_\_; \_\_\_\_/\_\_\_\_; \_\_\_\_/\_\_\_\_.**AVALIAÇÃO E CONTROLE DO DIABETES MELLITUS:**

- Pressão Arterial: \_\_\_\_\_

- Resultado dos exames:

Exame	Resultados (dias)				Valor de referência
	0	30	60	90	
Glicemia de jejum					90 – 130 mg/dL
Glicemia pós-prandial (2 horas)					até 180 mg/dL
Hemoglobina glicosilada (HbA1C)					até 7%
Lipidograma:					
- Colesterol					< 200 mg/dL
- Triglicérides					< 150 mg/dL
- HDL colesterol					> 40 mg/dL
- LDL colesterol					< 100 mg/dL
Creatinina					0,4 – 1,3 mg/dL
Urina tipo 1					
- Proteínas					Ausente
- Glicose					Ausente
- Nítrito					Ausente
- Leucócitos					até 10 un/campo x 400
<b>DATA</b> de realização dos exames					-----

- Observação importante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Anexo 5 Termos de consentimento

ANEXO 3

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(GRUPO 1: PACIENTES TRATADOS COM NISTATINA)

Por esse instrumento particular declaro, para os fins éticos e legais, que eu, (nome) \_\_\_\_\_, (nacionalidade) \_\_\_\_\_, portador do RG n° \_\_\_\_\_, C.P.F. n° \_\_\_\_\_ residente à \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, concordo voluntariamente em participar da pesquisa "EFETIVIDADE DA DESINFECÇÃO DE PRÓTESES TOTAIS POR MICROONDAS NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA À *CANDIDA SPP. DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS*", sob responsabilidade do cirurgião-dentista Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani e de sua orientada, a cirurgiã-dentista Paula Volpato Sanitá, que executará a pesquisa. Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1 – Fui devidamente informado sobre os conceitos de estomatite protética e, portanto, conscientizado que sou portador dessa doença. Fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo avaliar a efetividade de métodos de tratamento da estomatite protética em pacientes com diabetes mellitus do Tipo 2. Para tanto, serei submetido a exames clínicos que possibilitarão constatar o estado atual da estomatite protética que possuo, bem como os efeitos do tratamento ao qual me submeterei.
- 2 – Fui devidamente informado que somente iniciarei o tratamento após demonstrar, ao pesquisador responsável, exame de sangue e laudo médico que comprovem que sou portador de diabetes mellitus Tipo 2. Fui informado também que, para avaliação inicial do diabetes mellitus e para o controle posterior da doença durante todo o desenvolvimento da pesquisa, alguns exames serão solicitados, periodicamente, pelo especialista em Endocrinologia que supervisiona a evolução de minha doença - Dr. Reginaldo Rigoto Giovani, CRM - 48348. Esses exames já são realizados periodicamente por mim, com o objetivo de controlar o diabetes mellitus e as possíveis infecções que podem interferir na compensação da minha doença. Assim, não haverá alteração na rotina de exames à qual já me submeto. Com base nas recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes – 2006 e do Standards of Medical Care in Diabetes – 2007, serão solicitados os exames: Glicemia de jejum; Glicemia pós-prandial (2

Protocolo CEP Nº 06/06

Aprovado em Reunião de

27/11/07

6

## Anexo 5

ANEXO 3

horas); Hemoglobina glicosilada (HbA1C), Lipidograma; Creatinina; Urina tipo 1. Ainda, estou ciente que apenas iniciarei a pesquisa em questão com a autorização por escrito do meu médico.

A descrição dos exames solicitados, bem como a frequência de realização, estão expostos no quadro abaixo.

Quadro 1: Metodologia de exames dos pacientes selecionados na amostra

Exame	Repetição			
	1ª. consulta	Controle Posterior		
		30 dias	60 dias	90 dias
Glicemia de jejum	X	X	X	X
Glicemia pós-prandial (2 horas)	X	X	X	X
Hemoglobina glicosilada HbA1C	X			X
Lipidograma				
- Colesterol total				
- Colesterol HDL	X			X
- Colesterol LDL				
- Triglicerídes				
Creatinina	X			
Urina tipo 1	X			

