



Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ewerton Garcia de Oliveira Mima

***Viabilidade da Utilização da Terapia
Fotodinâmica no Tratamento da
Estomatite Protética. Estudos in vivo.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Prótese.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

Araraquara

2009

Mima, Ewerton Garcia de Oliveira

Viabilidade de utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite protética. Estudos in vivo / Ewerton Garcia de Oliveira Mima . – Araraquara: [s.n.], 2009.

156 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora : Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia 2. Candida 3. Candidíase bucal 4. Estomatite
sob prótese 5. Nistatina I. Título

EWERTON GARCIA DE OLIVEIRA MIMA

*Viabilidade da Utilização da Terapia Fotodinâmica no
Tratamento da Estomatite Protética. Estudos in vivo.*

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

3º Examinador: Profa. Dra. Ana Lucia Machado

4º Examinador: Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

5º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 24 de julho de 2009.

Dados Curriculares

Ewerton Garcia de Oliveira Mima

NASCIMENTO	14 de junho de 1980 – Toledo, Paraná
FILIAÇÃO	Pedro Iwao Mima Olívia Garcia de Oliveira Mima
1999 a 2002	curso de graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2003 a 2005	curso de pós-graduação em Reabilitação Oral, área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2003 a 2008	estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2005 a 2009	curso de pós-graduação em Reabilitação Oral, área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

A **Deus**, por permitir mais esse momento em minha vida, pelas oportunidades, pelo dom da vida, por sua luz e sua bênção constantes em meus caminhos.

Agradeço a cada momento vivido, a cada pessoa e circunstância a mim presenteadas e por me ensinar que a vida é um eterno aprendizado! Muito obrigado por estar sempre ao meu lado e me conceder a beleza e o presente de cada novo dia!

“Justificados pela fé, estamos em paz com Deus, pela mediação do Senhor nosso, Jesus Cristo. Por ele tivemos acesso, pela fé, a esta graça, na qual estamos firmes e nos gloriamos, na esperança da glória de Deus. E não só isso, pois nos gloriamos também de nossas tribulações, sabendo que a tribulação gera a constância, a constância leva a uma virtude provada, a virtude provada desabrocha em esperança; e a esperança não decepciona, porque o amor de Deus foi derramado em nossos corações pelo Espírito Santo que nos foi dado.”
Rm 5, 1-5

A meus pais, **Pedro e Olivia**, pelo amor incondicional, pela formação, pelo apoio constante em todas as etapas da minha vida! Não há palavras, gestos ou homenagens que expressem o que vocês representam para mim, o que eu sinto por vocês e tudo o que vocês fizeram por mim! Amo vocês do fundo do meu coração!

“A vocês, que nos deram a vida e nos ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Pela longa espera e compreensão durante nossas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não temos palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que nos acontece agora, quando procuramos arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amamos vocês!”

Dedico este trabalho

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Ana Cláudia Pavarina**, pela confiança, pelo apoio, pelos ensinamentos que foram essenciais para minha formação! Agradeço todos esses anos de convívio, por todas as oportunidades, pela amizade durante toda essa jornada!

Aos meus irmãos **Emerson** e **Eder**, por fazerem parte da minha vida, por tudo o que vivemos juntos desde pequenos, pelo laço que nos une! Amo vocês!

À **Adriano Tomaz**, pela dedicação, pelo convívio, pela companhia! Obrigado por me compreender e me ajudar a ser uma pessoa melhor!

“A partir do momento em que nos aceitamos como somos e começamos a dar valor nas mínimas coisas que nos cercam, sentimos paz interior. E quando sentimos, podemos transmiti-la através de palavras doces ou até mesmo de um sorriso. A paz está dentro de nós. Basta um momento de reflexão e de encontro conosco mesmo.”

À minha querida amiga e companheira **Mariana Montenegro Silva**, por tudo o que passamos juntos ao longo desta caminhada, por tudo o que aprendemos, pelas horas de alegrias, tristezas, angústias e entusiasmos. Muito obrigado por cada momento juntos que serão levados eternamente em minha lembrança com muito carinho e saudades!

“Perguntei a um sábio, a diferença que havia entre amor e amizade, ele me disse essa verdade... O Amor é mais sensível, a Amizade mais segura. O Amor nos dá asas, a Amizade o chão. No Amor há mais carinho, na Amizade compreensão. O Amor é plantado e com carinho cultivado, a Amizade vem faceira, e com troca de alegria e tristeza, torna-se uma grande e querida companheira. Mas quando o Amor é sincero ele vem com um grande amigo, e quando a Amizade é concreta, ela é cheia de amor e carinho. Quando se tem um amigo ou uma grande paixão, ambos sentimentos coexistem dentro do seu coração.”

William Shakespeare

Agradecimentos Especiais

Às minha amigas, companheiras de todo momento, “pieces of bad way” **Mariana, Daniela, Livia e Paula** (ou PADAMALIEW)! O que seriam de todos esses anos sem vocês? Compartilhamos muito mais que trabalho, dedicação, esforço, alegria, descontração, emoções! Essa jornada se tornou possível graças à presença constante de vocês, ao apoio, ao carinho, à amizade sincera! Má, obrigado por sua preocupação, pela companhia, por ser minha irmã de coração! Dani, obrigado por suas orações, por sempre estender seu ombro amigo! Livitcha, obrigado pelos conselhos sensatos, pelo empenho quando abraçamos esse desafio! Pauleta, obrigado por se mostrar uma amiga tão aberta e compreensiva desde o início de nosso convívio! É difícil descrever a importância singular de cada uma de vocês durante essa etapa das nossas vidas! A vocês, minha gratidão do fundo do coração!

“Por você, faria isso mil vezes”
O Caçador de Pipas

À minha querida, especial e saudosa amiga **Karin**, que me estimulou e conduziu a este caminho! Não tenho palavras para agradecer à sua amizade sincera e por ter confiado em mim! Seu brilhantismo e sua competência são exemplos que eu sempre levarei comigo! Saudades do seu convívio!

“As pessoas realmente ligadas não precisam de ligação física. Quando se reencontram, mesmo depois de muitos anos afastados, sua amizade é tão forte quanto sempre.”
Deng Ming-Dao

“A força da nossa amizade vence todas as diferenças... Aliás... para que diferenças se somos amigos? Quando erramos... nos perdoamos e esquecemos se temos defeitos... não nos importamos... Trocamos segredos... e respeitamos as divergências... Nas horas incertas, sempre chegamos no momento certo... Nos amparamos... nos defendemos... sem pedir... fazemos porque nos sentimos felizes em fazer... Nos reverenciamos... adoramos... idolatramos... apreciamos... admiramos. Nos mostramos amigos de verdade, quando dizemos o que temos a dizer... Nos aceitamos, sem querer mudanças... Estamos sempre presente, não só nos momentos de alegria, compartilhando prazeres, mas principalmente nos momentos mais difíceis...”

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. **Vanderlei Salvador Bagnato** e à Prof^ª. Dr^ª. **Cristina Kurachi**, por abraçarem conosco esse desafio, pelas oportunidades concedidas, pelo apoio e pela dedicação sem os quais não seria possível a concretização deste trabalho!

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, Prof^ª. Dr^ª. **Ana Lúcia Machado**, Prof^ª. Dr^ª. **Eunice Teresinha Giampaolo** e Prof. Dr. **Carlos Eduardo Vergani**, pela dedicação, pelo trabalho em equipe, pelos ensinamentos e pelo convívio ao longo destes anos!

À Prof^ª. Dr^ª. **Denise Madalena Palomari Spolidório**, por conceder seu laboratório para realização destas e outras pesquisas; ao Prof. Dr. **Carlos Alberto de Souza Costa**, pela análise histológica do estudo animal; e à Prof^ª. Dr^ª. **Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pelo auxílio na triagem dos pacientes e na análise das fotos do estudo clínico.

Aos meus amigos do curso de Doutorado, **Ana Carolina, Ana Paula, Anelise, Andréa, Daniela Garcia, Daniela Gonçalves, João Gustavo, José Maurício, Luciano (Zeca), Marcelo, Mariana, Matheus, Michael e Roberta**, por todos esses anos de convívio!

Aos demais alunos de Doutorado, **Isabela, Juliê, Livia e Paula**.

Aos orientados da disciplina de Prótese Parcial Removível, em especial à **Ana Paula, Flávia, Camila, Carol e Patrícia**.

Agradecimentos

Aos alunos de Mestrado, em especial a **Amanda** (Speaker), **Eduardo** (Du) e **Filipe** (Fi).

Aos amigos que compartilharam momentos especiais durante esses anos, **Anne** e **João Paulo** (JP).

Aos amigos que já concluíram a pós-graduação e, mesmo distantes, continuam tão presentes, especialmente a **Karin**, **Vanessa**, **Janaína**, **Nara** e **Rosângela**!

Aos meus amigos de Campinas, sempre tão próximos, **Simone**, **Monica**, **Melina**, **Adriano** e **Roberto**.

À **Teresinha** e ao **Seu Wilson**, pelo carinho durante todos esses anos em Araraquara, por serem os meus “avós” presentes!

Aos meus amigos de graduação **Aline**, **André**, **Andréia** (Déia), **Caio**, **Carina**, **Camila**, **Evelyn**, **Kátia**, **Nancy**, **Rodrigo** e **Sandra**, cujas amizades permanecem tão vivas mesmo apesar do tempo e da distância!

Aos alunos de Iniciação Científica, em especial à **Larice**, **Fernanda Vargas** e **Fernanda Alves**.

Às bolsistas TT, em especial à **Sônia**, **Ana Patrícia**, **Manuela**, **Andréia**, **Tati** e **Estela**, pelo auxílio prestado durante a execução dos experimentos.

Agradecimentos

Aos funcionários e pós-graduandos do **LEMI** (Laboratório Especial de Micologia) da UNIFESP/São Paulo, em especial à **Débora** e a **Leila**, e ao Prof. Dr. **Arnaldo Lopes Colombo**, pela ajuda oferecida nos testes de identificação.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Aos **Professores e Funcionários** do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta instituição.

Aos alunos e engenheiros do Instituto de Física da USP de São Carlos, em especial a **Juliana, Carla e Orlando**.

Ao **Olympio**, pela realização da análise estatística deste estudo, e à **Lúcia**, pelas correções de Português deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela bolsa de estudos e pelo auxílio à pesquisa concedidos para o desenvolvimento destes estudos.

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

A todos que de alguma maneira contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Minha eterna gratidão

*“... aproxima-se o momento de minha partida. Combati o bom
combate, completei a corrida, guardei a fé. Agora está
reservada para mim a coroa da justiça, que o Senhor, justo
juiz, me dará naquele dia; e não somente a mim, mas também
a todos que esperam com amor a sua manifestação gloriosa.*

*Mas o Senhor esteve ao meu lado e me deu forças, ele fez com
que a mensagem fosse anunciada por mim integralmente, e
ouvida por todas as nações...*

*O Senhor me libertará de todo o mal e me salvará para o seu
Reino celeste. A ele a glória, pelos séculos dos séculos!*

Amém. ”

Sumário

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 PROPOSIÇÃO.....	25
3 CAPÍTULO 1.....	27
4 CAPÍTULO 2.....	54
5 DISCUSSÃO.....	95
6 CONCLUSÃO.....	108
7 REFERÊNCIAS.....	110
8 APÊNDICE 1.....	124
9 APÊNDICE 2.....	129
10 ANEXOS.....	144



Resumo

Mima EGO. Viabilidade da utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite protética. Estudos in vivo [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

Resumo

Estes estudos in vivo tiveram como objetivos: 1 – avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica (PDT) na inativação de *Candida albicans* em um modelo murino de candidose bucal; 2 – comparar a eficácia clínica e microbiológica da PDT com a da terapia antifúngica tópica (nistatina suspensão oral) no tratamento da estomatite protética, assim como identificar e determinar a prevalência das espécies de *Candida* dessa patologia. Na primeira investigação, camundongos foram imunossuprimidos com injeções subcutâneas de prednisolona. Tetraciclina foi fornecida na água de beber para promover alteração da microbiota bucal dos camundongos. Os animais foram sedados com injeção de cloridrato de clorpromazina e um swab oral embebido em uma suspensão de *C. albicans* (10^7 UFC/mL) foi esfregado na cavidade bucal dos animais. Quatro dias após a inoculação, a PDT foi realizada no dorso lingual utilizando administração tópica de Photogem® a 400, 500 ou 1000 mg/L e, após 30 minutos, iluminação com 305 J/cm² de luz de LED a 455 ou 630 nm. Posteriormente, a quantidade de fungos viáveis foi determinada (UFC/mL) e analisada pelos testes de ANOVA e Holm-Sidak ($P < 0,05$). Os camundongos foram sacrificados, e as línguas foram removidas e processadas para avaliação histológica de presença de fungos e reação inflamatória. No estudo clínico, pacientes ($n = 40$) foram aleatoriamente atribuídos a um dos seguintes grupos de 20 indivíduos cada; grupo NYS: pacientes receberam tratamento tópico com nistatina (100.000 UI) quatro vezes ao dia por 15 dias e; grupo PDT: prótese total superior e o palato dos pacientes foram borrifados pelo Photogem® a 500 mg/L e, após 30 minutos de incubação,

iluminado por luz de LED a 455 nm (37,5 e 122 J/cm², respectivamente) três vezes por semana durante 15 dias. Culturas micológicas de amostras das próteses e das mucosas palatinas e fotografias padronizadas dos palatos foram realizadas no baseline (dia 0), ao fim do tratamento (dia 15) e no período de acompanhamento (dias 30, 60 e 90 após o início dos tratamentos). As colônias foram quantificadas (UFC/mL) e identificadas por testes bioquímicos. O teste exato de Fisher foi utilizado para análise dos fatores predisponentes. Os valores de ln(UFC/mL) foram avaliados pelos testes de ANOVA e Tukey. A severidade de inflamação do palato nas fotografias foi classificada por dois observadores cegos ao estudo, e o grau de concordância entre eles foi avaliado pelo teste de kappa. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. No estudo animal, a PDT resultou em redução significativa de *C. albicans* recuperada da língua dos camundongos ($P < 0,001$). Não houve diferença entre as concentrações de Photogem[®] e os comprimentos de onda de luz de LED utilizados. A análise histológica das línguas revelou que a PDT não promoveu efeitos adversos significantes na mucosa local. Os resultados do estudo clínico demonstraram que ambos os tratamentos reduziram significativamente os valores de UFC/mL ao final dos tratamentos e no dia 30 do acompanhamento comparados com o baseline ($P < 0,05$). Apenas o tempo de uso da prótese foi um fator predisponente significativo ($P = 0,045$) associado ao grau de inflamação do palato. Os grupos NYS e PDT demonstraram índice de sucesso de 53 e 45%, respectivamente. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente identificada, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Os resultados de ambos estudos in vivo sugerem que a PDT pode ser um tratamento alternativo para a candidose bucal.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, *Candida*, candidíase bucal, estomatite sob prótese, nistatina.



Abstract

Mima EGO. Viability of photodynamic therapy on the treatment of denture stomatitis. In vivo studies [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

Abstract

These in vivo studies evaluated 1 – the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) on the inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidosis; 2 – compared the clinical and mycological efficacy of PDT with that of topical antifungal therapy (nystatin oral suspension) for the treatment of denture stomatitis (DS) as well as to identify and determine the prevalence of *Candida* species in DS. In the first investigation, mice were immunosuppressed with subcutaneous injections of prednisolone. Tetracycline hydrochloride on drinking water was managed to change the oral microflora. They were kept in a sedative state after injection of chlorpromazine chloride and a suspension of *C. albicans* (10^7 CFU/mL) was swabbed in the oral cavity. Four days after oral infection, PDT was performed on the dorsum of the tongue using a topical administration of Photogem[®] at 400, 500 or 1000 mg/L and, after 30 minutes, illumination with 305 J/cm² of LED light at 455 or 630 nm. Then, the number of surviving yeast was determined (CFU/mL) and analyzed by ANOVA and Holm-Sidak tests ($P < 0.05$). Animals were sacrificed, the tongues surgically removed and processed for histological evaluation of yeast presence and inflammatory reaction. In the clinical trial, patients (n = 40) were randomly assigned to one of two groups of 20 subjects each; NYS group: patients received topical treatment with nystatin (100,000 IU) four times daily for 15 days; PDT group: maxillary denture and palate of patients were sprayed with 500 mg/L of Photogem[®] and, after 30 min of incubation, illuminated by LED light at 455 nm (37.5 and 122 J/cm², respectively) three times a week for 15 days. Mycological cultures taken

from dentures and palates and standard photographs of the palates were performed at baseline (day 0), at the end of the treatment (day 15) and at the follow-up (days 30, 60 and 90 after the beginning of the treatments). Colonies were quantified (CFU/mL) and identified by biochemical tests. Fisher's exact test was used to analyse the predisposing factors. The $\ln(\text{CFU/mL})$ values were evaluated by ANOVA and Tukey tests. The severity of inflammation of the palate in the photographs was classified by two blind observers, and the agreement between them was assessed by the kappa test. Significant difference was assumed when $P < 0.05$. In the animal study, PDT resulted in a significant reduction of *C. albicans* recovered from tongue ($P < 0.001$). There was no difference between the concentrations of Photogem[®] and the wavelengths of LED light used. The histological evaluation of the tongue revealed that PDT causes no significant adverse effects to the local mucosa. The results of the clinical trial demonstrated that both treatments reduced significantly the CFU/mL values at the end of the treatments and on day 30 of the follow-up period compared to the baseline ($P < 0.05$). Only age of dentures was a significant ($P = 0.045$) predisposing factor associated with the degree of inflammation of the palate. NYS and PDT groups showed a rate of clinical success of 53 and 45%, respectively. *C. albicans* was the most prevalent species identified, followed by *C. tropicalis* and *C. glabrata*. The results of both in vivo investigations suggest that PDT may be an alternative treatment for oral candidosis.

Keywords: Photochemotherapy, *Candida*, oral candidiasis, denture stomatitis, nystatin.



Introdução

Introdução

A candidose é a infecção mais comum da cavidade bucal^{95,106}, e a estomatite protética é a sua manifestação mais prevalente, acometendo de 11% a 65% dos pacientes usuários de próteses removíveis⁵⁴. Essa patologia é caracterizada por diferentes graus de inflamação da mucosa que mantém contato com a prótese, a qual varia desde múltiplos pontos hiperêmicos até áreas eritematosas difusas. Em casos mais avançados, pode ser observada hiperplasia papilar do palato⁷. Além da região palatina correspondente à área de suporte das próteses totais superiores, outras regiões podem ser acometidas, tais como áreas de suporte de próteses parciais removíveis superiores e inferiores^{80,111}. Apesar de, muitas vezes, ser assintomática, a estomatite protética pode causar prurido, ardência, dor, sabor desagradável, desconforto, hemorragia na mucosa bucal, alteração no paladar, halitose, xerostomia e lesões associadas, como queilite angular e glossite rombóide mediana^{2,60,80,111}.

A etiologia da estomatite protética é considerada multifatorial: debilidade física, alergia, idade, gênero, tabaco, endocrinopatologias, deficiências nutricionais, antibióticos de amplo espectro, imunossupressores e alterações nos mecanismos imunológicos são aspectos geralmente envolvidos com a doença^{48,110}. A maioria das infecções fúngicas bucais acomete pacientes usuários de próteses totais, sobretudo indivíduos do gênero feminino^{30,36} e idosos de ambos os gêneros^{2,7}. Fatores locais associados à prótese também são predominantes no desenvolvimento da estomatite protética, como: biofilme microbiano, trauma local causado pela prótese, xerostomia, uso contínuo da prótese e alteração do pH da saliva^{19,24,79,91,92,96}. No entanto, a interface entre a prótese total e a mucosa palatina propicia um nicho ecológico único para colonização microbiana por causa das condições ambientais de baixo pH, redução significativa do fluxo salivar e relativa

anaerobiose que favorecem a proliferação fúngica sem qualquer outro fator predisponente atuante¹⁸.

As espécies fúngicas do gênero *Candida* são consideradas o principal fator etiológico da estomatite protética^{2,36}, sendo *C. albicans* a espécie mais comumente encontrada^{7,84}. Esse patógeno bucal tem a capacidade de se desenvolver em uma variedade de formas morfológicas (polimorfismo celular), que variam desde células leveduriformes (blastóporos) comensais até células multicelulares alongadas, em forma de tubo, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas), responsáveis pela infecção¹⁰³. Adicionalmente, *C. albicans* é capaz de se aderir à mucosa tecidual e às superfícies protéticas, o que é considerado como primeiro passo para a patogênese da estomatite protética^{3,36,41,83,87}. Na cavidade bucal sobre superfícies duras e moles, *C. albicans* se desenvolve como biofilme, que consiste em uma comunidade complexa de células microbianas embebidas em uma matriz extracelular de polissacarídeos^{42,85,86}. Quando as células se organizam em biofilme, elas apresentam propriedades fenotípicas distintas em relação à forma plactônica e maior resistência aos agentes antimicrobianos^{27,42,70}. Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais prevalente e mais virulenta do gênero *Candida*, outras espécies são frequentemente isoladas da superfície protética e da mucosa palatina, tais como (em ordem decrescente de virulência): *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondi*⁷⁸. A emergência de outras espécies de *Candida* é importante, uma vez que elas podem apresentar maior aderência à superfície acrílica e resistência aos agentes antifúngicos⁶⁷.

Os agentes antifúngicos polienos (nistatina e anfotericina B) ou os azóis (itraconazol, miconazol e fluconazol) são comumente utilizados para o tratamento da estomatite protética, mas a higienização adequada da prótese, a sua remoção para dormir e, eventualmente, o reembasamento ou a sua substituição também são necessários para a remissão da patologia. Os medicamentos tópicos, como a nistatina e o miconazol, têm sido utilizados efetivamente²⁰, porém o efeito diluente da saliva e a movimentação da língua e da musculatura bucal

normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações subterapêuticas^{6,71}. Assim, esses regimes de tratamento tendem a ser prolongados e a recorrência da infecção é frequente^{6,11,73}. Já os agentes antifúngicos sistêmicos, como a anfotericina B e o fluconazol, também são efetivos; no entanto, eles não erradicam os micro-organismos que colonizam a prótese^{6,21}. O maior problema associado à utilização dos medicamentos antifúngicos é a resistência das espécies^{25,52,55,75,89,109}. Enquanto a resistência de *C. albicans* aos agentes polienos é rara²⁵, muitos mecanismos de resistência aos azóis têm sido reportados, devido principalmente ao uso indiscriminado desses agentes, como alterações na parede e na membrana celular que acarretam deficiência na captura da molécula da droga, superexpressão ou mutações na enzima alvo dos azóis e expulsão das drogas mediada por proteínas de transporte na membrana celular^{25,52,55,75,89,109}. A resistência parece aumentar proporcionalmente ao tempo de exposição prévia dos micro-organismos aos medicamentos antifúngicos⁵⁵. Adicionalmente, por causa do mecanismo fungistático dos agentes azóis, o sistema de defesa imunológico do hospedeiro é essencial para a erradicação da infecção⁵². Portanto, a utilização de drogas azóis por pacientes imunossuprimidos pode ser ineficaz.

Considerando os aspectos citados, a pesquisa por novos métodos terapêuticos para o tratamento de infecções se faz necessária. Nesse contexto, uma modalidade promissora para inativação de micro-organismos é a Terapia Fotodinâmica (do inglês, Photodynamic Therapy ou PDT)^{39,59,108}, que utiliza a associação de um agente fotossensibilizador (FS) a uma fonte de luz de comprimento de onda adequado. A interação entre o FS e a luz na presença de oxigênio resulta na produção de espécies reativas tóxicas, principalmente o oxigênio singlete, e radicais livres, que promovem dano e morte celulares^{39,59,108}. Em virtude da ação não específica desses agentes oxidativos, organismos resistentes aos medicamentos antifúngicos convencionais podem ser eficientemente inativados pela PDT, e o desenvolvimento de resistência a essa terapia parece ser improvável. Apesar de a PDT ser utilizada mais comumente no tratamento de câncer, muitos estudos têm reportado que micro-organismos, como

bactérias, fungos e vírus, podem ser inviabilizados pela PDT^{39,59,108}. Nesse caso, os micro-organismos são tratados primeiramente com um FS que pode se ligar à membrana ou penetrar nas células (fotossensibilização) após um determinado tempo de incubação dos mesmos com o FS^{14,17,114}. Esses agentes sensibilizantes apresentam uma absorção máxima de luz específica, sendo alguns comprimentos de onda preferencialmente absorvidos. Caso a absorção do FS corresponder ao comprimento de onda da luz utilizada, maior radiação será absorvida pela célula, promovendo a sua inativação. Tem sido demonstrado que a PDT é efetiva na inativação de espécies microbianas bucais e que não promove danos nos tecidos e nas células do hospedeiro^{58,81}.

Vários tipos de fontes de luz têm sido avaliados para a PDT. Estudos demonstraram inativação de patógenos utilizando luz halógena⁶⁴, luz de fotopolimerizador⁸¹, LEDs (diodos emissores de luz)^{82,113} e laser de baixa intensidade^{53,105,112}. É importante considerar que a fonte de luz não deve aquecer as amostras irradiadas, evitando a inativação térmica dos micro-organismos. Nesse contexto, a utilização do LED e do laser seria mais indicada. O laser destaca-se das demais fontes de luz por apresentar feixe de luz monocromático, coerente e colimado. Apesar de apresentar uma emissão de luz espontânea, policromática (abrangendo uma faixa estreita do espectro de luz), não coerente e com certo espalhamento, o LED permite a irradiação de áreas mais amplas, o custo do aparelho é menor e sua tecnologia é mais simples comparada com a do aparelho laser^{59,82,113}. Independente da característica do aparelho, o importante na PDT é a habilidade da fonte de luz de excitar o FS na célula alvo, sem danificar o tecido adjacente. A fotoinativação microbiana é obtida utilizando-se uma potência de luz baixa (miliwatts). A potência de saída da fonte de luz é normalmente fornecida em mW/cm^2 , enquanto a densidade de energia (J/cm^2), que descreve a energia recebida pela amostra/tecido irradiado, pode ser calculada multiplicando-se a potência de saída pelo tempo de iluminação (em segundos). Zanin et al.¹¹³ verificaram redução nos valores de UFC acima de 99% quando biofilmes de *S. mutans* de diferentes idades (3, 7 e 10 dias) foram sensibilizados com o corante

azul de toluidina a 100 mg/L e irradiados por LED ou laser He-Ne nas densidades de energia de 49 J/cm², 147 J/cm² e 294 J/cm² (equivalentes aos tempos de exposição de 5, 15 e 30 minutos, respectivamente). A utilização do LED foi considerada mais efetiva que a do laser nos biofilmes de 3 e 7 dias, não sendo observada diferença entre as duas fontes de luz na inativação do biofilme de 10 dias. Segundo os autores, o efeito bactericida foi dose-dependente, sendo os biofilmes mais maduros menos susceptíveis à PDT¹¹³.

Na seleção do FS, deve-se considerar sua capacidade de absorver a luz no comprimento de onda utilizado na irradiação, seu potencial em produzir espécies reativas e sua seletividade às células microbianas, de modo que não haja efeitos deletérios ao tecido adjacente durante a irradiação¹⁰⁸, podendo ser citados como exemplos os corantes fenotiazínicos (azul de toluidina e azul de metileno), as porfirinas, as ftalocianinas, entre outros^{59,108,112}. Para a realização da PDT antimicrobiana, as concentrações utilizadas dos FS são consideradas baixas, não promovendo efeito citotóxico ao hospedeiro. O local de ação do FS na célula pode variar de acordo com a morfologia da espécie microbiana, com o tipo de FS e com o tempo de pré-irradiação. Os corantes fenotiazínicos localizam-se na membrana plasmática da célula fúngica e, sob iluminação, promovem dano nessa estrutura e aumento da sua permeabilidade³⁹. Já as porfirinas não são capturadas pelas células fúngicas, sendo as moléculas do FS localizadas no meio intercelular as responsáveis pela alteração na permeabilidade de membrana, consequente penetração do FS para o interior da célula e fotoinativação³⁹. Com relação ao tempo de pré-irradiação, um FS incorporado lentamente ao micro-organismo pode causar dano na parede celular após a exposição à luz, enquanto um tempo maior de incubação entre o fotossensibilizador e o micro-organismo pode resultar num efeito diferente, como a ruptura de ácidos nucleicos¹⁰⁸. Lambrechts et al.⁶⁴ observaram que a PDT, induzida pela porfirina catiônica 25 µM e por uma fonte de luz halógena, promoveu dano na membrana citoplasmática de células de *C. albicans*. A análise microscópica demonstrou que, após a irradiação com uma dose de luz de 5,4 J/cm², 99,8% das células foram inativadas antes do influxo do

FS para o interior do micro-organismo, uma vez que um pequeno número de células apresentou fluorescência no seu interior. Os autores concluíram que a fotoinativação de *C. albicans* pela porfirina é resultado do dano à membrana celular⁶⁴. Os derivados da hematoporfirina, que são os FS de primeira geração que receberam aprovação da FDA (Food and Drug Administration) para utilização clínica em PDT¹⁰⁸, são os FS mais estudados e utilizados em PDT anticâncer⁶¹.

Apesar de muitos estudos in vitro terem demonstrado a efetividade da PDT na inativação de *Candida* spp.^{14,17,26,38,40,64,112}, estudos in vivo na literatura científica são escassos. Teichert et al.¹⁰⁵ verificaram completa fotoinativação de *C. albicans* num modelo animal de candidose bucal mediada pelo azul de metileno associado à luz de laser vermelho de baixa intensidade. Recentemente, Junqueira et al.⁵⁶ observaram que esse mesmo tratamento em ratos inoculados com *C. albicans* resultaram em menores alterações histológicas teciduais do que os animais não submetidos à PDT. No entanto, a utilização de corantes fenotiazínicos em odontologia pode não ser adequada por causa do manchamento de restaurações estéticas e até mesmo de superfícies protéticas. Adicionalmente, o efeito da PDT antimicrobiana como tratamento clínico de candidose bucal ainda não é conhecido na literatura científica disponível.



Proposição

Proposição

Os presentes estudos in vivo foram desenvolvidos como os seguintes objetivos:

1. Avaliar o efeito da PDT na inativação de *C. albicans* e no tecido lingual de camundongos em um modelo de candidose bucal;
2. Comparar o efeito da PDT em relação à terapia antifúngica tópica (nistatina 100.000 UI) no tratamento da estomatite protética, bem como identificar e determinar a prevalência de *Candida* spp. no palato e na superfície interna da prótese dos pacientes avaliados.



Capítulo 1

**Killing of *Candida albicans* by Photodynamic Therapy in a Murine Model of
Oral Candidosis**

Ewerton G. O. Mima¹

Ana Cláudia Pavarina^{1*}

Lívia N. Dovigo¹

Carlos Eduardo Vergani¹

Carlos A. S. Costa²

Cristina Kurashi³

Vanderlei S. Bagnato³

¹ Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, São Paulo State University – UNESP; Humaitá Street, 1680, 14.801-903, Araraquara, SP, Brazil.

² Department of Physiology and Pathology, Araraquara Dental School, São Paulo State University – UNESP; Humaitá Street, 1680, 14.801-903, Araraquara, SP, Brazil.

³ Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo – USP; Caixa Postal 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil.

Corresponding author: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, nº 1680 – CEP: 14801–903, Araraquara, SP , Brazil

Phone: #55#016#33016410

Fax: #55#016#33016406

e-mail: pavarina@foar.unesp.br

ABSTRACT

This study evaluated the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) on the inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidosis. Mice were immunosuppressed with subcutaneous injections of prednisolone and oral administration of tetracycline hydrochloride. They were kept in a sedative state after injection of chlorpromazine chloride and a suspension of *C. albicans* (10^7 CFU/mL) was swabbed in the oral cavity. Four days after oral infection, PDT was performed on the tongue dorsum using a topical administration of Photogem[®] at 400, 500 or 1000 mg/L and, after 30 minutes, illumination with 305 J/cm² of LED light at 455 or 630 nm. Then, the number of surviving yeast was determined (CFU/mL) and analyzed by ANOVA and Holm-Sidak tests ($P < 0.05$). Animals were sacrificed, the tongues surgically removed and processed for histological evaluation of yeast presence and inflammatory reaction. PDT resulted in a significant reduction of *C. albicans* recovered from tongue ($P < 0.001$). There was no difference between the concentrations of Photogem[®] and the wavelengths of LED light used. The histological evaluation of the tongue revealed that PDT causes no significant adverse effects to the local mucosa, since no difference was observed between animals submitted to PDT and those not submitted to such therapy. These results suggest that PDT may be an alternative treatment for oral candidosis.

Key words: Photodynamic therapy, *Candida albicans*, oral candidosis, light emitted diode.

INTRODUCTION

Oral candidosis is the most common infection of the oral cavity and *Candida albicans* is the species most frequently related to this opportunistic infection (1, 2). The predisposing factors of oral candidosis include immunocompromising states, diabetes mellitus, denture prostheses, xerostomia (3, 4), and prolonged use of antibiotics or immunosuppressive drugs (5, 6). The advent of the human immunodeficiency virus (HIV) infection has increased the attention to oral candidosis, since that up to 90% of HIV-infected individuals suffer from oral *Candida* infection (3).

The widespread use of topical and systemic antifungal agents as a conventional treatment for oral candidosis has resulted in development of resistance in *C. albicans* (7). While resistance of *C. albicans* to polyenes is rare, several mechanisms of azole resistance (8) have been reported, including changes in the cell wall or plasma membrane, which lead to impaired azole uptake; overexpression of or mutations in the target enzyme of azoles; and the efflux of drugs mediated by membrane transport proteins (9). Resistance appears to increase proportionally with the extend of prior exposure to the antifungal drugs (10). Moreover, due to the fungistatic mechanism of azole drugs, the host defences are essential for eradication of the infection (11). Therefore, the use of azole agents for oral candidosis in immunosuppressed patients could be ineffective.

Considering the aspects previously mentioned, the development of alternative therapies for oral candidosis is necessary. A promising modality is Photodynamic Therapy (PDT) that uses a photosensitizing agent and light of appropriate wavelength. The interaction between the photosensitizer (PS) and light in the presence of oxygen produces reactive species, such as singlet oxygen and free radicals, which causes cell damage and death. Thus, the mechanism of PDT inactivation of fungi is completely different from that of antifungal agents. Due to the

non-specific oxidising agents, organism resistant to conventional antifungals could be successfully killed by PDT and the development of resistance to such therapy seems to be unlikely. Although PDT is more usually applied for treating cancer, several studies have been reported that microorganisms, such as bacteria, viruses, and fungi, can be killed by PDT (12-26). It has been demonstrated that PDT is effective against oral pathogens and do not promote damage to host cells and tissues (13, 14).

In vitro investigations showed that *Candida* spp. are susceptible to photoinactivation (15-22). Usually, dyes (toluidine blue and methylene blue) and porphyrins are used as PS combined with red laser light. However, light sources with simpler technology and lower cost than lasers, such as light-emitting diodes (LED), have been applied with success in PDT (23, 24). In addition, LED is able to irradiate large areas, and different colors of light can be found, whose radiations cover almost all the visible electromagnetic spectrum. In scientific literature, investigations of antimicrobial PDT in animal models are scarce. One in vivo study reported complete inactivation of *C. albicans* with topical methylene blue and red laser light in a murine model of oral candidosis (25) and another described fewer epithelial alterations and lower chronic inflammatory response in rats submitted to PDT (26). Nevertheless, dyes have the undesirable effect of staining teeth, lips, tongue and buccal mucosa. Furthermore, hematoporphyrin derivatives, the first-generation sensitizers given FDA approval for use in clinical PDT (27), are the most widely studied and clinically used PS in anticancer PDT (12). While the strongest porphyrin absorption band occurs at 400 nm, the weakest (630 nm) band is commonly used in phototherapy because of the improved tissue transparency at this wavelength (28, 29). In vivo effect of antimicrobial PDT using porphyrins and LED light is still not known in scientific literature. Then, the aim of the present investigation is to contribute to in vivo antimicrobial PDT development reporting the photoinactivation of *C. albicans* in a murine model of oral candidosis using a porphyrin in association with LED light sources of different wavelengths.

MATERIALS AND METHODS

Photosensitiser and light sources

The PS used in this study was a haematoporphyrin derivative produced in Moscow-Russia (Photogem[®]). Stock solutions of Photogem[®] were prepared by dissolving 5 mg of the powder in 5 mL of sterile saline and kept in the dark instantly before use (pH 6.6, this solution was used to prepare other concentrations).

Two handpieces having a blue (455 nm) or red (630 nm) light-emitting diode (LED, LXHL-PR09, Luxeon[®] III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA) with 5 mm of diameter were designed by Instituto de Física de São Carlos (University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil). The power output of light delivered at the end of each handpiece was 200 mW. The absorption bands of Photogem[®] and the intensity of LED light are shown in Figure 1.

Microorganisms and culture condition

A reference strain (ATCC 90028) of *C. albicans* (ATCC; Rockville, Md, USA) was evaluated. This strain was maintained in Yeast-Peptone-Glucose (YEPD) and glycerol medium at -70°C. The yeast was reactivated by cultivation in Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) containing 5 µg/mL gentamicin at 37°C for 48 h before each experiment. The yeast suspended in sterile 0.85% saline (pH 5.3) was inoculated in 5 ml of Tryptic Soy Broth (TSB, pH 7.2, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) and grown aerobically at 37°C for 24 h. Each culture was harvested after centrifugation at 2000 rpm for 10 min, washed twice with sterile distilled water and resuspended in sterile saline (4.5×10^7 cfu/mL).

Animal preparation and oral infection

The research protocols for using mice and all animal experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Investigations (Araraquara Dental School, São Paulo State University) (Anexos). Seventy-one six-week-old female mice were used for all animal experiments. The mice were kept in cages housing 5

animals in a temperature-controlled room ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12:12 h light/dark cycle. Standard mouse chow and tap water were given *ad libitum*.

The methodology described by Takakura et al. (30) was used to induce oral candidosis in mice. The animals were immunosuppressed with two subcutaneous injections of prednisolone (Depo-Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, SP, Brazil) in the back of the mouse at a dose of 100 mg/kg body weight 1 day prior to and 3 days after the infection with *Candida*. Tetracycline hydrochloride (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brazil) in drinking water at the concentration of 0.83 mg/mL was given to mice beginning 1 day before the infection. Animals were anesthetized by an intramuscular injection with 50 μL of 2 mg/mL chlorpromazine chloride (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brazil) on each femur. Small cotton pads (Cottonbaby, Higie-Plus Cottonbaby Ind. Com. Ltda., São José, SC, Brazil) were soaked in a *C. albicans* cell suspension (4.5×10^7 CFU/mL) in such way that the entire oral cavity of the anesthetized mice was swabbed to produce oral infections.

Photodynamic therapy and microbiological evaluation

Four days after *Candida* infection, mice were anaesthetized by an intramuscular injection of 100 mg/kg body weight ketamine (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Embu-Guaçu, SP, Brazil) and 10 mg/kg body weight xylazine (Produtos Veterinários J. A. Ltda., Patrocínio Paulista, SP, Brazil). Each animal was placed in a supine position on a pad in a device fitted with stainless steel wires that were looped around the incisors to hold the mouth open. With mandible and cheeks retracted, tongue was pulled out of the mouth gently with forceps. Then, 50 μL of Photogem[®] at concentrations of 400, 500 or 1000 mg/L was pipetted onto the tongue dorsum and mice were maintained in the dark during 30 min (pre-irradiation time). During this period, the tongue of each animal was kept in the oral cavity and the photosensitizer was not swallowed, since the animals were anaesthetized. After this period, tongue was pulled out of the mouth again for illumination. The solution was neither rinsed off nor expected, it remained in the oral cavity. For illumination, the LED device (455 or 630 nm) was placed onto the center

of the tongue dorsum, which was illuminated for 20 min, resulting in a total fluence of 305 J/cm^2 (P+L+ groups). The effect of PS alone was tested by application of Photogem[®] at the same concentrations (400, 500 or 1000 mg/L) for the same period of pre-irradiation time and irradiation but in the absence of light (P+L- groups). The groups that received light only (blue or red) were exposed to the same LED dose mentioned above (P-L+). The positive control group did not receive either PS or light (P-L-). A negative control group of animals was immunosuppressed as described above but neither received *C. albicans* inoculation nor any treatment. Each experimental group consisted of five animals, except the control group which consisted of seven animals. Two additional mice were not immunosuppressed, neither received *C. albicans* inoculation nor any treatment, and acted as overall control. It was observed in a pilot study performed previously that shorter times (2.45, 10 and 15 min, which correspond to 37.5, 152 and 229 J/cm^2 , respectively) were not effective when combined with lower concentrations (300, 100 and 50 mg/L) of Photogem[®] (data not shown). Moreover, irradiation times over 20 min (above 305 J/cm^2) were considered clinically inapplicable.

Next, the tongue dorsum was swabbed for 1 min with a cotton pad. The end of the cotton pad was then cut off and placed in a tube containing 1 mL sterile saline. After mixing on a Vortex mixer for 1 min to release *C. albicans* cells from the swab into the saline, duplicate 25 μL aliquots from the 10-fold serial dilutions were spread over the surface of SDA with 5 mg/L gentamicin. All plates were aerobically incubated at 37°C for 48 h. After incubation, yeast colony counts of each plate were quantified using a digital colony counter (CP 600 Plus, Phoenix Ind Com Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brazil). The colony forming unit per milliliter (CFU/mL) was determined.

Characterization of LED light penetration into the tongue

Two additional animals were used for this evaluation. These mice were sacrificed and tongues were surgically removed. Each tongue was cut sagittally in two halves. Each LED handpiece was positioned perpendicularly to the dorsum of the

tongue sample. A CCD camera placed on the side of the tissue recorded the whole image formed by the light scattered by the tissue. The image was saved as a file using a PC computer.

Histopathological study

Mice were sacrificed with a lethal dose of ketamine 24 h after PDT. Tongues were surgically removed, fixed in 10% formalin fixative solution at pH 7.2 and embedded in paraffin. Five- μ m thick serial sections were cut, mounted on glass slides and stained with periodic acid-Schiff and hematoxylin (PAS-H) stain for histopathological examination and fungal detection in light microscope (Carl Zeiss 62774, Oberkochen, West Germany). Tissue reaction due to *C. albicans* infection associated or not to the PDT was examined by a pathologist blinded to the all groups of mice. A descriptive analysis of the histological characteristics of the tissue with and without local inflammatory response of varied intensity was performed and the intensity of inflammation was expressed using a 5-point scoring system, as demonstrated in Table 1.

Statistical Analysis

The data of $\log_{10}$ CFU/mL of *C. albicans* isolated from the tongue in mice of different groups were compared using one-way ANOVA analysis of variance. *P* values of <0.05 were considered significant. If a significant difference was found between the groups as a whole, further analyses were performed with Holm-Sidak test to determine where these differences occurred (Apêndice 1). All calculations were executed using a statistical software program (SigmaStat® 3.1, Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA).

RESULTS

The experimental model of oral candidosis described by Takakura et al. (30) used in the present investigation showed reproducible results. White patches or pseudomembranes were macroscopic observed on the dorsal tongue four days after inoculation (Figure 2). Moreover, appreciable number of *C. albicans* (10^{4-5} CFU/mL)

was recovered from tongue. Throughout the course of the experiment, mice showed no weight loss or death.

In this study, significant reduction ($P < 0.001$) in the viable counts of *C. albicans* was achieved after PDT, despite the PS and light combination used. Compared to control group (P-L-), the photosensitization with 400, 500 and 1000 mg/L associated to 305 J/cm² of illumination promoted significant reductions of approximately 1 log₁₀ or more in *C. albicans* viability. There were no statistically significant differences between the effectiveness of 400, 500 and 1000 mg/L. However, it can be seen from Figure 3 that lower values of log₁₀ (CFU/ml) was achieved with the use of 500 and 1000 mg/L of PS compared to 400 mg/L. These results were observed for both wavelengths of light tested, since no significant difference was verified between blue and red lights (Figure 3). At concentrations of 400, 500 and 1000 mg/L of PS, blue LED light promoted reductions of 1.04 log₁₀, 1.39 and 1.41 log₁₀ respectively, while red LED light promoted reductions of 1.05 log₁₀, 1.59 log₁₀ and 1.40 log₁₀ respectively. The white patches or pseudomembranes observed after *C. albicans* inoculation were still present after PDT. The use of PS (400, 500 and 1000 mg/L) in the absence of light had no effect on the viable count. In addition, LED light alone (blue or red) caused no effect on the viability of *C. albicans*.

Light scattering in the tongue sample is shown in Figures 4. This image illustrates that blue light decays faster than red light in the tongue tissue, i.e. higher penetration into the tissue was observed with red light.