3 – Fui informado que os exames serão realizados junto ao **Laboratório São Lucas de Análises Clínicas**, onde profissionais especializados serão responsáveis pelas coletas de sangue e urina, bem como pela análise dos materiais coletados, e que uma 2ª via dos resultados dos referidos exames ficará em posse do Pesquisador Responsável. Com relação à coleta de sangue à qual me submeterei, fui informado que todo o material utilizado será estéril e descartável e que poderá aparecer, no local perfurado pela agulha, uma região arroxeadada (hematoma). Dessa forma, fui instruído a realizar leve pressão sobre o local da perfuração da agulha e repouso com o braço por algumas horas, com o objetivo de evitar o aparecimento dessa lesão. Fui, ainda, informado sobre outros eventuais riscos que poderão advir da coleta de sangue: sensação de mal-estar, náusea, fraqueza, vertigem e/ou palidez, podendo evoluir a um desmaio, e que receberei total assistência especializada no momento e após a realização das coletas.

4 – Fui informado que serei medicado com Nistatina gel Oral, um antifúngico utilizado para o tratamento de estomatite protética. Esse medicamento deverá ser aplicado no palato (céu da boca), três vezes ao dia durante 15 dias. Estou ciente que, com a utilização desse medicamento, há possibilidade de ocorrer náuseas, vômitos ou diarreia e, raramente, reação alérgica. Fui também esclarecido que não receberei nenhuma forma de tratamento odontológico como parte do estudo.

Protocolo CEP nº 06/06

Aprovado em Reunião

27/11/07

## Anexo 5

ANEXO 3

5 – Fui esclarecido que os pacientes participantes desta pesquisa não serão prejudicados, uma vez que os tratamentos que serão realizados são bastante estudados e já foram realizados em seres vivos. Fui também conscientizado sobre utilização da medicação quanto à quantidade, forma e período de utilização. Fui orientado quanto à importância dos meus retornos para avaliação do tratamento e da necessidade da minha colaboração na higienização das minhas próteses com creme dental e escova, além de não utilizá-las durante o sono. Estou ciente de que, durante os exames, o operador estará protegido com luvas descartáveis, máscara, gorro e óculos, e todo o instrumental clínico será esterilizado. Receberei informações, orientações e tratamento necessários caso não ocorra melhora da estomatite protética após 15 dias do início do tratamento.

6 – Estou ciente que devo retornar 6 vezes à Faculdade de Odontologia de Araraquara, não recebendo cobertura de gastos pra transporte.

7 – Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas ao tratamento e que possuo plena liberdade para desistir desta pesquisa, retirando meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.

8 – Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos com a pesquisa. Recebi a garantia do sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

9 – Caso haja qualquer problema odontológico durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contatar o pesquisador responsável, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, pelo telefone (16) 3301-6410.

10 – Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade de consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação adicional em relação à pesquisa da qual participo, no telefone (16)33016431.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, ..... de ..... de 200.....

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Paula Volpato Sanitá

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos E. Vergani

protocolo CEP Nº 06/06

Aprovado em Reunião

27/11/07

\_\_\_\_\_



ANEXO 4

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(GRUPO 2: PACIENTES CUJAS PRÓTESES TOTAIS SUPERIORES SERÃO IRRADIADAS POR MICROONDAS)**

Por esse instrumento particular declaro, para os fins éticos e legais, que eu, (nome) \_\_\_\_\_, (nacionalidade) \_\_\_\_\_, portador do RG nº \_\_\_\_\_, C.P.F. nº \_\_\_\_\_ residente à \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, concordo voluntariamente em participar da pesquisa “EFETIVIDADE DA DESINFECÇÃO DE PRÓTESES TOTAIS POR MICROONDAS NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA À *CANDIDA SPP.* DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS”, sob responsabilidade do cirurgião-dentista Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani e de sua orientada, a cirurgiã-dentista Paula Volpato Sanitá, que executará a pesquisa. Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1 – Fui devidamente informado sobre os conceitos de estomatite protética e, portanto conscientizado que sou portador dessa doença. Fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo avaliar a efetividade de métodos de tratamento da estomatite protética em pacientes com diabetes mellitus Tipo 2, ou seja, que não fazem uso de insulina. Para tanto, serei submetido a exames clínicos que possibilitarão constatar o estado atual da estomatite protética que possuo, bem como os efeitos do tratamento ao qual me submeterei.