Histological examination of the tongue of the mice infected with *C. albicans* showed the presence of yeast and pseudohyphae limited to the keratinized layer on the tongue dorsum. No histological evidence of invasion of yeast and pseudohyphae in deep layers of the continuous epithelium was observed. However, the subjacent connective tissue exhibited mild inflammatory response mediated by mononuclear cells (Figure 5). Mice from negative control and overall control groups showed no fungi on the tongue dorsum and the epithelial and connective tissues

exhibited normal histological characteristics (score 0). The epithelium was continuous, with an intact basal layer and a thin keratin layer as an external lining. The subjacent connective tissue exhibited a balance among extracellular matrix components and cells, with a notable presence of intact muscular tissue in the area.

DISCUSSION

This investigation demonstrated that PDT was effective in significantly reducing the viability of *C. albicans* on an animal experimental model of oral candidosis. In the present study, it was verified white patches or pseudomembranes on the dorsal tongue associated with a significant number of CFU/mL of *C. albicans* (10^{4-5} CFU/mL). These results are in agreement with Takakura et al. (30), who also observed white patches on mice's tongue although a higher number of CFU of *Candida* (10^5 – 10^6) was recovered from each murine oral cavity. However, these authors reported that the whole oral cavity including buccal mucosa, tongue, soft palate and other oral mucosa surfaces was swabbed, while only the dorsum of the tongue was swabbed in the present investigation. Moreover, the difference between the CFU values of both studies may also be attributed to the strains of *C. albicans* used for oral infection. While these authors used a clinical strain isolated from a patient with cutaneous candidiasis, in the present study a reference strain (ATCC) was used. It was verified that clinical isolates of *Candida* spp. had significantly higher number of $\log_{10}$ (CFU/mL) than ATCC strains (31).

Although yeasts are more difficult to kill by PDT than bacteria (20, 32), several in vitro investigations have demonstrated the photoinactivation of *C. albicans* (15-22). However, in vivo PDT studies are scarce. The results of the present investigation demonstrated significant reduction of CFU/mL of *C. albicans* from tongues of mice after 400, 500 and 1000 mg/L of Photogem[®] associated with 305 J/cm² of LED light (455 and 630 nm). One report described a dose-dependent photoeradication of *C. albicans* in an immunodeficient murine model (25). However, the CFU values obtained by the murine model of oral candidosis used in the present

investigation (mean of 2.05×10^3 for the positive control group) are higher than those described by Teichert et al. (25) (1.94×10^2). In their study, concentrations of methylene blue from 250 to 400 mg/L decreased fungal growth whilst complete kill was achieved using 450 and 500 mg/L with a 664 nm diode laser irradiation for 687.5 sec (25). These findings partially agree with those obtained by the present investigation, in which total inactivation of *C. albicans* was not observed. While reduction of CFU from $2.74 \log_{10}$ to 0 was achieved by Teichert et al. with 500 mg/L of methylene blue and red laser light, in the present investigation $1.59 \log_{10}$ was the highest reduction of CFU/mL values using 500 mg/L of Photogem[®] with 305 J/cm^2 of red LED light. The difference between the CFU reductions may be attributed to the different PS and light source combination used in both studies. The molecule size of methylene blue is smaller than porphyrins (12, 27) and a smaller molecule can penetrate the inner layers of the biofilm and promote a better sensitization of the cells. Thus, it may explain the different results of both investigations. Furthermore, Teichert et al. (25) stated in their manuscript that mice with oral candidosis were treated using PDT, but they just observed a dose-dependent eradication of *C. albicans*, and regression of lesions, which is an important clinical sign of treatment, is not reported. On the other hand, Müller et al. (33) failed to demonstrate any effective reduction of microbiota in a multispecies oral biofilm by PDT using methylene blue and laser light after one single application. On epithelial surfaces *C. albicans* grows as biofilm (34), which is less susceptible to PDT than its planktonic counterpart (22). It has been suggested that incomplete kill of PDT on biofilms might be due to the failure of PS and light penetration into the inner regions of the biofilm (35, 36). Moreover, a dose-dependent inactivation was not observed in the present investigation. It may be attributed to the biofilm of *C. albicans* and the higher concentrations of the PS used. At high concentrations, PS may suffer a self-aggregation process in solution, reducing the singlet oxygen yield (37).

Despite complete inactivation was not observed in this study, in vitro investigations have demonstrated the photokilling of *C. albicans* using porphyrins. In

these studies, low concentrations of PS and low light fluences have been used. Bertoloni et al. (15) showed that concentrations of haematoporphyrin above 1 mg/L in the incubation medium were able to decrease significantly the viability of *C. albicans* irradiated by 6 mW/cm² tungstens lamps for 10 min. A dose-dependent inhibition of metabolic activity was observed after treatment of *C. albicans* strains with Photofrin (0.01 to 10 mg/L) and illumination with a light fluence of 9 J/cm² from an Hg arc lamp (18). Chabrier-Roselló et al. (21) also observed a dose-dependent reduction of metabolic activity of *C. albicans* biofilms mediated by 10 mg/L of Photofrin and illumination with broadband visible light at fluences ranging from 0.9 to 18 J/cm². However, it has been shown that photosensitization of *Candida* and subsequent susceptibility to PDT can be reduced dramatically by culture conditions, such as the type of the culture media and growth and the presence of albumin (18, 22, 38). Thus, compared to these in vitro studies, the higher PS concentrations and light fluence used for photoinactivation in the present investigation may be attributed to the physiological responses of *C. albicans* to the in vivo environment.

Effective results of photoinactivation of *C. albicans* have also been reported using phenothiazine dyes, toluidine blue O and methylene blue (TBO and MB respectively). The results obtained by Wilson and Mia (16) demonstrated photokilling of *C. albicans* by a number of PS in association with light from low-power laser, with TBO and helium/neon gas laser being the most effective combination. These authors also verified photosensitization of *C. albicans* under conditions resembling those which would be encountered in vivo (in saliva, serum, saline and broth at a pH ranging from 4.0 to 7.0) (39). Jackson et al. (17) found that hyphal form of *C. albicans* was more susceptible to photoinactivation requiring a lower TBO concentration than yeast form. The germ tube formation of *C. albicans*, a transition state from budding to hyphal cells and an essential phase to virulence, was also inhibited by PDT using MB (0.027 to 13.37 mM) and laser light (28 J/cm²) (40). In contrast to bacterial species, *C. albicans* sensitized by 100 mg/L MB was killed by visible light from a slide projector (42 mW/cm²) only after 20 min of irradiation (32).

Giroldo et al. (41) verified inhibition of CFUs of *C. albicans* to approximately 50% in the presence of 50 mg/L MB and laser light irradiation (28 J/cm²). These authors also verified that cell death promoted by this combination can be related to damage in the plasma membrane of the yeast. However, Demidova and Hamblin (20) showed that 5 µM of poly-L-lysine chlorophyll(a) conjugate was more effective at killing *C. albicans* than 50 µM of TBO and 200 µM of rose bengal after illumination at fluences ranging from 0 to 200 J/cm². Although the effectiveness of MB as a PS was also verified in vivo (25), dyes have the undesirable effect of staining teeth, lips, tongue, buccal mucosa and prosthetic devices. For this reason, a non-dye photosensitizer would be more useful for oral cavity.

In the scientific literature, laser light sources are usually chosen to perform PDT. However, their high costs are inaccessible for many institutions. Recently, alternative light sources, such as LED, have been successfully used in PDT (23, 24, 42). In the present investigation, LED was used as a light source due to its ability to irradiate large areas than possible with collimated laser light. Moreover, LED has simpler technology and lower cost than laser. The results of this study showed no significant difference between the wavelengths of LED light used (blue and red) for photoinactivation of *C. albicans*. It was an unexpected result, since the maximum absorption band of Photogem[®] is nearer to 455 nm (blue) than 630 nm (red). However, the deeper penetration of red light into the tissue and probably into the *C. albicans* biofilm may explain this result.

Propagation of light in biological tissues has been evaluated using direct measurement and complex mathematical equations (43-45). Absorption and scattering coefficients of tissues are factors responsible for several effects of light-tissue interaction. However, optical properties of the same tissue may differ among patients (46). Despite these considerations, it's known that penetration of light into the tissue is proportional to its wavelength, ie, the longer the wavelength, the deeper is the penetration of light (47, 48). In addition, noncoherent light sources, such as LED lights, would be expected to achieve less optical penetration because of

increased scatter (48). Light scattering can be seen as a type of light diffusion as the penetration proceeds along the tissue. In the present investigation, it was observed that red LED light showed higher scattering than blue LED light in the tongue tissue.

A treatment time of 20 minutes of irradiation may be too long. However, a pilot study performed previously demonstrated that shorter times were not effective (data not shown). On the other hand, when topical or systemic antifungal drugs are used, the medicament should be applied more than once a day, during several days, weeks and, sometimes, months. Then, the cost of antifungal medication can be high. Moreover, these agents achieve only a transient response and relapses are frequent (49, 50). The medicine should be taken for as long as recommended by the professional, because if the drug is stopped too soon, the symptoms may return. Then, compared to antifungal agents, 20 minutes of illumination during a PDT session may be clinically applicable. Nonetheless, further clinical trials should be conducted in order to investigate if the parameters found in this investigation would be effective in humans.

The histological evaluation of the tongue of the animals showed that PDT had no adverse effects on the adjacent tissue. This finding is in agreement with that demonstrated by Junqueira et al. (26), who also demonstrated that PDT resulted in fewer epithelial alterations and lower chronic inflammatory response in rats. Komerik et al. (14) also verified no damage to periodontal tissues of rats submitted to PDT. In the present study, yeast and pseudohyphae were observed only in the keratinized layer without invasion of the epithelium and the inflammation in the subjacent connective tissue was scored as mild for all mice infected with *C. albicans* submitted or not to PDT. Then, the inflammation observed in the connective tissue may be associated with *Candida* infection but not with PDT. Nevertheless, the murine model of oral candidosis used in this investigation showed previously destruction of several epithelial layers (30). This find could be attributed to the strain used by these authors, since clinical strains isolated from infections showed increased virulence factors (51). The findings of the present investigation partially corroborate with those

of Teichert et al. (25), since these authors also observed yeast and pseudohyphae limited to the keratinized layer, but lack of inflammatory changes in mice not submitted to PDT and subepithelial inflammatory infiltrate and neutrophilic exocytosis after PDT. Nevertheless, the reasons for these differences between the histological findings of the present study and those of these authors are unknown.

In conclusion, within the limitations of this investigation, the murine model of oral candidosis was an efficient method for evaluating PDT. The results of the present study demonstrated that Photogem[®]-mediated PDT can be used in vivo for inactivation of *C. albicans* without harming the tongue tissue. These results indicate the critical importance of determining effective in vivo PDT parameters prior to clinical applications. However, they can't be extrapolated to a clinical situation, since the oral environment of humans is different (microbiota and biofilm composition, salivary flux, food habits, etc.). Further in vivo studies are still necessary to investigate the parameters required for complete inactivation and the consequence of a repeatable therapy. Clinical trials are also required to evaluate the effect of PDT as a treatment of oral candidosis.

Acknowledgments—This research was supported by São Paulo Council of Research (FAPESP – Grant nº 2005/02193-4 and 2005/03226-3).

REFERENCES

1. Totti, M. A., E. B. dos Santos, O. P. de Almeida, C. Y. Koga-Ito and A. O. Jorge (2004) Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. *Braz. Oral Res.* **18**, 202-207.
2. Scully, C., M. el-Kabir and L. P. Samaranayake (1994) *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **5**, 125-157.
3. Egusa, H., N. S. Soysa, A. N. Ellepola, H. Yatani and L. P. Samaranayake (2008) Oral candidosis in HIV-infected patients. *Curr. HIV Res.* **6**, 485-499.

4. Samaranayake, L. P. and T. W. MacFarlane (1990) *Oral candidosis*. Wright, London.
5. Allen, C. M. (1994) Animal models of oral candidiasis. A review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **78**, 216-221.
6. Samaranayake, Y. H. and L. P. Samaranayake (2001) Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 398-429.
7. Rex, J. H., M. G. Rinaldi and M. A. Pfaller (1995) Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1-8.
8. Cannon, R. D., E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, K. Tanabe, M. Niimi and B. C. Monk (2007) *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology.* **153**, 3211-3217.
9. Mishra, N. N., T. Prasad, N. Sharma, A. Payasi, R. Prasad, D. K. Gupta and R. Singh (2007) Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **54**, 201-235.
10. Johnson E. M., D. W. Warnock, J. Luker, S. R. Porter and C. Scully (1995) Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 103-114.
11. Hitchcock, C. A. (1993) Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 1039-1047.
12. Konopka, K. and T. Goslinski (2007) Photodynamic therapy in dentistry. *J. Dent. Res.* **86**, 694-707. Erratum in: *J. Dent. Res.* **86**, 1126.
13. Paulino, T. P., K. F. Ribeiro, G. Jr. Thedei, A. C. Tedesco and P. Ciancaglini (2005) Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* **50**, 353-359.
14. Kömerik, N., H. Nakanishi, A. J. MacRobert, B. Henderson, P. Speight and M. Wilson (2003) In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 932-40.

15. Bertoloni, G., E. Reddi, M. Gatta, C. Burlini and G. Jori (1989) Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 957-966.
16. Wilson, M. and N. Mia (1993) Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J. Oral Pathol. Med.* **22**, 354-357.
17. Jackson, Z., S. Meghji, A. MacRobert, B. Henderson and M. Wilson (1999) Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med. Sci.* **14**, 150-157.
18. Bliss, J. M., C. E. Bigelow, T. H. Foster and C. G. Haidaris (2004) Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2000-2006.
19. Lambrechts, S. A., M. C. Aalders and J. Van Marle (2005) Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2026-2034.
20. Demidova, T. N. and M. R. Hamblin (2005) Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2329-2335.
21. Chabrier-Roselló, Y., T. H. Foster, N. Pérez-Nazario, S. Mitra and C. G. Haidaris (2005) Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4288-4295.
22. Donnelly, R. F., P. A. McCarron, M. M. Tunney and A. David Woolfson (2007) Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J. Photochem. Photobiol. B.* **86**, 59-69.
23. Zanin I. C., R. B. Gonçalves, A. B. Junior, C. K. Hope and J. Pratten (2005) Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 324-330.

24. Peloi L. S., R. R. Soares, C. E. Biondo, V. R. Souza, N. Hioka and E. Kimura (2008) Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J. Biosci.* **33**, 231-237.
25. Teichert M. C., J. W. Jones, M. N. Usacheva and M. A. Biel (2002) Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **93**, 155-160.
26. Junqueira J. C., J. da Silva Martins, R. L. Faria, C. E. Colombo, A. O. Jorge (2009) Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* **1**: [Epub ahead of print].
27. Wainwright, M. (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 13-28.
28. Doiron, D. R., L. O. Svaasand and A. E. Profio (1983) Light dosimetry in tissue applications to photoradiation therapy. In *Porphyrin Photosensitization* (Edited by D. Kessel and T. J. Dougherty), pp. 63-75. Plenum, New York.
29. Profio, A. E. and D. R. Doiron (1981) Dosimetry considerations in phototherapy. *Medical Physics.* **8**, 190-196.
30. Takakura, N., Y. Sato, H. Ishibashi, H. Oshima, K. Uchida, H. Yamaguchi and S. Abe (2003) A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol. Immunol.* **47**, 321-326.
31. Sanitá, P. V., C. E. Vergani, E. T. Giampaolo, A. C. Pavarina and A. L. Machado (2008) Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses.* **21**, [Epub ahead of print].
32. Zeina, B., J. Greenman, W. M. Purcell and B. Das (2001) Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* **144**, 274-278.
33. Müller, P., B. Guggenheim and P. R. Schmidlin (2007) Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur. J. Oral Sci.* **115**, 77-80.

34. Douglas, L. J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**, 30-36.
35. Soukos, N. S., S. E. Mulholland, S. S. Socransky and A. G. Doukas (2003) Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg. Med.* **33**, 161-168.
36. de Beer, D., R. Srinivasan and P. S. Stewart (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4339-4344.
37. Sternberg, E. D. and D. Dolphin (1998) Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* **54**, 4151-4202.
38. Lambrechts, S. A., M. C. Aalders, F. D. Verbraak, J. W. Lagerberg, J. B. Dankert and J. J. Schuitmaker (2005) Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J. Photochem. Photobiol. B.* **79**, 51-57.
39. Wilson, M. and N. Mia (1994) Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* in vitro. *Lasers Med. Sci.* **9**, 105-109.
40. Munin, E., L. M. Girollo, L. P. Alves and M. S. Costa (2007) Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Photochem. Photobiol. B.* **88**, 16-20.
41. Girollo, L. M., M. P. Felipe, M. A. de Oliveira, E. Munin, L. P. Alves and M. S. Costa (2007) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med. Sci.* **22**, [Epub ahead of print].
42. Soares, B. M., D. L. da Silva, G. R. Sousa, J. C. Amorim, M. A. de Resende, M. Pinotti and P. S. Cisalpino (2009) In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* **94**, 65-70.

43. Maschesini, R., A. Bertoni, S. Andreola, E. Mellari and A.E. Sichirollo (1989) Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissue in vitro. *Appl. Opt.* **28**, 2318-2324.
44. Cheong, W. F., S. A. Prahl and A. J. Welch (1990) A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J. Quant. Electr.* **26**, 2166-2185.
45. Arnfield, M. R., R. P. Mathew, J. Tulip, and M. S. McPhee (1992) Analysis of optical coefficients using an approximate equation valid for comparable absorption and scattering. *Phys. Med. Biol.* **37**, 1219-1230.
46. Star, W. M. (1997) Light dosimetry in vivo. *Phys Med Biol.* **42**, 763-787.
47. Stolik, S., J. A. Delgado, A. Pérez and L. Anasagasti (2000) Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. *J. Photochem. Photobiol. B.* **57**, 90-93.
48. Alexiades-Armenakas M. (2006) Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin. Dermatol.* **24**, 16-25.
49. Kulak, Y., A. Arikan and N. Delibalta (1994) Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J. Prosthet. Dent.* **72**, 283-288.
50. Samaranayake, L.P. and T. W. MacFarlane (1981) A retrospective study of patients with recurrent chronic atrophic candidosis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **52**, 150-153.
51. Lyon, J. P. and M. A. de Resende (2006) Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **102**, 632-638.

Table 1. Scoring of histological events (ISO 7405: 1997)

Score	Histological Events
0	Inflammation absent
1	Mild inflammation
2	Moderate inflammation
3	Severe inflammation
4	Abscess formation

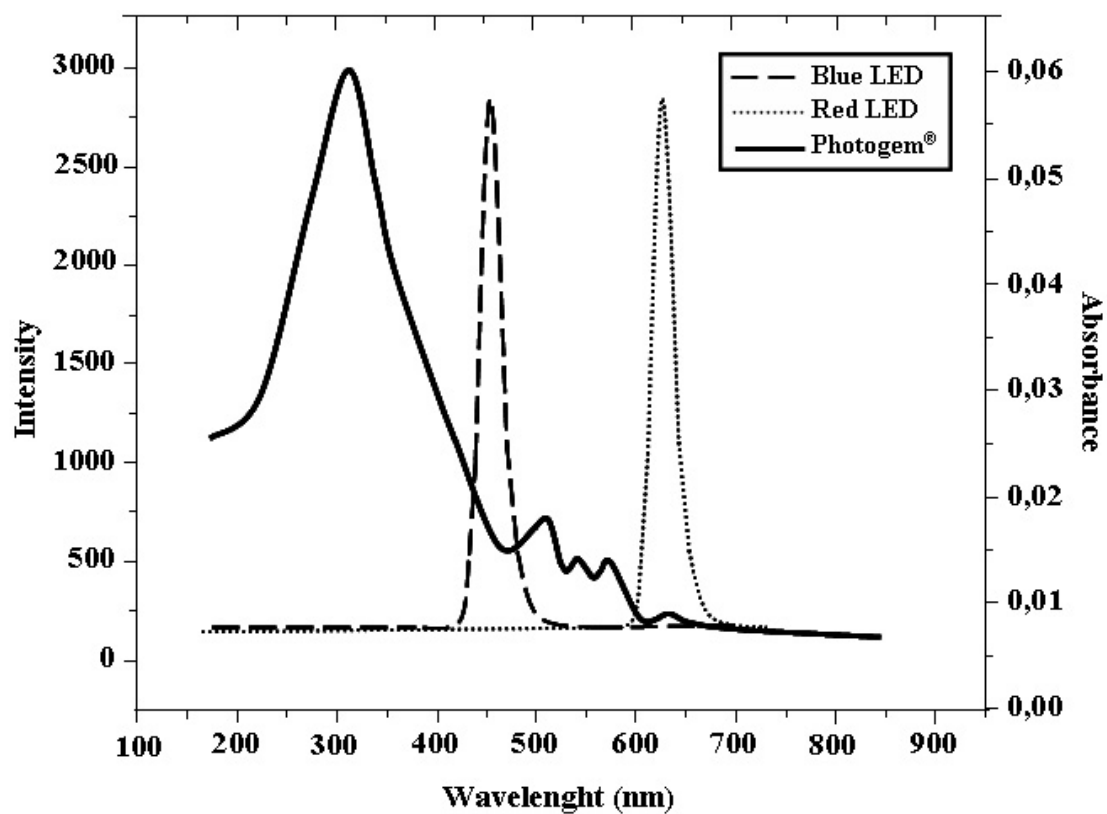


Figure 1. Absorption bands of Photogem® and intensity of blue (455 nm) and red (630 nm) LED light.

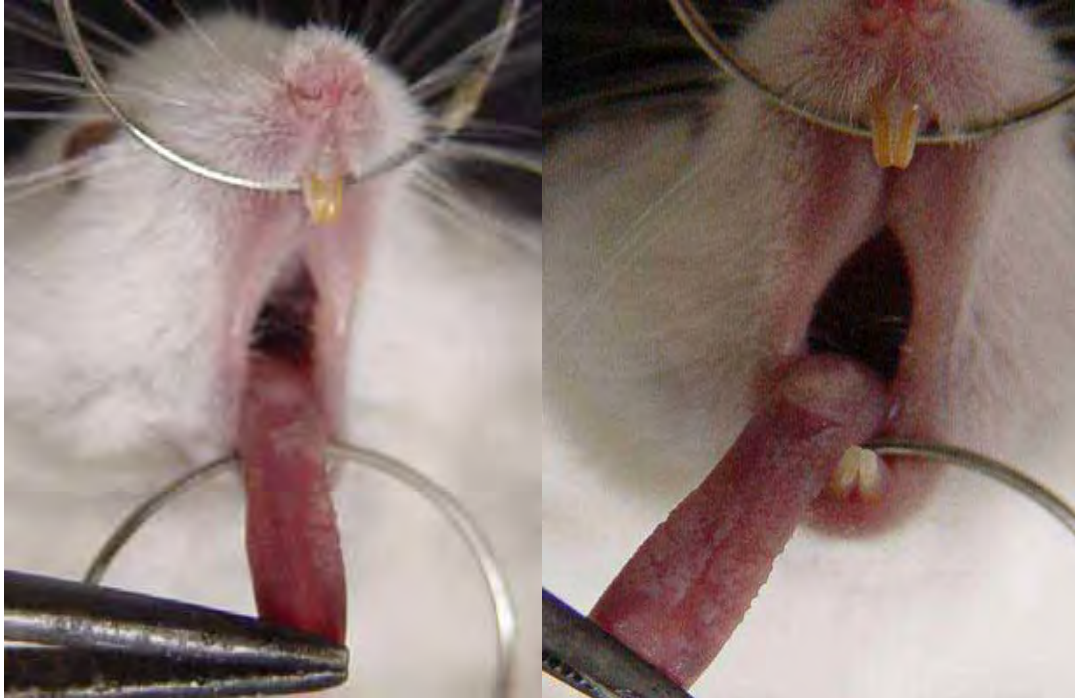


Figure 2. White patches or pseudomembranes on the dorsal tongue of immunosuppressed mice four days after *C. albicans* inoculation.

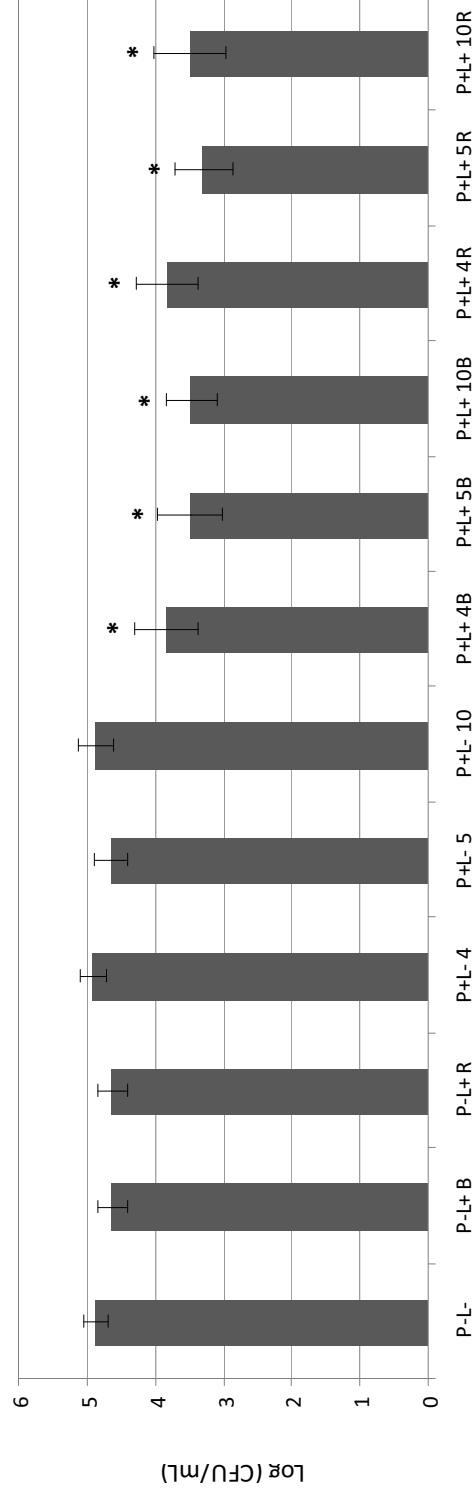


Figure 3. Mean number of viable *C. albicans* taken from tongue dorsum of immunosuppressed mice. Animals in the PDT groups were treated with 400 mg/L (P+L+ 4B and P+L+ 4R), 500 mg/L (P+L+ 5B and P+L+ 5R) or 1000 mg/L (P+L+ 10B and P+L+ 10R) of Photogem[®] and irradiated with 306 J/cm² of LED light at 455 nm (P+L+ 4B, P+L+ 5B and P+L+ 10B) or 630 nm (P+L+ 4R, P+L+ 5R and P+L+ 10R). Mice were also treated with the same fluence of LED light alone at 455 nm (P-L+ B) or 630 nm (P-L+ R) and with PS alone at 400 mg/L (P-L- 4), 500 mg/L (P-L- 5) or 1000 mg/L (P-L- 10). Control group consisted of animals which were not treated with PS nor LED (P-L-). N = 5 in each group (except the control group with N = 7). *: significant difference ($P < 0.05$) compared to control group (P-L-). Error bars indicate standard deviations.

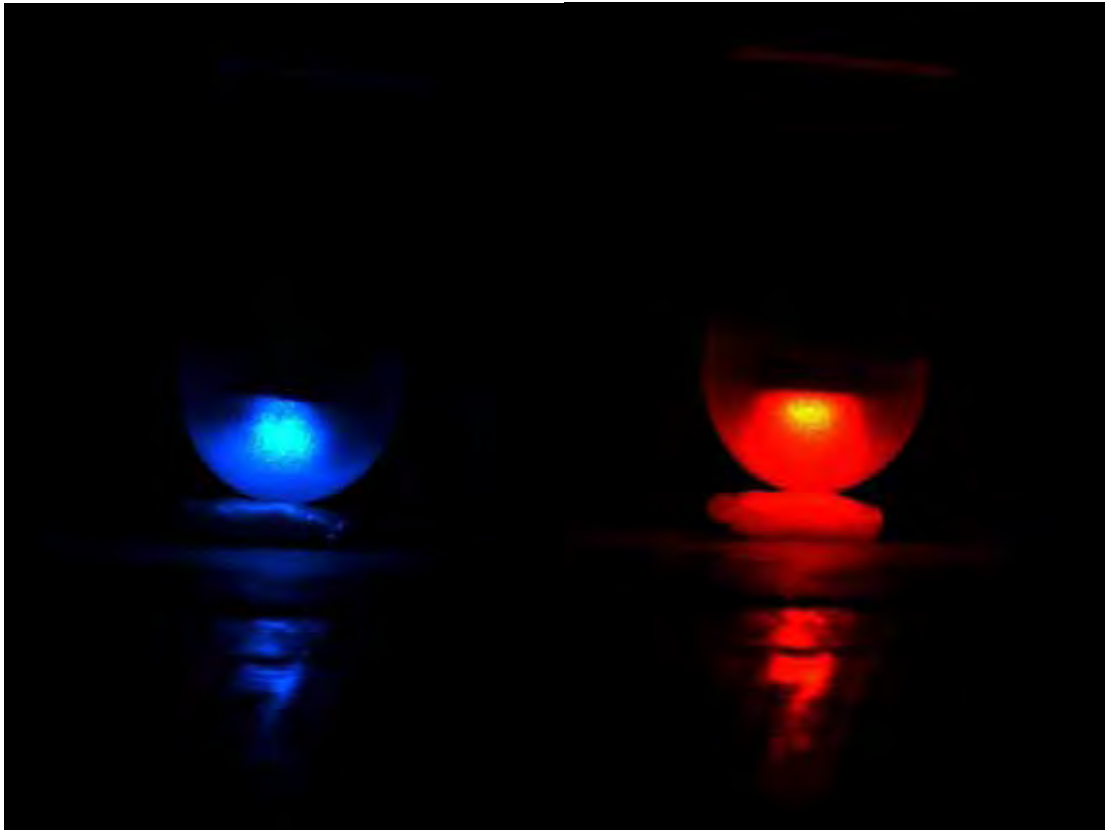


Figure 4. Blue and red LED light scattering by the tongue tissue.

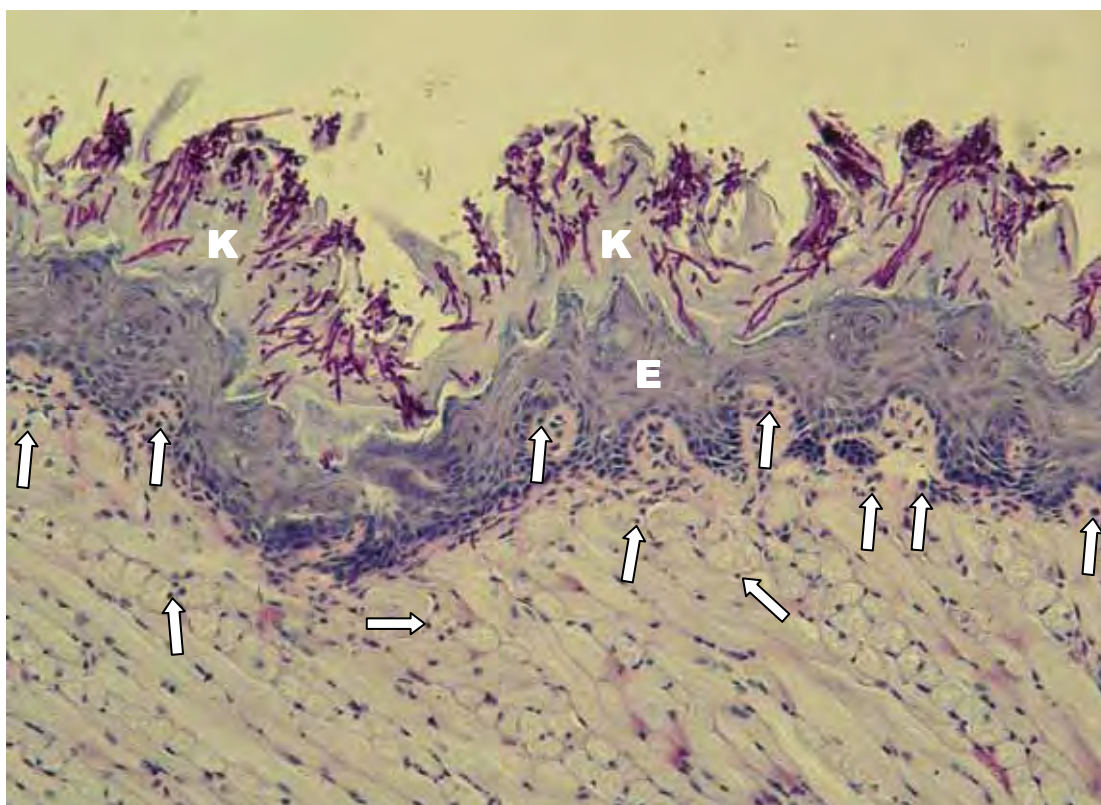


Figure 5. Histological section of the tongue of immunosuppressed mice infected with *C. albicans* after PDT. Animals submitted or not to PDT showed a high number of pseudohyphae in the keratinized (K) layer without invasion in deep layers of the continuous epithelium (E). Mild inflammatory reaction in the subjacent connective mediated by mononuclear cells (arrows) was observed. PAS-H, 200x.



Capítulo 2

Comparison of Photodynamic Therapy and Conventional Antifungal Therapy in the Treatment of Denture Stomatitis: a preliminary study

Ewerton Garcia de Oliveira Mima¹

Ana Cláudia Pavarina^{1*}

Elaine Maria Sgavioli Massucato²

Carlos Eduardo Vergani¹

Arnaldo Lopes Colombo³

Vanderlei Salvador Bagnato⁴

¹ Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, São Paulo State University – UNESP; Humaitá Street, 1680, 14.801-903, Araraquara, SP, Brazil.

² Department of Diagnostic and Surgery, Araraquara Dental School, São Paulo State University – UNESP; Humaitá Street, 1680, 14.801-903, Araraquara, SP, Brazil.

³ Division of Infection Diseases, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴ Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo – USP; Caixa Postal 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil.

Corresponding author: Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Pavarina

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, nº 1680 – CEP: 14801–903, Araraquara, SP, Brazil

Phone: #55#016#33016410

Fax: #55#016#33016406

e-mail: pavarina@foar.unesp.br

Abstract

This randomized clinical trial compared the clinical and mycological efficacy of Photodynamic Therapy (PDT) with that of topical antifungal therapy (nystatin oral suspension) for the treatment of denture stomatitis (DS) and identified the prevalence of *Candida* species. Patients (n = 40) were randomly assigned to one of two groups of 20 subjects each; NYS group: patients received topical treatment with nystatin (100,000 IU) four times daily for 15 days; PDT group: denture and palate of patients were sprayed with 500 mg/L of Photogem[®] and, after 30 min of incubation, illuminated by LED light at 455 nm (37.5 and 122 J/cm², respectively) three times a week for 15 days. Mycological cultures taken from dentures and palates and standard photographs of the palates were performed at baseline (day 0), at the end of the treatment (day 15) and at the follow-up (days 30, 60 and 90). Colonies were quantified (CFU/mL) and identified by biochemical tests. Fisher's exact test was used to analyse the predisposing factors. The ln(CFU/mL) values were evaluated by ANOVA and Tukey tests. The severity of inflammation of the palate in the photographs was classified by two blind observers, and the agreement between them was assessed by the kappa test. Significant difference was assumed when $P < 0.05$. The results demonstrated that both treatments reduced significantly the CFU/mL values at the end of the treatments and on day 30 of the follow-up period ($P < 0.05$). Only age of dentures was a significant ($P = 0.045$) predisposing factor associated with the degree of inflammation of the palate. NYS and PDT groups showed a rate of clinical success of 53 and 45%, respectively. *C. albicans* was the most prevalent species identified. PDT appears to be an alternative method for the treatment of DS.

Keywords: denture stomatitis, nystatin, photodynamic therapy, *Candida*

Introduction

Denture stomatitis (DS) is the most common form of oral candidosis with overall incidence of 11-65% of complete denture wears⁵¹. This recurring disease is characterized by different degree of inflammation of the mucosa under the upper denture, ranging from petechiae to generalized inflammation with papillary hyperplasia⁶. Although DS is asymptomatic in the majority of cases, patients may complain of discomfort, mucosal burning, halitosis, taste alterations or slight bleeding and swelling in the palate mucosa². The etiology of this problem is multifactorial: decreased salivary flow, medication, endocrinopathies, immunosuppression, metabolic and nutritional factors, smoking, increased age of denture, denture trauma, continuous denture wearing, and poor denture hygiene have been implicated^{20,22,72,82,83,85}. Nonetheless, the denture-palatal interface offers a unique ecological niche for microorganism colonization because of the relatively anaerobic and acidic environment favoring yeast proliferation without any other predisposing factor present²¹.

Candida albicans is the yeast species most frequently isolated in significant quantities in subjects with DS. This oral fungal pathogen is able to grow in a variety of morphological forms, ranging from blastopores to hyphae. The filamentous growth can promote tissue penetration during the early stages of infection⁸⁹. Moreover, *C. albicans* has the ability to adhere to mucosal and denture surfaces, which is considered as the first step in the pathogenesis of DS^{3,34,40,79}. Upon soft and hard surfaces within the oral cavity, *C. albicans* grows as biofilm which consists of a complex community of cells embedded in a matrix of extracellular polysaccharide^{77,78}. When cells exist in a biofilm, they exhibit distinctive phenotypic properties from planktonic cells and increased resistant to antimicrobial agents^{25,65}. Despite *C. albicans* is the most prevalent and virulent species of the genus *Candida*, other non-*albicans* species are often isolated from acrylic surface and the palatal mucosa, such as (in descending order of virulence): *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei* and *C. guilliermondii*⁷¹. The emergence of other *Candida* species is important because

they may exhibit higher denture surface adherence and acquired resistance against antifungal drugs⁶³.

Antifungal agents are commonly used to treat DS, but improvement of denture hygiene, discontinuation of nocturnal denture wear, and eventually relining denture or denture replacement are also required. Topical agents, such as nystatin and miconazole have been used effectively¹⁸. However, the diluents effect of saliva and the cleansing action of the oral musculature tend to reduce the agents to subtherapeutic concentrations⁵. Then, treatments regimens tend to be prolonged and recurrence rates are high^{5,11,67}. Systemic antifungal agents, such as amphotericin B and fluconazole are also effective, but they do not eradicate the microorganisms that colonize the denture^{5,19}. Nonetheless, the major problem associated with the use of antifungal drugs is the development of resistant species^{23,49,52,69,80}.

Therefore, the search for new therapeutic approaches is necessary. A promising modality is Photodynamic Therapy (PDT) that uses a photosensitizing agent and light of appropriate wavelength. The interaction between the photosensitizer (PS) and light in the presence of oxygen produces reactive species, such as singlet oxygen and free radicals, which causes cell damage and death^{39,56,92}. Due to the non-specific oxidising agents, organism resistant to conventional antifungals could be successfully killed by PDT and the development of resistance to such therapy seems to be unlikely. Although PDT is more usually applied for treating cancer, several studies have been reported that microorganisms, such as bacteria, viruses, and fungi, can be killed by PDT^{39,56,92}. It has been demonstrated that PDT is effective against oral species and may not promote damage to host cells and tissues^{55,73}.

In vitro investigations showed that *Candida* spp. are susceptible to photoinactivation^{12,15,24,37,38,50,60,94}. Usually, dyes (toluidine blue and methylene blue) and porphyrins are used as PS combined with red laser light. However, light sources with simpler technology and lower cost than lasers, such as light-emitting

diodes (LED), have been applied with success in PDT^{74,95}. In scientific literature, in vivo investigations of antimicrobial PDT are scarce. One study reported complete photoinactivation of *C. albicans* in a murine model of oral candidosis⁹⁰ and another described fewer epithelial alterations and lower chronic inflammatory response in rats submitted to PDT⁵³. Both investigations used topical application of methylene blue associated with red laser light irradiation. Nevertheless, dyes have the undesirable effect of staining teeth, lips, tongue and buccal mucosa. On the other hand, hematoporphyrin derivates, the first-generation sensitizers given FDA approval for use in clinical PDT⁹², are the most widely studied and clinically used PS in anticancer PDT⁵⁶. Furthermore, the effect of antimicrobial PDT clinical trial against oral candidosis is still not known in scientific literature. Then, the aims of the present randomized investigation were to compare the efficacy of PDT with that of conventional antifungal therapy for the treatment of DS and to identify the prevalence of *Candida* species.

Materials and Methods

Patient Selection

Edentulous denture-wearing patients attending the Araraquara Dental School for prosthetic treatment were examined for clinical evidence of DS. Only healthy people were included and the exclusion criteria was based on the medical history of each individual, which was checked for factors known to affect carriage of *Candida* spp., such as diabetes, anaemia, immunosuppression and cancer therapy (radio- or chemotherapy). Similarly, individuals who had received or were currently receiving treatment with antibiotics, antifungals or steroids in the past 3 months were excluded. A total of 40 voluntary patients were selected to include in the present study. The protocol of the whole project was reviewed by the Ethics Committee of the Araraquara Dental School, São Paulo State University, and each subject signed an informed consent form (Anexos). Medical and dental histories of the patients, as well as denture hygiene practices, constant

or nocturnal denture wear were recorded. A comprehensive oral examination was performed by the same investigator, and the age, gender of the patients, medication use, smoking and denture age were also recorded (Anexos). These predisposing factors are shown in Table 1. DS was classified according to the criteria proposed by Newton; Type I: petechiae dispersed throughout all or any part of palatal mucosa in contact with the denture (localized slight inflammation); Type II: macular erythema without hyperplasia (generalized simple inflammation); Type III: diffuse or generalized erythema with papillary hyperplasia (inflammatory papillary hyperplasia).

Photosensitiser and light sources

The PS used in this study was a haematoporphyrin derivative produced in Moscow-Russia (Photogem[®]). Solutions of 500 mg/L of Photogem[®] were prepared by dissolving the powder in sterile saline and kept in the dark instantly before use (pH 6.6). The absorption bands of Photogem[®] are shown in Figure 1.

Two light-emitting diodes (LEDs, LXHL-PR09, Luxeon[®] III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA) devices were designed by Instituto de Física de São Carlos (University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil) especially for this investigation. They covered the wavelength range from 440 nm to 460 nm, with maximum emission at 455 nm (royal blue). One device was used to illuminate the denture, which was composed of twenty-four LEDs uniformly distributed into the device, resulting in a light intensity of 24 mW/cm², and three air coolers that avoid the heating of the denture (Figure 2). The other device, designed to irradiate the palate of the patients, was composed of ten LEDs uniformly distributed on a circular platform with a power output of 260 mW (Figure 3). The intensity of light delivered was 102 mW/cm², considering a distance of 2 cm from the platform inside the mouth to the deepest area of the palate. Joined to this platform, a semiconducting chip known as Peltier was used to dissipate the heat generated by LED light. This chip and an air cooler were used

to avoid the heating of the device. For illumination, the platform stayed inside the patients' mouth with the LEDs toward to the palate.

Treatment groups

Over the 3-month duration of treatment and follow-up of each patient, all subjects were instructed to brush their dentures with coconut soap⁷ followed by toothpaste after every meal and before sleeping. Each patient received a soft toothbrush at the beginning of the treatment. They also received instructions to immerse the dentures in filtered water overnight. The patients were randomly assigned to one of two treatment groups of 20 subjects each. In the NYS group, patients were submitted to topical antifungal treatment with nystatin oral suspension 100,000 IU. Each patient received the medication and was instructed to gargle the medication for 1 minute four times daily for 15 days. In the PDT group, each patient had its maxillary denture and palate individually submitted to PDT. The denture was sprayed with PS, placed in transparent plastic bags and left in the dark for 30 minutes (pre-irradiation time, PIT). For illumination, the denture was positioned inside the LED device and irradiated for 26 minutes (37.5 J/cm²). The palate was also sprayed with PS and illuminated after 30 minutes of PIT. For palate irradiation, the other LED device was handled by the investigator, the platform with LEDs was placed in the patients' mouth and the palate was illuminated for 20 minutes (122 J/cm²). PDT was performed three times a week for 15 days (6 sessions) in each patient.