2 – Fui devidamente informado que somente iniciarei o tratamento após demonstrar, ao pesquisador responsável, exame de sangue e laudo médico que comprovem que sou portador de diabetes mellitus Tipo 2. Fui informado também que, para avaliação inicial do diabetes mellitus e para o controle posterior da doença durante todo o desenvolvimento da pesquisa, alguns exames serão solicitados, periodicamente, pelo especialista em Endocrinologia que supervisiona a evolução de minha doença - Dr. Reginaldo Rigoto Giovani, CRM - 48348. Esses exames já são realizados periodicamente por mim, com o objetivo de controlar o diabetes mellitus e as possíveis infecções que podem interferir na compensação da minha doença. Assim, não haverá alteração na rotina de exames à qual já me submeto. Com base nas recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes – 2006 e do Standards of Medical Care in Diabetes – 2007, serão solicitados os exames: Glicemia de jejum; Glicemia pós-prandial (2

Protocolo CEP Nº 06/06

Aprovado em Reunião

27/11/07

\_\_\_\_\_

## Anexo 5

## ANEXO 4

horas); Hemoglobina glicosilada, (HbA1C); Lipidograma; Creatinina; Urina tipo 1. Ainda, estou ciente que apenas iniciarei a pesquisa em questão com a autorização por escrito do meu médico.

A descrição dos exames solicitados, bem como a frequência de realização, estão expostos no quadro abaixo.

Quadro 1: Metodologia de exames dos pacientes selecionados na amostra

Exame	Repetição			
	1ª. consulta	Controle Posterior		
		30 dias	60 dias	90 dias
Glicemia de jejum	X	X	X	X
Glicemia pós-prandial (2 horas)	X	X	X	X
Hemoglobina glicosilada HbA1C	X			X
Lipidograma				
- Colesterol total				
- Colesterol HDL	X			X
- Colesterol LDL				
- Triglicerídeos				
Creatinina	X			
Urina tipo 1	X			

3 – Fui informado que os exames serão realizados junto ao **Laboratório São Lucas de Análises Clínicas**, onde profissionais especializados serão responsáveis pelas coletas de sangue e urina, bem como pela análise dos materiais coletados, e que uma 2ª via dos resultados dos referidos exames ficará em posse do Pesquisador Responsável. Com relação à coleta de sangue à qual me submeterei, fui informado que todo o material utilizado será estéril e descartável e que poderá aparecer, no local perfurado pela agulha, uma região arroxeadada (hematoma). Dessa forma, fui instruído a realizar leve pressão sobre o local da perfuração da agulha e repouso com o braço por algumas horas, com o objetivo de evitar o aparecimento dessa lesão. Fui, ainda, informado sobre outros eventuais riscos que poderão advir da coleta de sangue: sensação de mal-estar, náusea, fraqueza, vertigem e/ou palidez, podendo evoluir a um desmaio, e que receberei total assistência especializada no momento e após a realização das coletas.

4 – Fui informado que minha prótese será submetida ao tratamento com as microondas, 3 (três) vezes por semana durante 15 (quinze) dias. Não receberei nenhuma forma de tratamento odontológico como parte do estudo, a menos que minha prótese seja alterada durante a realização do tratamento proposto.

5 – Fui esclarecido que os pacientes participantes desta pesquisa não serão prejudicados, uma vez que os tratamentos que serão realizados são bastante estudados e já foram realizados em seres vivos. Fui

Protocolo CEP nº 06/06

Aprovado em Reunião de

27/11/07

## Anexo 5

## ANEXO 4

também conscientizado de que o tratamento pela irradiação por microondas vai ser realizado apenas em minha prótese total superior e não traz riscos ao meu estado de saúde. Fui orientado quanto à importância dos meus retornos para o tratamento das próteses em microondas. Além disso, devo retornar periodicamente para avaliação da estomatite protética. Também fui orientado a higienizar minhas próteses com creme dental e escova e a não utilizá-las durante o sono. Estou ciente de que, durante os exames, o operador estará protegido por meio da utilização de luvas descartáveis, máscara, gorro e óculos, e todo o instrumental clínico será esterilizado. Receberei informações, orientações e tratamento necessários caso não ocorra melhora da estomatite protética após 15 dias do início do tratamento.

6 – Estou ciente que devo retornar 6 vezes à Faculdade de Odontologia de Araraquara, não recebendo cobertura de gastos para transporte.