Clinical and Mycological procedures

For each patient of both groups, oral swabs samples were collected from the palatal mucosa and the tissue surface of the upper denture. 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. Aliquot of 50 µL from this suspension was spread plated on CHROMAgar Candida (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, SP, Brazil) and incubated at 30°C for 5 days. Serial 10-fold dilutions from 10⁰ to 10⁻³ were plated onto Sabouraud

Dextrose Agar (SDA, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, EUA) with 5 µg/mL of chloramphenicol. SDA plates were incubated at 37°C for 48 h. Colonies on SDA were quantified using a digital colony counter (CP 600 Plus, Phoenix Ind. Com. Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brazil) and the colony forming unit per milliliter (CFU/mL) was determined. Swabs were collected before treatment (day 0), at the end of the treatment (day 15), and at the follow-up (days 30, 60 and 90). To document the clinical response to treatment, standard photographs of the palate of all patients were taken in these same periods (days 0, 15, 30, 60 and 90). Colonies on CHROMAgar Candida were presumptively identified by colony color and submitted to biochemical tests to confirm all identifications. For this, one colony of each color type on CHROMAgar Candida was transferred onto fresh SDA for purity. After 48 h at 37°C, yeasts isolates were identified using the following biochemical tests: carbohydrate assimilation pattern using the 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 test¹ for discriminating *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

Statistical analysis

Numbers of CFU/mL were logarithm transformed to achieve a normal distribution. However, unlike the data obtained from palate, the distribution of the ln-transformed data obtained from dentures did not follow a normal distribution. Since the patients were evaluated over time, a non-parametric test was not considered appropriate to analyse these paired data. Then, a random-effects statistical model for longitudinal data was used. With this model, data from dentures were transformed $\{[\ln(\text{CFU/mL})]^{3/2}\}$ to ensure normality of residuals. The values obtained from palate and dentures were analysed separately. The factors treatment group (NYS or PDT) and time (days 0, 15, 30, 60 and 90) were submitted to analysis of variance (ANOVA) and $P < 0.05$ taken as significant. When differences were found, Tukey's post hoc test was implemented (Apêndice 2).

Fisher's exact test was used to assess differences in the degree of inflammation of the palate in relation to the predisposing factors, and significance was assumed when $P < 0.05$ (Apêndice 2).

The standard photographs were evaluated by two independent observers blinded to the treatment groups, the time of examination and patients' identity. These observers were instructed to classify each photograph of the palate as healthy or with DS type I, II or III. The kappa test was used to assess the agreement between the observers and $P < 0.05$ was considered significant (Apêndice 2).

Results

Mycological efficacy

Statistical analysis showed no significant difference between the CFU/mL values obtained from NYS and PDT groups during all the period of this study. Then, the CFU/mL values from both groups were evaluated together at each time of evaluation (days 0, 15, 30, 60 and 90). For dentures, a significant reduction of $[\ln(\text{CFU/mL})]^{3/2}$ mean values was observed on days 15 and 30 compared with baseline (day 0). This reduction was higher on day 15 than on day 30 (Figure 4). On the other hand, no significant difference was observed on days 60 and 90 compared to baseline (day 0). At the follow-up (days 30, 60 and 90), a significant increase of the $[\ln(\text{CFU/mL})]^{3/2}$ mean values was verified compared with the end of treatment (day 15). No significant difference was found among the days of the follow-up period (days 30, 60 and 90) (Figure 4). For palate, a significant reduction of $\ln(\text{CFU/mL})$ mean values was also verified on days 15 and 30 compared with baseline (day 0) (Figure 5). However, no significant difference was either verified on days 60 and 90 compared to baseline (day 0). At the follow-up period, only on day 60 a significant increase of the $\ln(\text{CFU/mL})$ mean values was found compared with the end of treatment (day 15). On days 30 and 90, the $\ln(\text{CFU/mL})$ mean values were not significant different from that of

day 15 (Figure 5). No significant difference was either observed among the days of the follow-up period (days 30, 60 and 90).

In the baseline (day 0), 97.5% of the swabs taken from the entire fitting surface of the dentures and 70% of the swabs taken from the palatal mucosa produced yeast growth on agar plates. During all the period of this investigation, the CFU/mL values from palate of the patients from both groups were lower than those from dentures and a large number of null values were obtained from palate.

Patients and predisposing factors

On day 0, the distribution of patients with DS type I, II and III for NYS group was 20, 65 and 15%, respectively, and for PDT group was 25, 50 and 25%, respectively. The Fisher's exact test showed that only the age of the dentures was significantly associated with the severity of inflammation of the palate ($P = 0.045$). There was no significant association between the other predisposing factors (age, gender, drugs and smoking) and the degree of inflammation.

Clinical efficacy

The evaluation of the photographs showed high levels of agreement ($P < 0.001$) between the observers for every time of examination: on day 0, kappa = 0.907 [standard error (SE) = 0.164]; on day 15, kappa = 0.859 (SE = 0.120); on day 30, kappa = 0.834 (SE = 0.118); on day 60, kappa = 0.852 (SE = 0.126); and on day 90, kappa = 0.875 (SE = 0.126). These k coefficients are considered "almost perfect", according to the recommendations of Landis, Koch⁶². Once a high level of interrater reliability was found, the percentage of patients showing cure or improvement of the palatal inflammation was determined. Clinical success (cure or improvement of the palatal inflammation) was considered for each patient whose degree of inflammation at the end of the treatment (day 15) was absent or lower than at the baseline (day 0). Thus, for the NYS group, 53% of the patients had clinical success, while 41 and 6% showed respectively no alteration and

worsening (failure of the treatment) of the palatal inflammation. For the PDT group, 45% of the patients achieved clinical success (Figures 6 and 7) and 55% showed no alteration in the palatal inflammation. At the follow-up period (days 30, 60 and 90), recurrence of the palatal inflammation was observed in 75 and 78% of the patients who had clinical success respectively in the NYS and PDT groups (Figure 8).

Prevalence of Candida spp.

C. albicans was the most common species found in denture and palate of patients during all the period of this investigation, representing 63.3 and 54% of the isolates from NYS and PDT groups, respectively. *C. tropicalis* was the next common yeast (14.9 and 20.9% of the isolates from NYS and PDT groups, respectively), followed by *C. glabrata* (14.4% from NYS group and 11.5% from PDT group). Other species were observed less frequently (Tables 2 and 3). It was verified at the end of the treatment (day 15) that the number of isolates of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* reduced 50, 90 and 62.5% respectively in the NYS group (Table 2) and 50, 45.5 and 71.4% respectively in the PDT group (Table 3) compared with the baseline (day 0). However, at the follow-up (days 30, 60 and 90) the number of these isolates increased compared with the end of the treatments (day 15). In several occasions, it was isolated more than one species of yeast from dentures and palate (23.9 and 21.7% of swabs from NYS and PDT groups, respectively). The combination of *C. albicans* and *C. tropicalis* was the most prevalent of all yeast mixtures in the NYS group (8.7%) and the second most prevalent in the PDT group (7.6%). On the other hand, the association of *C. albicans* and *C. glabrata* was the most prevalent in the PDT group (8.6%) and the second most prevalent in the NYS group (7.6%). Other yeast combination found were: *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* (4.3 and 1.5% in the NYS and PDT groups, respectively), *C. albicans* and *C. guilliermondii* (1.1 and 0.5% in the NYS and PDT groups, respectively), *C. albicans* and *Cryptococcus humicola* (2.2 and 1.0% in the NYS and PDT groups, respectively), *C. albicans* and *C. parapsilosis* (0.5% in the NYS group), *C. albicans* and *C. lusitaniae* (1.0% in the

PDT group), *C. rugosa* and *Cryptococcus* spp. (1.5% in the PDT group), *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. lusitaniae* (1.1% in the NYS group) and *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* (0.5% in the NYS group). Mixed species populations were observed in 60% (12) of the patients from the NYS group and in 70% (14) of the patients from the PDT group on any day of evaluation, but more often at the baseline and follow-up than at the end of the treatment (Table 4). Compared to the baseline (day 0), 50 and 54% of reduction of the mixed species were verified at the end of treatments (day 15) for NYS and PDT groups, respectively.

Discussion

The present investigation compared the clinical and microbiological efficacy of PDT with that of conventional antifungal therapy in patients with DS. The microbiological results showed no difference between PDT and conventional antifungal therapy on the inactivation of *Candida* spp. At the end of both treatments (day 15), significant reduction of CFU/mL recovered from dentures and palate was found compared to baseline (day 0). Interestingly, on day 30 of the follow-up period (15 days after the end of both treatment), the CFU/mL mean values were still significantly lower than those of baseline. It may be explained by the patients' compliance with denture and oral hygiene advice given during this research. Although not sufficient to treat denture stomatitis^{7,70}, denture and oral hygiene are essential to maintain a low level of microorganisms on dentures and oral health.

Nystatin, an antifungal agent belonging to the polyene group of antimycotics, is commonly used in the topical treatment of candidosis. In the present study nystatin oral suspension (100,000 IU) four times daily for 15 days was adequate for reduction of fungal load in DS patients. This drug prevents the biosynthesis of ergosterol in the fungal cell membrane, which is important for the fluidity and integrity of the membrane and for the function of many membrane-

bound enzymes⁹³. In vitro studies have verified a high susceptibility of planktonic cultures of *Candida* spp. to this agent^{45,59} and a significant reduction of yeast adhesion to acrylic strips and buccal epithelial cells after exposure to nystatin^{43,44}. In a clinical trial, Geerts et al.⁴⁷ demonstrated that a nystatin-containing short-term denture liner significantly decreases the salivary yeast count of subjects with DS compared with a liner without nystatin. On the other hand, it has been related that resistant strains often appear after the antifungal treatment^{23,49,52,69,80,93}. In addition, it was observed that, when tested in biofilm models formed on acrylic resin surfaces, *Candida* species, particularly *C. albicans*, are able to exhibit resistance to antifungal agents^{25,61}.

Although several in vitro investigations have confirmed the potential of PDT on inactivation of *Candida* spp.^{12,15,24,37,38,50,60,74,94}, this is the first clinical trial that evaluated the effect of PDT on the treatment of *Candida* infection. Despite Teichert et al.⁹⁰ stated in their manuscript that mice with oral candidosis were treated using PDT, they just observed a dose-dependent eradication of *C. albicans* from oral cavity using methylene blue and laser irradiation. Nevertheless, the regression of lesions, which is an important clinical sign of treatment, was not evaluated by these authors. It has been verified that yeasts are slightly more difficult to kill by PDT than bacteria due to the presence of a nuclear membrane in the yeasts, the greater cell size and the reduced number of targets for singlet oxygen per unit volume of cell^{37,39,96}. Moreover, on epithelial and denture surfaces *Candida* spp. grows as biofilm^{41,75}, which is more resistant to antimicrobials agents and PDT than its planktonic counterpart^{25,38}. It has been suggested that incomplete killing of biofilm microorganisms after PDT might be due to the failure of PS and light penetration into the inner regions of the biofilm^{35,86}. In addition, for biofilm photoinactivation, higher concentrations of PS and light fluences have been required^{38,90,95} than those used for planktonic cultures^{12,15,24,37,50,60,74,94}. This was verified by Teichert et al.⁹⁰, who demonstrated that eradication of *C. albicans* in a murine model of oral candidosis was achieved only with 450 and 500 mg/L of methylene blue and laser light irradiation.

Nonetheless, the molecule size of methylene blue is smaller than the porphyrin used in the present study^{39,56,92} and a smaller molecule can more easily penetrate the inner layers of the biofilm and promote a better sensitization of the cells. On the other hand, at high concentrations, porphyrins may suffer a self-aggregation process in solution, reducing the singlet oxygen yield⁸⁸. In fact, it is difficult to compare the results of this clinical trial with those of in vitro studies and animal models, since the oral environment of humans is different, and factors, such as microbiota and biofilm composition, salivary flux, oral hygiene and food habits, etc. might influence the response to PDT. In this investigation, no significant difference was observed between nystatin and PDT when the reduction of CFU/mL values was analyzed. Then, PDT may be an alternative method for inactivation of *Candida* spp. in DS patients.

During the follow-up period (days 30, 60 and 90), the CFU/mL mean values recovered from dentures were significantly higher than those found at the end of the treatment (day 15). This was an expected result, since progressive recolonization of dentures starts after the end of the treatment^{9,13,17,54}. On the other hand, only on day 60 of the follow-up period, the CFU/mL mean value recovered from palate was significantly higher than that of the end of treatment (day 15). This results obtained during the follow-up period may be explained by the high affinity of *Candida* spp. to adhere to and colonize acrylic surfaces^{16,68}. This finding is in agreement with that of Vanden Abbeele et al.⁹¹, who observed a preferential attachment of yeasts onto dentures rather than on mucosa of denture wearers without DS. Other investigations^{2,21,34,70} also demonstrated that *Candida* spp. is primarily found on the tissue surface of the denture rather than on the inflamed mucosa of DS patients. This result corroborates with that of the present study, since the denture cultures evidenced higher CFU/mL mean values than the palatal cultures for all the periods of time evaluated.

In the present study, it was verified a higher percentage of clinical success in the NYS group (53%) than in the PDT group (45%). Bergendal and Isacson¹⁰ observed a statistically significant improvement of the palatal erythema

of DS patients after 14 days of treatment of dentures with nystatin, but, according to these authors, no patient was totally cured. Nonetheless, Banting et al.⁵ demonstrated resolution of clinical signs and symptoms of oral candidiasis in all individuals submitted to oral therapy and denture immersion in nystatin. The results obtained by Neppelenbroek et al.⁷⁰ showed that miconazole when used in isolation was not effective for the treatment of DS. Clinical failure after topical treatment with antifungal agents is not uncommon and may be attributed to the diluents effect of saliva and the cleansing action of the buccal musculature, which tend to reduce the availability of the drug below that of the effective therapeutic concentration^{5,66}. Moreover, in the NYS group of the present investigation, no antimicrobial treatment of the dentures was performed, which could have contributed to the rate of clinical failure obtained in this group (47%). On the other hand, the high rate of clinical failure observed in the PDT group (55%) might be explained by the clinical conditions in which PDT was performed, such as treatment time (three times a week for 15 days, a total of 6 sessions) and the parameters used. It may be suggested that a longer treatment period could achieve a better resolution of palatal inflammation. Additionally, only one kind and concentration of PS and light fluence were tested in this study. Further trials are necessary to evaluate the effect of additional parameters of PDT, such as other types and concentrations of PS, light fluences, in order to try to find a higher rate of clinical success.

In the present investigation, the clinical failure rates are not in agreement with the microbiological results obtained. It corroborates with the findings of Barbeau et al.⁶ and Santarpia et al.⁸⁴, who verified no significant relation between Newton types of DS and number of yeast colonies. Furthermore, other reports have demonstrated that healthy denture wearers were also *Candida* carriers^{26,76,81,91}. Given that the etiology of DS is multifactorial, a more effective treatment should be directed to all factors involved in this pathology.

This investigation demonstrated that, among the patients who showed clinical success, a high rate of recurrence was obtained at the follow-up

period (75% for NYS group and 78% for PDT group). Recurrence of infection after treatment is terminated is often reported^{5,11,94}, since the tissue surface of the acrylic resin denture acts as reservoirs that harbor microorganisms^{19,34} and, therefore, a potential source of reinfection of patients. Then, the establishment and maintenance of denture hygiene practices, including the removal of dentures for sleeping, are essential factors in the long-term resolution of DS. These advices were constantly given to patients during this investigation. Furthermore, replacement of dentures is also necessary for complete resolution of DS^{29,76}, especially when the dentures are too old. The present study also showed that the age of dentures was the only predisposing factor significantly associated with the degree of inflammation of the palate, i.e. higher degrees of inflammation were associated with older dentures. This result is in accordance with that of Freitas et al.⁴⁶ and Neppelenbroek et al.⁷⁰, who found that the time of denture use was related to DS. Dundar and Ilhan Kal⁴² also showed that length of denture use was an important risk factor for having oral mucosal lesion, especially denture stomatitis. In the study by Coelho et al.²⁷, the greater frequency of DS was observed in patients who had used the same upper denture for 16–20 years. It is recognized that older dentures are more likely to cause oral lesions, including DS^{27,42,46}. In the present study, the age of maxillary denture of 52.5% of patients was over 12 years, which could have contributed for proliferation of yeasts on denture surfaces at follow-up. Then, after the follow-up period of this investigation, patients were referred to denture replacement. According to Bartie et al.⁸, efforts should be concentrated on addressing the host factors that predispose to candida infection. From this standpoint, the provision of new dentures should be considered during the management of DS.

The outcomes of the present study showed that *C. albicans* was the predominant species isolated from denture and palate of patients from NYS and PDT groups (63.3 and 54%, respectively). This find is in agreement with previous reports^{26,31,32,36,48,76,91}. The next most common species found was *C. tropicalis* followed by *C. glabrata* in both groups. Other investigations have also observed

that *C. tropicalis* was the second most prevalent species isolated from oral cavity^{28,36,76,87}. However, other studies have found that *C. glabrata* was the most common yeast after *C. albicans*^{4,26,30,64,91}. The presence of other species was also observed in this investigation, but they were identified in lower frequency. The presence of non-*albicans* *Candida* species is reason of concern, since they are able to cause infection and frequently resistant to antifungal agents^{4,63,71}. In the present study, considerable rates of reduction in the number of isolates of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, as well as other yeasts species, were verified at the end of the treatments. This result demonstrated that these species were susceptible to nystatin and PDT, except *C. tropicalis*, which showed higher susceptibility to nystatin (90% of reduction) than PDT (45.5% of reduction). Nonetheless, the increased number of these isolates observed at the follow-up period compared to the end of the treatments may be attributed to the recolonization of the mucosa and the denture by the yeasts isolated at the baseline. Previous studies have reported the persistence of *Candida* strains by genetic typing after antifungal therapy^{8,30}, suggesting that the recurrence of the disease may be due to failure to eradicate the colonizing strain. The irregularities and porosities present on the acrylic resin surface may contribute to retention of microorganisms in the dentures^{33,58} and favor their recolonization.

During all the period of this investigation, 60 and 70% of the patients from NYS and PDT groups showed mixed species populations. In other studies, more than one yeast species was found in 48.5%⁹¹ and 27.27%²⁶ of subjects without DS, and 38.5%²⁶ of individuals with DS. In this investigation, mixed species were reduced in 50 and 54% for the NYS and PDT groups respectively at the end of the treatments. It suggests that both treatments were effective in eliminating more complex biofilms. In the present study, the association of *C. albicans* and *C. tropicalis*, and *C. albicans* and *C. glabrata* were the most common combinations, followed by *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*. Other associations were detected at a lower rate (0.5-2.2%). A high prevalence of *C. albicans* in combination with *C. glabrata* was also found by other

investigators^{26,30}, as well as *C. albicans* associated with *C. tropicalis*^{14,48,76}. The complex interactions among yeasts in synergistic relationship are not well known, but may be involved in the enhanced pathogenic potential of these associations.

In conclusion, despite the small number of patients and the limitations of this preliminary investigation, the results demonstrated that PDT was as effective as topical nystatin in reducing the CFU/mL of *Candida* spp. from dentures and palates of DS subjects, but a higher number of patients showed decrease of palatal inflammation after nystatin. Additionally, a high rate of recurrence was observed, and *C. albicans* was the most prevalent species identified. Further studies are required to determine more effective clinical parameters for a better response to PDT in DS patients. It is important to emphasize that development of resistance to PDT is improbable due to its mechanism of action. Therefore, PDT seems to be a promising method for the treatment of DS.

Acknowledgments: This research was supported by São Paulo Council of Research (FAPESP – Grant nº 2005/02193-4 and 2005/03226-3).

References

1. 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.
2. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J.* 1979; 147: 267-72.
3. Arikan A, Kulak Y, Kadir T. Comparison of different treatment methods for localized and generalized simple denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 1995; 22: 365-9.

4. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA et al. High prevalence of non-*albicans* yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med*. 2003; 17: 477-81.
5. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995; 61: 199-200, 203-5.
6. Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95: 51-9.
7. Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 2004; 31: 453-9.
8. Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJ, Lewis MAO. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 4066-75.
9. Bergendal T, Holmberg K, Nord CE. Yeast colonisation in the oral cavity and faeces in patients with denture stomatitis. *Acta Odontol Scand*. 1979; 37: 37-45.
10. Bergendal T, Isacson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1980; 88: 446-54.
11. Bergendal T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. *Scand J Dent Res*. 1982; 90: 227-38.
12. Bertoloni G, Reddi E, Gatta M, Burlini C, Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 1989; 135: 957-66.

13. Bissell V, Felix D, Wray D. Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the management of denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 76: 35-9.
14. Blair Y, Bagg J, MacFarlane TW, Chestnutt I. Microbiological assessment of denture hygiene among patients in longstay and daycare community places. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1995; 23: 100-3.
15. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
16. Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. II. The effect of antifungal and prosthetic treatment. *Acta Odontol Scand.* 1970; 28: 283-304.
17. Budtz-Jorgensen E, Theilade E, Theilade J. Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 134-45.
18. Budtz-Jorgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis and angular cheilitis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW. *Oral candidosis*. London: Wright; 1990. p. 156-83.
19. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 61-9.
20. Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol.* 1981; 10: 65-80.
21. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974; 82: 151-90
22. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10: 359-83.

23. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. Microbiology. 2007; 153: 3211-7.
24. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 4288-95.
25. 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.
26. 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.
27. Coelho CM, Sousa YT, Daré AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. J Oral Rehabil. 2004; 31: 135-9.
28. Collin B, Clancy CJ, Nguyen MH. Antifungal resistance in non-*albicans* *Candida* species. Drug Resist Updates. 1999; 2: 9-14.
29. Cross LJ, Riggio MP, Bagg J. Genetic typing of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis before and after itraconazole therapy. Microbial Ecol Health Dis. 1999; 11: 35-40.
30. Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 97: 351-8.
31. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepek M, Zaremba ML et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. Adv Med Sci. 2006; 51: 77-80.

32. Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*. 2003; 46: 187-91.
33. Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J*. 1972; 133: 101-5.
34. Davenport JC. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br Dent J*. 1970; 129: 151-6.
35. de Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 4339-44.
36. 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.
37. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 2329-35.
38. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol. B*. 2007; 86: 59-69.
39. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163: 1-12.
40. Douglas LJ. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *Crit Rev Microbiol*. 1987; 15: 27-43.
41. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003; 11: 30-6.
42. Dunder N, Ilhan Kal B. Oral mucosal conditions and risk factors among elderly in a Turkish school of dentistry. *Gerontology*. 2007; 53: 165-72.

43. 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.
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, Samaranayake LP. The in vitro post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28: 112-6.
46. Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira E Ferreira E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil*. 2008; 35: 370-4.
47. Geerts GA, Stuhlinger ME, Basson NJ. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. *J Oral Rehabil*. 2008; 35: 664-9.
48. Gümrü B, Kadir T, Uygun-Can B, Ozbayrak S. Distribution and phospholipase activity of *Candida* species in different denture stomatitis types. *Mycopathologia*. 2006; 162: 389-94.
49. Hitchcock CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans*. 1993; 21: 1039-47.
50. Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med. Sci*. 1999; 14: 150-7.
51. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis--a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J*. 1992; 37: 107-14
52. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients

- receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 35: 103-14.
53. Junqueira JC, da Silva Martins J, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 1: [Epub ahead of print].
54. Karyotakis NC, Anaissie EJ. The new antifungal azoles fluconazole and itraconazole. *Curr Opin Infect Dis.* 1994; 7: 658-66.
55. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 932-40.
56. Konopka K, Goslinski T Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86: 694-707. Erratum in: *J Dent Res.* 86: 1126.
57. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72: 283-8.
58. Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 788-90.
59. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 349-53.
60. Lambrechts SA, Aalders MC, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2026-34.
61. 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: 345-51.

-
62. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: 159-74.
 63. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007; 86: 204-15.
 64. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res*. 1999; 78: 857-68.
 65. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 34-9.
 66. Martin MV. Antifungal agents. In: Samaranayake LP, Macfarlane TW. *Oral candidosis*. London: Wright; 1990. p. 238-51.
 67. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. *J Med Microbiol*. 1995; 42: 372-9.
 68. McCourtie J, Douglas LJ. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. *J Gen Microbiol*. 1985; 131: 495-503.
 69. Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2007; 54: 201-35.
 70. 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.
 71. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. London: Bailliere Tindale; 1988.

-
72. Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 71-4.
 73. Paulino T P, Ribeiro KF, Thedei GJr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 353-9.
 74. Peloi LS, Soares RR, Biondo CE, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci.* 2008; 33: 231-7.
 75. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16: 86-94
 76. 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: 1115-9.
 77. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005; 4: 633-8.
 78. 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.
 79. Renner RP, Lee M, Andors L, McNamara TF, Brook S. The role of *C. albicans* in denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979; 47: 323-8.
 80. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1-8.
 81. 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. [Epub ahead of print].

-
82. Rossie K, Guggenheimer J. Oral candidiasis: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1997; 9: 635-41.
 83. Sakki TK, Knuuttila ML, Läärä E, Anttila SS. The association of yeasts and denture stomatitis with behavioral and biologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997; 84: 624-9.
 84. Santarpia RP 3rd, Pollock JJ, Renner RP, Spiechowicz E. An in vivo replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. *J Prosthet Dent*. 1990; 63: 437-43.
 85. Sherman RG, Prusinski L, Ravenel MC, Joralmon RA. Oral candidosis. *Quintessence Int*. 2002; 33: 521-32.
 86. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003; 33: 161-8.
 87. Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48: 3-10.
 88. Sternberg ED, Dolphin D. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 1998; 54: 4151-202.
 89. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004; 12: 317-24.
 90. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93: 155-60.
 91. 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.

-
92. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother. 1998; 42: 13-28.
 93. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 382-402.
 94. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. J Oral Pathol Med. 1993; 22: 354-7.
 95. Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 324-30.
 96. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. Br J Dermatol. 2001; 144: 274-8.

Table 1: Distribution of the predisposing factors (age and gender of the subjects, age of maxillary denture, medication use and smoking) for both treatment groups.

Group	Age of subjects	Gender of subjects		Age of dentures	Drugs			Smoking
		F	M		AH	others	none	
NYS	41-78 (62.45)	15	5	2-47 (18.55)	9	15	5	2
PDT	43-80 (61.25)	13	7	1-44 (14)	9	14	6	4

F: female; M: male; AH: antihypertensive (most used drug).

Mean values are given in parenthesis.

Table 2: Number of isolates of each species from dentures and palate found in patients of the NYS group on each day of evaluation.

Species	Day 0	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90	Total
<i>C. albicans</i>	36	18	21	25	19	119 (63.3)
<i>C. tropicalis</i>	10	1	5	6	6	28 (15)
<i>C. glabrata</i>	8	3	6	6	4	27 (14.4)
<i>C. lusitaniae</i>	2	0	0	0	0	2 (1)
<i>C. parapsilosis</i>	3	0	1	0	0	4 (2)
<i>C. guilliermondi</i>	0	2	0	0	0	2 (1)
<i>Cryptococcus humicola</i>	0	3	1	1	0	5 (2.7)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	0	0	1	0	1 (0.5)
None	3	17	16	10	11	57

Percentage values are given in parenthesis.

Table 3: Number of isolates of each species from dentures and palate found in patients of the PDT group on each day of evaluation.

Species	Day 0	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90	Total
<i>C. albicans</i>	26	13	22	18	20	99 (54)
<i>C. tropicalis</i>	11	6	5	8	8	38 (21)
<i>C. glabrata</i>	7	2	4	5	4	22 (12)
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0	2	0	2 (1)
<i>C. rugosa</i>	1	1	0	0	1	3 (1.6)
<i>C. guilliermondi</i>	0	0	0	1	0	1 (0.5)
<i>Cryptococcus humicola</i>	4	3	3	4	3	17 (9)
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	0	0	0	0	1 (0.5)
<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	0	1	0	0	0	1 (0.5)
None	4	12	8	11	10	45

Percentage values are given in parenthesis.

Table 4: Distribution of mixed species populations isolated from dentures and palate in the NYS and PDT groups at the baseline (day 0), at the end of the treatments (day 15) and at the follow-up (days 30, 60 and 90).

Group	Days				
	0	15	30	60	90
NYS	14 (28.6)	7 (14.3)	10 (20.4)	10 (20.4)	8 (16.3)
PDT	13 (30.2)	6 (14)	5 (11.6)	12 (27.9)	7 (16.3)

Percentage values are given in parenthesis.

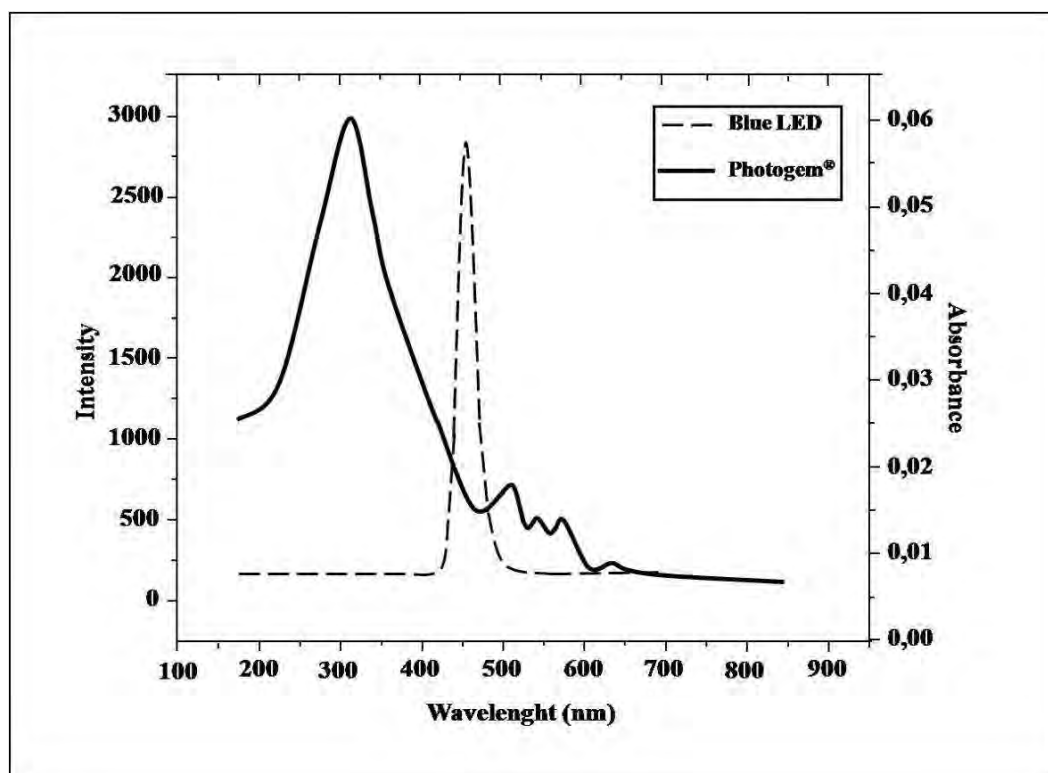


Figure 1: Absorption bands of Photogem[®] and intensity of blue (455 nm) LED light.

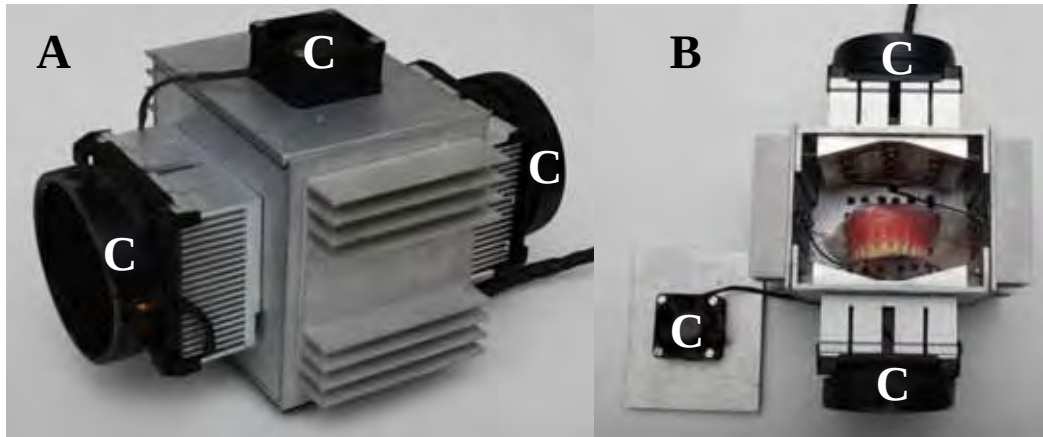


Figure 2: LED device used for illumination of dentures. A: Outside view, B: Inside view. C: Air coolers.

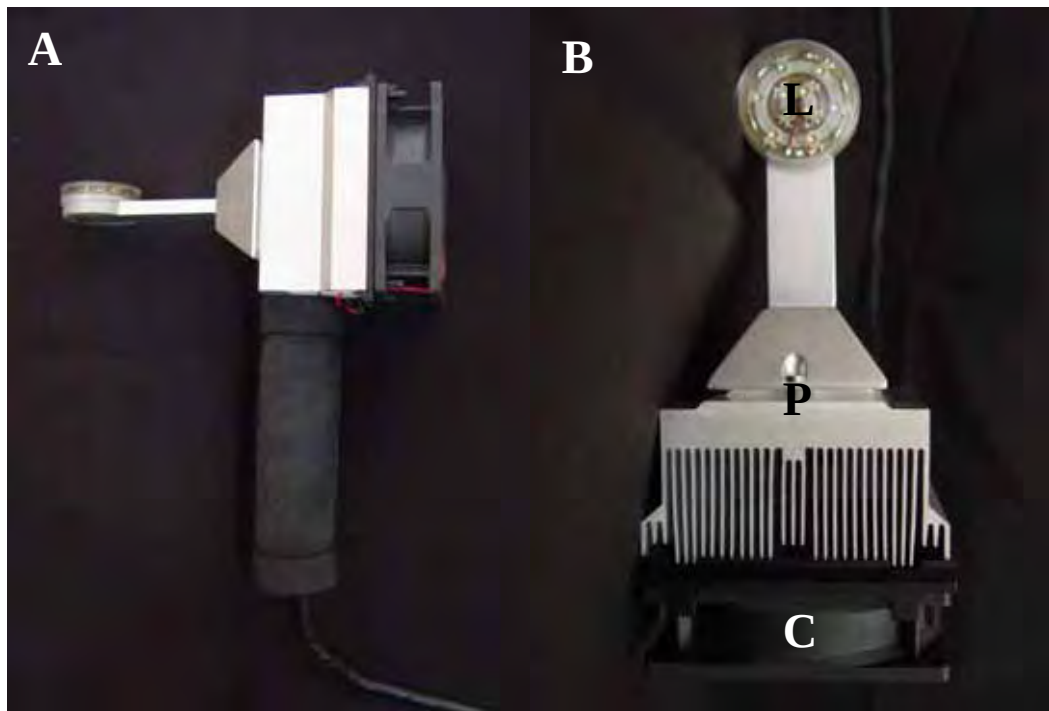


Figure 3: LED device used for illumination of palate. A: Lateral view, B: Top view. L: LEDs; P: Peltier chip; C: Air coolers.

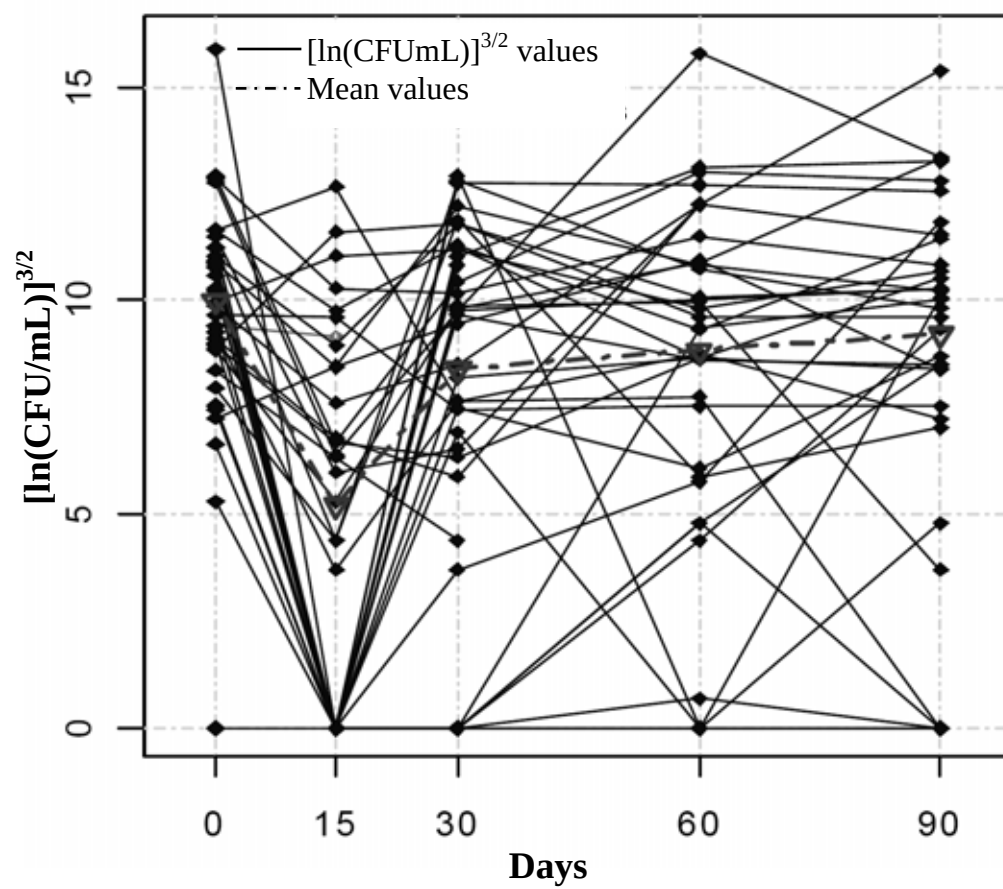


Figure 4: Values of $[\ln(\text{CFU/mL})]^{3/2}$ recovered from dentures of each patient of NYS and PDT groups.

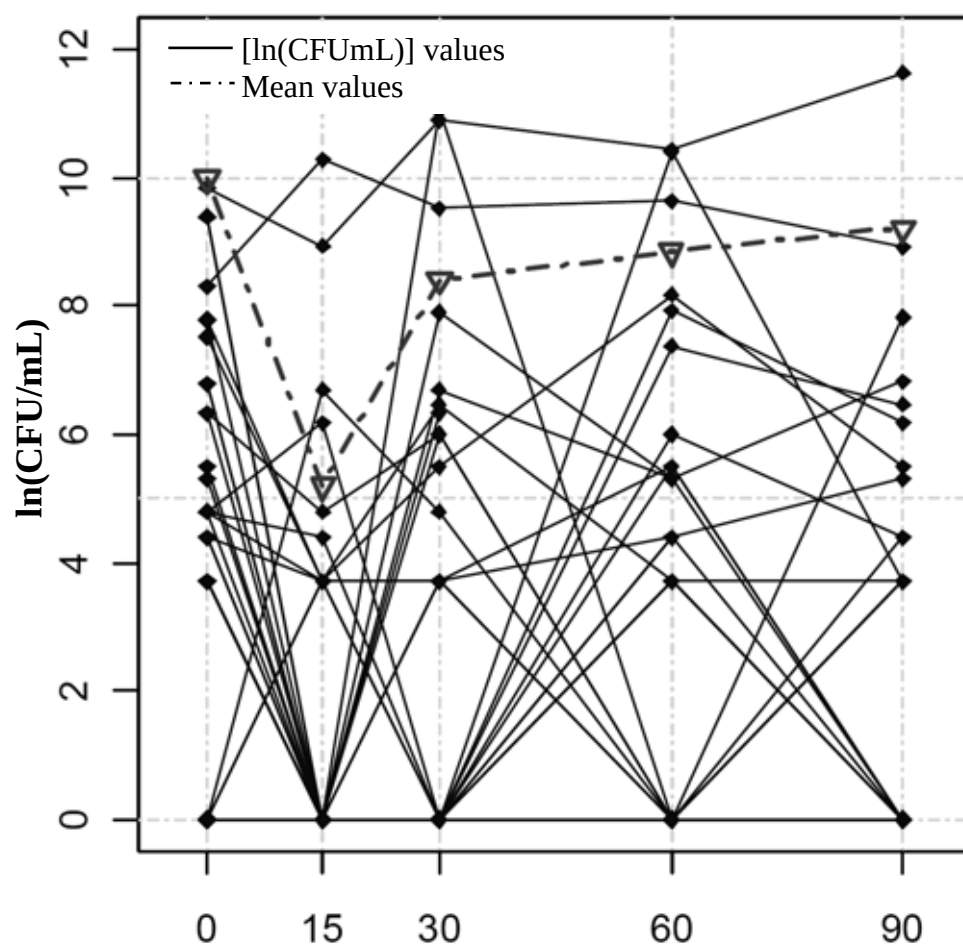


Figure 5: Values of $[\ln(\text{CFU/mL})]$ recovered from palate of each patient of NYS and PDT groups.



Figure 6: Palate of a patient from PDT group at the baseline (day 0).



Figure 7: Palate of a patient from PDT group at the end of the treatment (day 15).



Figure 8: Palate of a patient from PDT group at the follow-up (day 60).



Discussão

Discussão

A candidose é considerada a infecção fúngica mais comum da cavidade bucal e as espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, são frequentemente relacionadas a essa patologia^{95,106}. A incidência dessa enfermidade tem aumentado em pacientes imunossuprimidos e aproximadamente 90% dos indivíduos HIV-positivo apresentam infecção bucal por *Candida* spp.⁴⁴. Nos usuários de prótese removível, a adesão, a colonização de *Candida* spp. e a subsequente formação do biofilme sobre as superfícies das próteses têm sido consideradas um dos principais fatores etiológicos da estomatite protética.

A PDT tem sido apontada como uma alternativa promissora para inativação de bactérias, vírus e fungos^{39,59}. Estudos in vitro verificaram que as células fúngicas (eucariotas) são mais difíceis de serem inativadas pela PDT do que as bactérias (procariotas) por causa da presença de uma membrana nuclear nos fungos, do maior tamanho celular e do reduzido número de sítios de ação para o oxigênio singlete por unidade de volume de célula^{38,39,114}. Apesar disso, esses estudos têm demonstrado a efetiva fotoinativação de *Candida* spp.^{14,17,26,38,40,53,64,112}. No entanto, a possibilidade da utilização da PDT como um método de tratamento de candidose bucal ainda não foi verificado. Dessa forma, o presente estudo avaliou a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* presente no tecido lingual de camundongos em um modelo de candidose bucal. Além disso, utilizando parâmetros determinados no modelo animal, foi comparada a efetividade da PDT em relação à terapia antifúngica tópica com nistatina no tratamento da estomatite protética.

No estudo com animais, foi verificado que a metodologia utilizada para indução de candidose em camundongos promoveu lesões brancas ou pseudomembranas no dorso lingual dos animais associadas a elevados valores de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *C. albicans* (10^{4-5} UFC/mL). Esses resultados estão de acordo com os de Takakura et al.¹⁰⁴ que também observaram lesões brancas em língua de camundongos, constatando,

porém, valores maiores de UFC de *Candida* (10^5 – 10^6) recuperados da cavidade bucal dos animais. A diferença entre os valores de UFC dos dois estudos pode ser atribuída às cepas de *C. albicans* utilizadas para indução da infecção bucal. Enquanto esses autores utilizaram um isolado clínico de um paciente com candidose cutânea, na presente investigação uma cepa de referência (ATCC) foi utilizada. Esses resultados estão de acordo com os de Sanitá et al.⁹³ que verificaram terem isolados clínicos de *Candida* spp. apresentado valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ mais elevados do que cepas ATCC.