7 – Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas à metodologia e que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.

8 – Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras dos dados obtidos com a pesquisa. Recebi a garantia do sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

9 – Caso haja qualquer problema odontológico durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contatar o pesquisador responsável, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, pelo telefone (16) 3301-6410.

10 – Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade de consultar o Comitê de Ética em Pesquisa para qualquer informação adicional em relação à pesquisa da qual participo, no telefone (16)33016431.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, lido e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, ..... de ..... de 200.....

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Paula Volpato Sanitá

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos E. Vergani

Protocolo CEP nº 06/06  
Aprovado em Reunião  
27/11/07  
le

## *Anexo 6* Instruções



### INSTRUÇÕES

1. Você deverá realizar a limpeza de suas dentaduras 4 vezes ao dia: ao acordar, após o almoço, após o jantar e antes de dormir.
2. Apenas a dentadura de cima deverá ser escovada com a escova dental fornecida e sabão de coco. Os dentes restantes, outras dentaduras ou pontes e a língua também devem ser escovados com pasta dental e a escova de dente do próprio paciente. Caso possua dentes naturais, passar fio dental durante a limpeza.
3. Você não deve dormir com suas dentaduras. Após a última limpeza antes de dormir, coloque as dentaduras em um recipiente com água filtrada, deixando-as totalmente imersas. NÃO coloque substâncias como água sanitária neste recipiente com água. Estas substâncias podem prejudicar suas dentaduras.
4. Após cada limpeza, com as dentaduras fora da boca, você deve fazer bochecho com a medicação fornecida. Esse bochecho deve ser feito com a quantidade de 1 conta-gotas, durante 1 minuto. Após o bochecho, descartar a medicação e recolocar as dentaduras. Esses bochechos também devem ser realizados 4 vezes ao dia: ao acordar, após o almoço, após o jantar e antes de dormir.
5. **IMPORTANTE:** apenas antes de dormir, após o bochecho, coloque as dentaduras em recipiente com água. Lembre-se de dormir sem as dentaduras!!!

*Dra. Paula Volpato Sanitá*  
CROSP 86435

INSTRUÇÕES

1. Você deverá realizar a limpeza de suas dentaduras 4 vezes ao dia: ao acordar, após o almoço, após o jantar e antes de dormir.
2. Apenas a dentadura de cima deverá ser escovada com a escova dental fornecida e sabão de coco. Os dentes restantes, outras dentaduras ou pontes e a língua também devem ser escovados com pasta dental e a escova de dente do próprio paciente. Caso possua dentes naturais, passar fio dental durante a limpeza.
3. Você não deve dormir com suas dentaduras. Após a última limpeza antes de dormir, coloque as dentaduras em um recipiente com água filtrada, deixando-as totalmente imersas. **NÃO** coloque substâncias como água sanitária neste recipiente com água. Estas substâncias podem prejudicar suas dentaduras.

*Dra. Paula Volpato Sanitá*  
CROSP 86435

## *Anexo 7* Orientações para realização dos exames

### SÃO LUCAS

#### Laboratório de Análises Clínicas

Avenida Feijó, 1013, Centro. Araraquara, SP. Fone: (16) 33358474

#### ORIENTAÇÕES PARA A REALIZAÇÃO DOS EXAMES

- |   |   |   |
|---|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Glicemia em jejum</li><li>2. Hemoglobina glicosilada (HBA1C)</li><li>3. Colesterol (HDL e LDL colesterol)</li><li>4. Triglicérides</li><li>5. Creatinina</li><li>6. Urina tipo 1</li></ol> | } | <p>Comparecer ao Laboratório no período da manhã, em jejum de 12 horas.</p> <p>Não se esqueça de realizar uma <u>dieta alimentar</u> previamente à realização dos exames.</p> |
|---|---|---|

7. Glicemia Pós Prandial (Pós Almoço)

Almoçar entre 12h e 13h. Assim que terminar a refeição, marcar 2 horas no relógio e comparecer, nesse horário, para a coleta dos exames.

**ATENÇÃO:** a coleta de sangue deve ser realizada exatamente 2 horas após o almoço. O Laboratório irá tolerar atrasos de 10 minutos, apenas.

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor).

Araraquara, 26 de Maio de 2011.

**PAULA VOLPATO SANITÁ**