Os resultados do estudo animal demonstraram redução significativa dos valores de UFC/mL de *C. albicans* da língua de camundongos após aplicação de 400 mg/L, 500 mg/L e 1.000 mg/L de Photogem[®] associado a 305 J/cm² de luz de LED (455 nm e 630 nm). Foi observado num estudo piloto realizado previamente que tempos menores de iluminação (2 minutos e 45 segundos, 10 e 15 minutos, correspondente a 37,5 J/cm², 152 J/cm² e 229 J/cm², respectivamente) associados a concentrações menores de Photogem[®] (300 mg/L, 100 mg/L e 50 mg/L) não foram efetivos (dados não apresentados). Apenas um estudo obteve fotoinativação dose-dependente de *C. albicans* em um modelo murino imunodeficiente¹⁰⁵. No entanto foi observado que os valores de UFC obtidos pelo modelo animal de candidose utilizado no presente estudo (média de $2,05 \times 10^3$ para o grupo controle positivo) foram maiores do que os descritos por Teichert et al.¹⁰⁵ ($1,94 \times 10^2$). Segundo esses autores, a associação da luz de laser (664 nm) por 687,5 segundos com concentrações de azul de metileno de 250 mg/L a 400 mg/L promoveu redução fúngica significativa enquanto que completa inativação do micro-organismo foi obtida com 450 mg/L e 500 mg/L do corante¹⁰⁵. Esses achados estão parcialmente de acordo com os obtidos pela atual investigação, em que a total inativação de *C. albicans* não foi observada. Enquanto Teichert et al.¹⁰⁵ constataram que a erradicação do micro-organismo foi equivalente a uma redução de 2,74 $\log_{10}$ nos valores de UFC, neste estudo a maior diminuição nos valores de UFC/mL foi de 1,59 $\log_{10}$ utilizando 500 mg/L de Photogem[®] com 305 J/cm² de luz de LED. Essa diferença de redução nos valores de UFC pode ser justificada pelas diferentes combinações de fotossensibilizadores e fontes de luz utilizadas

em ambas as pesquisas. O tamanho da molécula do azul de metileno é menor que o da porfirina^{39,59,108} e uma menor molécula pode penetrar mais facilmente nas camadas mais profundas do biofilme e promover uma melhor sensibilização das células. Além disso, Teichert et al.¹⁰⁵ afirmaram que camundongos com candidose bucal foram tratados pela PDT, mas apenas uma erradicação fúngica dose-dependente foi observada, ao passo que regressão das lesões, que é uma importante resposta clínica do tratamento, não foi reportada. Por outro lado, Müller et al.⁷⁶ verificaram que a PDT não promoveu redução efetiva da microbiota de um biofilme bucal multi-espécies utilizando azul de metileno e luz de laser após uma única aplicação. Apesar de a efetividade desses FS ter sido demonstrada in vivo^{56,105}, a aplicação intrabucal de corantes tem a desvantagem de manchar dentes, língua, lábios, mucosa bucal, restaurações estéticas e superfícies protéticas. Por esse motivo, a utilização de um FS não corante seria mais indicada para a cavidade bucal.

Apesar de a erradicação fúngica não ter sido observada nesta investigação, estudos in vitro têm demonstrado a fotoinativação de *C. albicans* utilizando porfirinas^{14,17,26}. Nessas pesquisas, baixas concentrações de FS e doses de luz têm sido utilizadas. Entretanto, tem sido verificado que a fotossensibilização de *Candida* e a sua subsequente susceptibilidade à PDT podem ser drasticamente reduzidas pelas condições de cultivo, como o tipo de meio de cultura e a presença de albumina^{17,65}. Além disso, como discutido anteriormente, em superfícies epiteliais, *C. albicans* se desenvolve como biofilme⁴¹, que é menos susceptível à PDT do que as células em cultura planctônica. Tem sido sugerido que a inviabilização parcial de biofilmes pela PDT pode ser causada pela ausência de penetração do FS e da luz nas regiões mais profundas do biofilme^{10,98}. Assim, em comparação com os estudos in vitro, as altas concentrações e doses de luz utilizadas para fotoinativação no estudo em animais podem ser atribuídas às respostas fisiológicas de *C. albicans* às condições in vivo. Adicionalmente, uma inativação dose-dependente não foi observada no presente estudo, isto é, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de UFC quando foram avaliadas concentrações de 400 mg/mL,

500 mg/mL e 1.000 mg/mL. Esses resultados podem ser atribuídos às altas concentrações do FS utilizado, uma vez que o FS em altas concentrações pode passar por um processo de agregação, o que reduz a produção de oxigênio singlete durante a PDT¹⁰¹.

Na literatura científica, as fontes de luz de laser são mais frequentemente utilizadas para aplicação da PDT. Todavia, o alto custo desses aparelhos os inviabilizam para muitas instituições. Recentemente, fontes de luz alternativas, como os LEDs, têm sido utilizadas com sucesso para realização da PDT^{82,97,113}. Neste estudo, o LED foi avaliado como uma fonte de luz em virtude da sua capacidade de irradiar áreas mais amplas da que seria possível com o feixe colimado dos lasers. Além disso, os LEDs têm uma tecnologia mais simples e um menor custo em relação aos lasers. Os resultados desta pesquisa não demonstraram diferenças significativas entre os comprimentos de luz de LED utilizados (azul e vermelho) para fotoinativação de *C. albicans*. Esse achado foi inesperado, pois a banda de absorção máxima do Photogem[®] é mais próxima dos 455 nm (azul) do que dos 630 nm (vermelho), que corresponde à banda-Q de menor absorção. Entretanto, a dose de energia selecionada para ambos os comprimentos de onda foi eficaz mesmo para o LED vermelho. Provavelmente, a maior penetração da luz vermelha no biofilme pode ter compensado sua menor absorção pelo Photogem[®]. Isso poderia justificar a ausência de diferença verificada entre os comprimentos de onda azul e vermelho utilizados nesta investigação.

A propagação de luz nos tecidos biológicos tem sido avaliada utilizando mensurações diretas e equações matemáticas complexas^{4,28,72}. Os coeficientes de absorção e distribuição dos tecidos são fatores responsáveis pelos diversos efeitos da interação luz-tecido. Contudo, propriedades ópticas de um mesmo tecido podem diferir entre diferentes pacientes⁹⁹. Apesar dessas considerações, sabe-se que a penetração da luz no tecido é proporcional ao seu comprimento de onda; isto é, quanto maior o comprimento de onda, maior a penetração no tecido^{1,102}. Adicionalmente, fontes de luz não-coerentes, como os LEDs, apresentam menor penetração óptica por causa do maior espalhamento da

luz¹. A distribuição da luz pode ser considerada como um tipo de difusão óptica conforme a luz penetra no tecido. Neste estudo, foi observado que a luz de LED vermelha apresenta maior distribuição do que a luz de LED azul no tecido lingual.

A análise histológica das línguas dos animais demonstrou que a PDT não apresentava efeitos adversos aos tecidos. Esse resultado está de acordo com os verificados por Komerik et al.⁵⁸, que também não verificaram danos aos tecidos periodontais de ratos submetidos à PDT. Recentemente, Junqueira et al.⁵⁶ constataram que ratos com candidose bucal submetidos à PDT apresentavam alterações histológicas teciduais menos significativas do que os animais não submetidos à PDT. Nesta investigação, leveduras e pseudohifas foram observadas apenas na camada queratinizada do tecido sem invasão do epitélio, e a inflamação do tecido conjuntivo subjacente foi classificada como “leve” para todos os camundongos infeccionados por *C. albicans* submetidos ou não à PDT. Portanto, a inflamação do tecido conjuntivo pode ser associada à infecção por *Candida*, e não à PDT. Entretanto, o modelo murino de candidose bucal utilizado nesta pesquisa mostrou previamente, no estudo de Takakura et al.¹⁰⁴, destruição de muitas camadas epiteliais. Os resultados obtidos por esses autores podem ser justificados pela cepa utilizada por eles, uma vez que cepas clínicas isoladas de infecções apresentam maiores fatores de virulência⁶⁹. Os resultados deste estudo concordam parcialmente com os de Teichert et al.¹⁰⁵, pois esses autores também verificaram leveduras e pseudohifas limitadas à camada de queratina, além de observarem ausência de resposta inflamatória em animais não submetidos à PDT e infiltrado inflamatório subepitelial e exocitose neutrofílica após a PDT. Os resultados de Junqueira et al.⁵⁶ demonstraram mais alterações epiteliais e uma resposta inflamatória mais intensa nos ratos submetidos apenas à irradiação de laser. Deste modo, as diferenças entre os achados histológicos deste estudo e dos obtidos por esses autores podem ser atribuídas à fonte de luz laser utilizada por eles.

Os resultados obtidos no estudo em animal podem ser considerados importantes, visto terem demonstrado que a PDT mediada pelo Photogem[®] pode ser utilizada para inativação de *C. albicans* e que, além disso, não causou

alterações histológicas nos tecidos dos animais avaliados. Considerando essas informações, a PDT poderia ser utilizada com segurança em pacientes.

Com base nos parâmetros determinados na investigação em animais, foi realizado um estudo clínico que teve como objetivo principal avaliar a viabilidade da utilização da PDT no tratamento da estomatite protética tendo como parâmetro de comparação o tratamento antifúngico tópico com nistatina (100.000 UI/mL). No estudo clínico foi utilizada a concentração do Photogem[®] que apresentou a maior redução de *C. albicans* nos camundongos, e tempos de iluminação considerados clinicamente aplicáveis. Para isso, novos aparelhos de LED para utilização clínica foram desenvolvidos com uma potência máxima que permitisse o menor tempo de iluminação possível sem promover aquecimento das próteses e dos tecidos bucais dos pacientes durante a irradiação.

Os resultados microbiológicos não demonstraram diferença significativa entre a PDT e o tratamento tópico com nistatina na inativação de *Candida* spp. Ao final de ambos os tratamentos (dia 15), foi verificada redução significativa dos valores de UFC/mL das próteses e do palato dos pacientes comparados com os valores obtidos no baseline (dia 0). Durante o período de acompanhamento, após 15 dias do final de ambos os tratamentos (dia 30), foi constatado que os valores médios de UFC/mL ainda permaneciam significativamente menores do que os do início do tratamento (dia 0). Esses dados podem ser atribuídos à cooperação dos pacientes em relação aos cuidados com a higiene bucal, cujas instruções foram dadas durante esta pesquisa. Apesar de não ser suficiente para tratar a estomatite protética^{8,33,77}, a higiene bucal e da prótese é essencial para a manutenção de uma baixa quantidade de micro-organismos na prótese e para a saúde bucal.

A nistatina é um fármaco antifúngico que pertence ao grupo dos polienos e é freqüentemente utilizada na terapia tópica para o tratamento da estomatite protética. Este estudo constatou que, ao final do tratamento (15 dias), a utilização de nistatina suspensão oral (100.000 UI) quatro vezes ao dia por 15 dias foi efetiva para a redução dos valores das culturas micológicas (UFC/mL) de *Candida* spp. referentes à superfície interna das próteses totais superiores e do

palato dos indivíduos avaliados. Esse medicamento inibe a biossíntese do ergosterol, um esterol presente na membrana plasmática da célula fúngica importante para a manutenção da sua integridade e para função de muitas enzimas ligadas à membrana¹⁰⁹. Estudos in vitro têm verificado uma alta susceptibilidade de *Candida* spp. à nistatina^{46,63} e redução da aderência fúngica ao acrílico e às células epiteliais após exposição a esse medicamento^{45,47}. Em um ensaio clínico, Geerts et al.⁵⁰ demonstraram que a nistatina incorporada a um reembasador de prótese temporário diminuiu significativamente os valores das culturas micológicas (UFC/mL) de pacientes com estomatite protética comparada com o reembasador sem o medicamento. Por outro lado, tem sido relatado o aparecimento de cepas resistentes após o tratamento com antifúngicos^{25,52,55,75,89}. Adicionalmente, foi observado que espécies de *Candida*, particularmente *C. albicans*, quando testadas em modelos de biofilmes desenvolvidos em superfícies acrílicas, exibiram resistência aos antifúngicos nistatina, anfotericina B e fluconazol^{27,66}.

Nesta investigação, a utilização da PDT não resultou em diferenças significativas em relação à nistatina quando a redução dos valores de UFC/mL foi avaliada. Esses resultados estão de acordo com os obtidos no estudo animal, no qual foi obtida redução significativa dos valores de UFC/mL após a PDT. Entretanto, é importante ressaltar que na superfície da mucosa e da prótese, os micro-organismos se desenvolvem como biofilme. Como já mencionado anteriormente, a menor susceptibilidade dos micro-organismos em biofilme aos tratamentos antimicrobianos pode ser justificada pela dificuldade de penetração do FS e dos medicamentos nas regiões mais profundas do biofilme^{10,98}. No entanto, é difícil comparar os resultados clínicos desta investigação obtidos com a PDT com aqueles de estudos in vitro e com animais apresentados pela literatura, porque o meio bucal humano é diferente e fatores como composição de microbiota e biofilme, fluxo salivar, hábitos de higiene oral e de alimentação, etc. podem influenciar a resposta à PDT. Porém, com base nos resultados alcançados, pode-se sugerir que a PDT pode ser um método alternativo de inviabilização de *Candida* spp. em pacientes com estomatite protética.

Os resultados das culturas micológicas (valores de ufc/ml) do estudo clínico demonstraram que após 30, 60 e 90 dias do início dos tratamentos, houve um aumento gradativo nos valores médios de UFC/mL recuperados das próteses e do palato dos pacientes. Esse resultado era esperado, uma vez que recolonização progressiva da prótese é iniciada logo após o final do tratamento^{13,15,23,57}. Por outro lado, apenas no 60º dia do período de acompanhamento, os valores médios de UFC/mL recuperados do palato foram significativamente maiores do que os do fim do tratamento (dia 15). Esses valores observados no período de acompanhamento podem ser explicados pela alta afinidade de *Candida* spp. ao se aderir e colonizar superfícies acrílicas^{22,74,83}. Esse resultado está de acordo com o de Vanden Abbeele et al.¹⁰⁷, que verificaram terem os fungos colonizado preferencialmente as superfícies das próteses do que a mucosa de pacientes sem estomatite protética. Outros estudos^{2,36,77} também demonstraram que as espécies de *Candida* são primeiramente encontradas na superfície interna da prótese do que na mucosa inflamada de pacientes com estomatite protética. Esses resultados concordam com os desta investigação, pois as culturas das próteses evidenciaram valores médios de UFC/mL maiores do que o das culturas do palato para todos os períodos de tempo avaliados.

Outro parâmetro de avaliação utilizado no presente estudo para verificar a efetividade da PDT em relação à terapia antifúngica tópica foi a análise da inflamação do palato por meio das fotografias intrabuciais dos pacientes com estomatite protética. Ao final do tratamento (dia 15), comparando com as fotografias intrabuciais iniciais (dia 0), foi observado que a porcentagem de sucesso clínico do grupo NYS (53%) foi maior que a do grupo PDT (45%). Bergendal, Isacson¹² observaram uma melhora clínica do eritema do palato de pacientes com estomatite protética após 14 dias de tratamento das próteses com nistatina, mas, segundo esses autores, nenhum paciente foi totalmente curado. Por outro lado, Banting et al.⁶ verificaram resolução dos sinais e sintomas clínicos de candidose bucal em todos os indivíduos submetidos a terapia oral e imersão das próteses em nistatina. Os resultados obtidos por Neppelenbroek et al.⁷⁷ constatarem que o miconazol, quando utilizado isoladamente, não foi efetivo para

o tratamento da estomatite protética. Falha clínica após o tratamento com agentes antifúngicos não é incomum e pode ser atribuída aos efeitos diluentes da saliva e à ação de limpeza da musculatura bucal, que tendem a reduzir a concentração do medicamento abaixo daquela considerada efetivamente terapêutica^{6,71}. Adicionalmente, no grupo NYS deste estudo, nenhum tratamento antimicrobiano foi realizado nas próteses, o que pode ter contribuído para o índice de falha clínica desse grupo (47%). Por outro lado, a alta porcentagem de falha clínica observada no grupo PDT (55%) pode ser justificada pelas condições em que a PDT foi realizada, como o tempo de tratamento (três vezes por semana por 15 dias, um total de 6 sessões) e os parâmetros utilizados. Sendo assim, parece razoável sugerir que um tempo maior de tratamento poderia promover uma melhor resolução dos sinais clínicos de inflamação do palato. Além disso, apenas um tipo e uma concentração de FS, bem como uma única dose de luz, foram testados nesta investigação preliminar. Futuras pesquisas são necessárias para avaliar o efeito de parâmetros adicionais da PDT, como outros tipos e concentrações de FS e doses de luz, a fim de se tentar obter maiores índices de sucesso clínico.

Nesta investigação, os resultados das culturas micológicas (valores de UFC/ml) não se apresentaram de acordo com os resultados clínicos observados. Os dados de Barbeau et al.⁷ e Santarpia et al.⁹⁴ concordam com esses achados, uma vez que esses autores não verificaram relação significativa entre os tipos de Newton de estomatite protética e o número de culturas micológicas. Adicionalmente, outros estudos demonstraram presença de *Candida* spp. em usuários de próteses saudáveis^{29,84,90,107}. Dessa forma, considerando que a etiologia da estomatite protética é multifatorial, um tratamento efetivo deveria ser direcionado para todos os fatores envolvidos nessa patologia.

Este estudo também demonstrou que, entre os pacientes que apresentaram melhora dos sinais clínicos da estomatite protética, um alto índice de recorrência foi obtido no período de acompanhamento (75% para o grupo NYS e 78% para o grupo PDT). A recorrência da infecção após o tratamento ser finalizado é frequentemente reportado^{6,11,61}, pois a superfície interna da prótese atua como um reservatório de micro-organismos^{21,36} e, portanto, como fonte de

reinfeção dos pacientes. Dessa forma, o estabelecimento e a manutenção de hábitos de higiene da prótese, incluindo sua remoção durante o sono, são fatores fundamentais na resolução da estomatite protética em longo prazo. Além disso, a substituição das próteses é um procedimento sugerido para a completa resolução da estomatite protética^{32,84}, principalmente quando as próteses estiverem em uso por muito tempo. Esta investigação verificou que a idade das próteses foi o único fator predisponente associado significativamente com o grau de inflamação do palato; isto é, casos mais severos de inflamação foram associados a próteses mais antigas. Esse resultado está de acordo com o de Freitas et al.⁴⁹, que constataram relação entre o tempo de uso da prótese e a estomatite protética. Dundar, Ilhan Kal⁴³ também demonstraram que o tempo de uso da prótese é um importante fator de risco para lesões da mucosa bucal, principalmente a estomatite protética. No estudo de Coelho et al.³⁰, a maior frequência dessa inflamação foi observada em pacientes que tinham utilizado a mesma prótese por um período de tempo de 16 a 20 anos. Estudos demonstraram que lesões de mucosa, inclusive a estomatite protética, estão mais associadas a próteses mais antigas^{30,43,49}. Neste estudo, a idade da prótese total superior de 52,5% dos pacientes era maior do que 12 anos, o que pode ter contribuído para a proliferação de fungos na superfície da prótese durante o período de acompanhamento. Dessa maneira, a colocação de novas próteses deve ser considerada durante o tratamento da estomatite protética.

De acordo com os resultados das identificações bioquímicas das espécies de *Candida* spp. obtidos por este estudo, foi possível verificar que *C. albicans* foi a espécie mais predominante isolada das próteses e dos palatos dos pacientes dos grupos NYS e PDT (63,3% e 54%, respectivamente). Resultados semelhantes têm sido encontrados na literatura, pois tem sido relatado que, em indivíduos com estomatite protética, a presença de *C. albicans* é muito superior à de não-*albicans*^{29,34,35, 51,84, 88,107}. As outras espécies mais encontradas foram *C. tropicalis* seguida por *C. glabrata* em ambos os grupos. Outros estudos também observaram que *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais prevalente isolada da cavidade bucal^{31, 84, 88,100}. Por outro lado, também foi verificado que *C. glabrata* era a espécie fúngica mais comum após *C. albicans*^{29,33,68,107}. A identificação de

outras espécies foi também constatada, mas em uma frequência menor. A presença de espécies não-*albicans* é preocupante, porque essas espécies são também capazes de causar infecção e são resistentes aos agentes antifúngicos^{5,67,78}. Adicionalmente, tem sido demonstrado que algumas espécies de *Candida*, como *C. glabrata* e *C. krusei* apresentam resistência intrínseca a medicamentos como o fluconazol¹⁰⁹. Nesta investigação, considerável redução no número de isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, assim como de outras espécies, foi verificada ao final dos tratamentos. Esse resultado pode ser considerado importante uma vez ter demonstrado que essas espécies foram susceptíveis à nistatina e à PDT. Além disso, é importante destacar que *C. tropicalis* apresentou maior susceptibilidade à nistatina (90% de redução) do que à PDT (45,5% de redução). Todavia, o aumento no número desses isolados no período de acompanhamento comparado ao final dos tratamentos pode ser atribuído à recolonização da mucosa e da prótese pelas cepas isoladas no início dos tratamentos (dia 0). Estudos prévios têm verificado a persistência de cepas de *Candida* após a terapia antifúngica por meio de identificação genética^{9,33}, sugerindo que a recorrência da estomatite protética pode ser atribuída à permanência da cepa primária na cavidade bucal do paciente. Além disso, as irregularidades e as porosidades da resina acrílica podem contribuir para a retenção desses micro-organismos nas próteses^{37,62}, favorecendo a sua recolonização.

Durante todo o período dessa investigação, 60% e 70% dos pacientes, respectivamente, dos grupos NYS e PDT apresentaram espécies fúngicas mistas. Em outros estudos, mais de uma espécie foi encontrada em 38,5%²⁹ dos pacientes com estomatite protética. A presença de espécies mistas tem sido também observada em indivíduos não acometidos por essa patologia (27,27%²⁹ e 48,5%¹⁰⁷). No presente estudo foi possível observar que ao final dos tratamentos as espécies mistas de *Candida* spp. foram reduzidas em 50 e 54% para os grupos NYS e PDT, respectivamente. Isso sugere que os tratamentos avaliados foram efetivos ao eliminarem biofilmes mais complexos. Neste estudo, a associação de *C. albicans* e *C. tropicalis*, e a de *C. albicans* e *C. glabrata* foram

as combinações mais comuns, seguidas pela de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Além disso, outras associações foram verificadas em menor proporção (0,5% a 2,2%). A alta prevalência de *C. albicans* em combinação com *C. glabrata* também foi encontrada por outros investigadores^{29,33}, assim como de *C. albicans* associada a *C. tropicalis*^{16,51,84}. As complexas interações dos fungos em relações sinérgicas não são ainda bem entendidas, mas provavelmente estão envolvidas com o aumento do potencial patogênico da associação entre espécies.

Como conclusão, o modelo murino de candidose bucal utilizado neste estudo foi um método adequado para a avaliação da efetividade da PDT. Os resultados demonstraram que, com a metodologia empregada, a PDT pode ser utilizada como um método de inativação de *C. albicans* sem causar danos aos tecidos linguais dos animais. A aplicação clínica desses parâmetros demonstrou que a PDT foi tão efetiva quanto a aplicação tópica do antifúngico nistatina na redução dos valores de UFC/mL de *Candida* spp. das próteses e dos palatos dos indivíduos com estomatite protética. Por outro lado, maior índice de sucesso clínico (diminuição da inflamação do palato) foi observado com a nistatina. Os resultados obtidos por este estudo preliminar podem ser considerados promissores, entretanto estudos futuros são necessários para se determinar parâmetros clínicos mais efetivos para uma melhor resposta da PDT em pacientes com estomatite protética. Considerando ser improvável o desenvolvimento de resistência à PDT devido ao seu mecanismo de ação, a Terapia Fotodinâmica pode ser um método potencial para o tratamento da estomatite protética.



Conclusão

Conclusão

Com base nas condições experimentais utilizadas e considerando as limitações dos estudos, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- ✓ A PDT promoveu redução significativa dos valores de UFC/mL de *C. albicans* recuperados da língua dos camundongos com candidose induzida, independente da concentração do FS e do comprimento de onda utilizados;
- ✓ Não foram observados efeitos adversos ou diferenças histológicas nos tecidos dos animais submetidos e não submetidos a PDT;
- ✓ Não foi verificada diferença significativa entre os valores de UFC/mL de *Candida* spp. nos pacientes submetidos à PDT e à terapia antifúngica tópica (nistatina);
- ✓ Foi verificada redução significativa dos valores de UFC/mL de *Candida* spp. recuperados das próteses e dos palatos dos pacientes ao final do tratamento (dia 15) e aos 30 dias do início do tratamento em relação a coleta inicial (dia 0);
- ✓ Um número maior de pacientes submetidos à terapia antifúngica tópica apresentou redução da inflamação do palato ao final do tratamento em relação aos submetidos à PDT;
- ✓ O tempo de uso da prótese foi o único fator predisponente associado significativamente ao grau de inflamação do palato;
- ✓ A *C. albicans* foi a espécie mais prevalente em todos os períodos de avaliação, seguida pela *C. tropicalis* e *C. glabrata*.



Referências

Referências[☆]

1. Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. Clin Dermatol. 2006; 24: 16-25.
2. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. Br Dent J. 1979; 147: 267-72.
3. Arikan A, Kulak Y, Kadir T. Comparison of different treatment methods for localized and generalized simple denture stomatitis. J Oral Rehabil. 1995; 22: 365-9.
4. Arnfield MR, Mathew RP, Tulip J, McPhee MS. Analysis of optical coefficients using an approximate equation valid for comparable absorption and scattering. Phys Med Biol. 1992; 37: 1219-30.
5. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA, et al. High prevalence of non-*albicans* yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. Palliat Med. 2003; 17: 477-81.
6. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. J Can Dent Assoc. 1995; 61: 199-200, 203-5.
7. Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 95: 51-9.

[☆] De acordo com estilo Vancouver.

8. Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. J Oral Rehabil. 2004; 31: 453-9.
9. Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJ, Lewis MAO. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. J Clin Microbiol. 2001; 39: 4066-75.
10. de Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. Appl Environ Microbiol. 1994; 60: 4339-44.
11. Bergendal T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. Scand J Dent Res. 1982; 90: 227-38.
12. Bergendal T, Isacsson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1980; 88: 446-54.
13. Bergendal T, Holmberg K, Nord CE. Yeast colonisation in the oral cavity and faeces in patients with denture stomatitis. Acta Odontol Scand. 1979; 37: 37-45.
14. Bertoloni G, Reddi E, Gatta M, Burlini C, Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1989; 135: 957-66.
15. Bissell V, Felix D, Wray D. Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the management of denture stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993; 76: 35-9.
16. Blair Y, Bagg J, MacFarlane TW, Chestnutt I. Microbiological assessment of denture hygiene among patients in longstay and daycare community places. Community Dent Oral Epidemiol. 1995; 23: 100-3.

17. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
18. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974; 82: 151-90
19. Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol.* 1981; 10: 65-80.
20. Budtz-Jorgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis and angular cheilitis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW. *Oral candidosis.* London: Wright; 1990. p. 156-83.
21. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 61-9.
22. Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. II. The effect of antifungal and prosthetic treatment. *Acta Odontol Scand.* 1970; 28: 283-304.
23. Budtz-Jorgensen E, Theilade E, Theilade J. Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 134-45.
24. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10: 359-83.
25. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology.* 2007; 153: 3211-7.
26. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4288-95.

27. 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.
28. Cheong WF, Prahl SA, Welch AJ. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J Quant Electr*. 1990; 26: 2166-85.
29. 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.
30. Coelho CM, Sousa YT, Daré AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil*. 2004; 31: 135-9.
31. Collin B, Clancy CJ, Nguyen MH. Antifungal resistance in non-*albicans Candida* species. *Drug Resist Updates*. 1999; 2: 9-14.
32. Cross LJ, Riggio MP, Bagg J. Genetic typing of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis before and after itraconazole therapy. *Microbial Ecol Health Dis*. 1999; 11: 35-40.
33. Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97: 351-8.
34. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Adv Med Sci*. 2006; 51: 77-80.
35. Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*. 2003; 46: 187-91.
36. Davenport JC. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br Dent J*. 1970; 129: 151-6.

37. Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J.* 1972; 133: 101-5.
38. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2329-35.
39. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163: 1-12.
40. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol. B.* 2007; 86: 59-69.
41. Douglas LJ. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *Crit Rev Microbiol.* 1987; 15: 27-43.
42. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 30-6.
43. Dundar N, Ilhan Kal B. Oral mucosal conditions and risk factors among elderly in a Turkish school of dentistry. *Gerontology.* 2007; 53: 165-72.
44. Egusa H, Soysa NS, Ellepola AN, Yatani H, Samaranayake LP. Oral candidosis in HIV-infected patients. *Curr HIV Res.* 2008; 6: 485-99.
45. 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.
46. Ellepola AN, Samaranayake LP. The in vitro post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28: 112-6.

47. 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.
48. Fotos PG, Vincent SD, Hellstein JW. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*. 1992; 74: 41-9.
49. Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira E Ferreira E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil*. 2008; 35: 370-4.
50. Geerts GA, Stuhlinger ME, Basson NJ. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. *J Oral Rehabil*. 2008; 35: 664-9.
51. Gümrü B, Kadir T, Uygün-Can B, Ozbayrak S. Distribution and phospholipase activity of *Candida* species in different denture stomatitis types. *Mycopathologia*. 2006; 162: 389-94.
52. Hitchcock CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans*. 1993; 21: 1039-47.
53. Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med. Sci*. 1999; 14: 150-7.
54. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis--a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J*. 1992; 37: 107-14.
55. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother*. 1995; 35: 103-14.

-
56. Junqueira JC, da Silva Martins J, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009. [Epub ahead of print]
 57. Karyotakis NC, Anaissie EJ. The new antifungal azoles fluconazole and itraconazole. *Curr Opin Infect Dis*. 1994; 7: 658-66.
 58. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 932-40.
 59. Konopka K, Goslinski T Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86: 694-707. Erratum in: *J Dent Res*. 86: 1126.
 60. Könsberg R, Áxell T. Treatment of *Candida* infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 78: 306-11.
 61. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994; 72: 283-8.
 62. Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil*. 1997; 24: 788-90.
 63. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20: 349-53.
 64. Lambrechts SA, Aalders MC, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 2026-34.

-
65. Lambrechts SA, Aalders MC, Verbraak FD, Lagerberg JW, Dankert JB, Schuitmaker JJ. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 79: 51-7.
 66. 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: 345-51.
 67. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007; 86: 204-15.
 68. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res*. 1999; 78: 857-68.
 69. Lyon JP, de Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102: 632-8.
 70. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 34-9.
 71. Martin MV. Antifungal agents. In: Samaranayake LP, Macfarlane TW. *Oral candidosis*. London: Wright; 1990. p. 238-51.
 72. Maschesini R, Bertoni A, Andreola S, Mellari E, Sichirollo AE. Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissue in vitro. *Appl Opt*. 1989; 28: 2318-24.
 73. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. *J Med Microbiol*. 1995; 42: 372-9.

74. McCourtie J, Douglas LJ. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. J Gen Microbiol. 1985; 131: 495-503.
75. Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. Acta Microbiol Immunol Hung. 2007; 54: 201-35.
76. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. Eur J Oral Sci. 2007; 115: 77-80.
77. 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.
78. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. London: Bailliere Tindale; 1988.
79. Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. Acta Odontol Scand. 1990; 48: 71-4.
80. Olsen I, Stenderup A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand. 1990; 48: 11-8.
81. Paulino T P, Ribeiro KF, Thedei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2005; 50: 353-9.
82. Peloi LS, Soares RR, Biondo CE, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. J Biosci. 2008; 33: 231-7.

83. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16: 86-94
84. 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: 1115-9.
85. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005; 4: 633-8.
86. 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.
87. Renner RP, Lee M, Andors L, McNamara TF, Brook S. The role of *C. albicans* in denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979; 47: 323-8.
88. 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.
89. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1-8.
90. 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. [Epub ahead of print].
91. Rossie K, Guggenheimer J. Oral candidiasis: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1997; 9: 635-41.
92. Sakki TK, Knuuttila ML, Läärä E, Anttila SS. The association of yeasts and denture stomatitis with behavioral and biologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84: 624-9.

93. 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.
94. Santarpia RP 3rd, Pollock JJ, Renner RP, Spiechowicz E. An in vivo replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. *J Prosthet Dent*. 1990; 63: 437-43.
95. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5: 125-57.
96. Sherman RG, Prusinski L, Ravenel MC, Joralmon RA. Oral candidosis. *Quintessence Int*. 2002; 33: 521-32.
97. Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JC, de Resende MA, Pinotti M, et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 94: 65-70.
98. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003; 33: 161-8.
99. Star WM. Light dosimetry in vivo. *Phys Med Biol*. 1997; 42: 763-87.
100. Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48: 3-10.
101. Sternberg ED, Dolphin D. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 1998; 54: 4151-202.
102. Stolik S, Delgado JA, Pérez A, Anasagasti L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. *J Photochem Photobiol B*. 2000; 57: 90-3.

103. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004; 12: 317-24.
104. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. Microbiol Immunol. 2003; 47: 321-6.
105. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 93: 155-60.
106. Totti MA, dos Santos EB, de Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AO. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. Braz Oral Res. 2004; 18: 202-7.
107. 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.
108. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother. 1998; 42: 13-28.
109. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 382-402.
110. Willis AM. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 91: 317-21.
111. Wilson J. The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. Br Dent J. 1998; 185: 380-4.

-
112. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. J Oral Pathol Med. 1993; 22: 354-7.
113. Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 324-30.
114. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. Br J Dermatol. 2001; 144: 274-8.



Apêndice 1

Apêndice 1

“Killing of *Candida albicans* by Photodynamic Therapy in a Murine Model of Oral Candidosis”

Forma de análise dos resultados

Neste estudo, foi verificada a variável contagem de colônias em UFC/mL para todos os grupos avaliados. Para a variável foram estabelecidos dois fatores de variação: concentração de Photogem[®], em 3 níveis, e comprimento de onda de luz de LED, em 2 níveis. O total de animais avaliados em que a contagem de colônias foi realizada foi de 62 camundongos.

Para determinar a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans*, foi necessário calcular o número de micro-organismos viáveis, em valores de ufc/mL, obtido em cada grupo de estudo. 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. Após a obtenção desse valor, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas. No presente estudo, q = 0,025 já que foram pipetados 25 µL para cada diluição.

Os valores de UFC/mL foram extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. Para facilitar a interpretação dos resultados obtidos, os valores de UFC/mL foram transformados para logaritmo na base dez.

A transformação logarítmica facilitou a interpretação dos resultados e garantiu a validade da aplicação de procedimentos estatísticos paramétricos.

Com a finalidade de comparar se os valores médios de UFC/mL entre os grupos apresentaram resultados iguais ou diferentes, foi aplicada a análise de variância ANOVA a um critério com a hipótese nula de que estes seriam iguais. O método avaliou as médias das contagens de colônias entre os grupos, que são os mesmos para os dados originais e para os dados transformados em logaritmo. Seguiram-se ao teste de ANOVA, comparações múltiplas dois a dois pelo teste de Holm-Sidak. Adotou-se o nível de 5% de significância como regra de decisão para aceitar como significativa uma diferença entre as médias.

Resultados

Os valores originais em $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ recuperados das línguas dos animais inoculados por *C. albicans* e submetidos ou não à PDT estão descritos na Tabela A1. O resultado da análise de variância ANOVA está apresentado na Tabela A2. As comparações múltiplas realizadas com o teste de Holm-Sidak está apresentado na Tabela A3. Foi verificada redução significativa nos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ em todos os grupos em que a PDT foi realizada (P+L+) em relação ao grupo controle (P-L-). Não foram observadas diferenças significativas entre a concentração do Photogem[®] (400, 500 e 1000 mg/L) e os comprimentos de onda de luz de LED (455 e 630 nm) utilizados quando a PDT foi realizada. Também não foi verificada diferença entre os grupos nos quais os animais foram tratados apenas com luz (455 e 630), só com Photogem[®] (400, 500 e 1000 mg/L) e não submetidos a nenhum tratamento (controle positivo).

Tabela A1: Valores em $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de *C. albicans* recuperados da língua dos camundongos submetidos ou não à PDT.

Animais	P- L-	P- L+ B	P- L+ R	P+L- 4	P+L- 5	P+L- 10	P+L+ 4B	P+L+ 5B	P+L+ 10B	P+L+ 4R	P+L+ 5R	P+L+ 10R
1	4,64	4,38	4,38	4,80	4,28	4,73	3,12	2,86	3,82	4,06	3,33	4,06
2	4,79	4,47	4,47	4,81	4,52	4,69	3,80	3,19	2,93	4,16	3,24	2,87
3	4,83	4,60	4,60	4,82	4,71	5,33	3,85	3,55	3,70	3,83	2,62	3,90
4	4,84	4,73	4,73	4,87	4,86	4,80	4,02	3,78	3,62	3,99	3,84	3,00
5	4,98	4,94	4,94	5,25	4,87	4,78	4,39	4,05	3,25	3,05	3,39	3,57
6	4,86											
7	5,21											
Média	4,88	4,63	4,63	4,91	4,65	4,87	3,84	3,49	3,46	3,82	3,28	3,48
Desvio Padrão	0,18	0,22	0,22	0,19	0,25	0,26	0,46	0,47	0,37	0,45	0,43	0,53

P-L-: controle positivo; P-L+ B: animais submetidos à luz de LED azul; P-L+ R: animais submetidos à luz de LED vermelha; P+L- 4: animais submetidos ao Photogem[®] 400 mg/L; P+L- 5: animais submetidos ao Photogem[®] 500 mg/L; P+L- 10: animais submetidos ao Photogem[®] 1000 mg/L; P+L+ 4B: animais submetidos à PDT com 400 mg/L de Photogem[®] e luz azul; P+L+ 5B: animais submetidos à PDT com 500 mg/L de Photogem[®] e luz azul; P+L+ 10B: animais submetidos à PDT com 1000 mg/L de Photogem[®] e luz azul; P+L+ 4R: animais submetidos à PDT com 400 mg/L de Photogem[®] e luz vermelha; P+L+ 5R: animais submetidos à PDT com 500 mg/L de Photogem[®] e luz vermelha e; P+L+ 10R: animais submetidos à PDT com 1000 mg/L de Photogem[®] e luz vermelha.

Tabela A2: Sumário da análise de variância

Fonte de variação	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
Entre os grupos	11	2,199	17,690	<0,001
Resíduo	50	0,124		
Total	61			

Tabela A3: Valores de P do teste de Holm-Sidak para comparação de médias de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ entre os grupos.

grupos	P-L-	P-L+ B	P-L+ R	P+L- 4	P+L- 5	P+L- 10	P+L+ 4B	P+L+ 5B	P+L+ 10B	P+L+ 4R	P+L+ 5R	P+L+ 10R
P-L-		0,225	0,225	0,872	0,265	0,952	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P-L+ B	0,225		1,000	0,204	0,926	0,285	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P-L+ R	0,225	1,000		0,204	0,926	0,285	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P+L- 4	0,872	0,204	0,204		0,238	0,837	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P+L- 5	0,265	0,926	0,926	0,238		0,328	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P+L- 10	0,952	0,285	0,285	0,837	0,328		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P+L+ 4B	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		0,121	0,101	0,935	0,0165	0,116
P+L+ 5B	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,121		0,928	0,141	0,372	0,984
P+L+ 10B	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,101	0,928		0,119	0,421	0,944
P+L+ 4R	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,935	0,141	0,119		0,0203	0,136
P+L+ 5R	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,0165	0,372	0,421	0,0203		0,382
P+L+ 10R	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,116	0,984	0,944	0,136	0,382	



Apêndice 2

Apêndice 2

“Comparison of Photodynamic Therapy and Conventional Antifungal Therapy in the Treatment of Denture Stomatitis: a preliminary study”

Forma de análise dos resultados

Neste estudo, os tratamentos propostos foram avaliados por dois métodos: cultura micológica quantitativa e avaliação clínica por fotografias intrabuciais. Além disso, os fatores predisponentes à estomatite protética e a prevalência de *Candida* spp. também foram analisados.

Análise micológica quantitativa

Para determinar a efetividade micológica dos tratamentos avaliados, foi calculado o número de microrganismos viáveis, em valores de UFC/mL, de coletas obtidas da mucosa palatina e da superfície interna da prótese total superior dos pacientes que participaram do estudo. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas. No presente estudo, q = 0,025 já que foram pipetados 25 µL para cada diluição. Os valores originais obtidos estão apresentados nas Tabelas A4 e A5. Esses valores das culturas micológicas quantitativas de *Candida* spp. apresentaram uma distribuição assimétrica e variabilidade muito acentuada. Deste modo, foi realizada a transformação dos valores de UFC/mL em logaritmo natural (ln), cuja base é o número de Euler (2,71828...), para diminuir a assimetria e alcançar a homogeneização da variabilidade. A transformação em logaritmo diminuiu a assimetria, mas, no caso dos valores obtidos das próteses dos

pacientes, não conseguiu a homogeneização da variabilidade. Assim, além da transformação em logaritmo, para os valores das próteses, foi necessária a seleção de um modelo estatístico que apresentasse adequação de resíduos e caráter preditivo. Como a variável é obtida do mesmo paciente ao longo do tempo, os dados tendem a ser correlacionados. Foi selecionado então um modelo de efeitos aleatórios para dados longitudinais, em que a variável que representa a fonte de variação randômica é determinada pelo paciente. Com este modelo, os valores foram transformados em $[\ln(\text{UFC/mL})]^{3/2}$, de forma que os resíduos estimados puderam ser considerados como normais.

Com a finalidade de comparar os valores médios de $\ln(\text{UFC/mL})$ entre os grupos avaliados e ao longo do tempo, foi aplicada a análise de variância ANOVA a dois critérios com a hipótese nula de que estes seriam iguais. Adotou-se o nível de 5% de significância como regra de decisão para aceitar como significativa uma diferença entre as médias. Como pode ser verificado nas Tabelas A6 e A7, foram observadas diferenças significantes somente nas médias do fator tempo e ausência de interação ou efeito de tratamento. Em seguida, para identificar os tempos estatisticamente distintos entre si, foi utilizado o teste “*post hoc*” de Tukey (Tabela A8 e A9). Como pode ser observado nas Tabelas A8 e A9, foi verificada redução significativa dos valores de $\ln(\text{UFC/mL})$ obtidos tanto da prótese como do palato do paciente ao final do tratamento (dia 15) e no dia 30 do período de acompanhamento em relação ao início do tratamento (dia 0). Para ambos os sítios de coleta (palato e prótese), não foram constatadas diferenças entre os dias 60 e 90 em relação ao dia 0. Comparado com o final do tratamento (dia 15), foi verificado aumento significativo dos valores de $\ln(\text{UFC/mL})$ obtidos das próteses em todos os dias do período de acompanhamento (dias 30, 60 e 90), enquanto para os valores do palato houve aumento significativo apenas no dia 60. Não houve diferença entre os valores de $\ln(\text{UFC/mL})$ do palato no final do tratamento e nos dias 30 e 90 do período de acompanhamento. Para ambos os sítios de coleta, não foram observadas diferenças entre os dias do período de acompanhamento (dias 30, 60 e 90).

Paciente	Dia 0			Dia 15			Dia 30			Dia 60			Dia 90		
	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	
1	1,20E+04	1,20E+04	0,00E+00	9,32E+03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	1,20E+04	1,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,00E+01	1,16E+04	2,00E+02	2,28E+04	2,00E+02	2,28E+04	
3	1,20E+04	1,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
4	2,40E+03	4,84E+04	0,00E+00	0,00E+00	6,24E+04	1,72E+04	0,00E+00	1,72E+04	0,00E+00	2,28E+04	0,00E+00	2,88E+04	0,00E+00	2,88E+04	
5	5,60E+02	6,32E+04	1,20E+02	7,64E+03	4,00E+02	1,32E+05	0,00E+00	1,32E+05	0,00E+00	1,48E+04	2,48E+03	1,48E+04	0,00E+00	1,48E+04	
6	0,00E+00	1,72E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,76E+03	0,00E+00	1,76E+03	3,28E+04	4,40E+02	4,00E+01	5,88E+03	4,00E+01	5,88E+03	
7	0,00E+00	2,88E+03	0,00E+00	8,00E+01	0,00E+00	1,44E+05	0,00E+00	1,44E+05	0,00E+00	3,60E+02	0,00E+00	1,12E+03	0,00E+00	1,12E+03	
8	0,00E+00	9,20E+03	4,00E+01	8,80E+02	0,00E+00	3,60E+02	0,00E+00	3,60E+02	2,76E+03	2,08E+05	4,80E+02	4,76E+06	4,80E+02	4,76E+06	
9	2,36E+03	4,12E+05	4,00E+01	8,00E+02	2,40E+02	3,40E+04	0,00E+00	3,40E+04	3,56E+03	4,40E+05	2,40E+02	3,56E+05	2,40E+02	3,56E+05	
10	4,00E+01	1,05E+04	0,00E+00	4,00E+01	0,00E+00	2,12E+03	0,00E+00	2,12E+03	0,00E+00	6,48E+03	8,00E+01	1,36E+03	8,00E+01	1,36E+03	
11	2,00E+02	4,80E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E+01	8,00E+01	0,00E+00	1,12E+04	0,00E+00	1,12E+04	
12	0,00E+00	2,72E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
13	4,00E+01	1,96E+04	0,00E+00	2,00E+03	0,00E+00	4,92E+03	0,00E+01	4,92E+03	8,00E+01	2,04E+05	X	X	X	X	
14	8,80E+02	2,92E+04	0,00E+00	0,00E+00	8,00E+02	3,56E+05	2,00E+02	3,56E+05	2,00E+02	4,60E+04	0,00E+00	1,88E+04	0,00E+00	1,88E+04	
15	0,00E+00	4,32E+03	0,00E+00	5,60E+02	0,00E+00	8,00E+01	X	8,00E+01	X	X	X	X	X	X	

16	8,80E+02	4,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	5,60E+02	5,04E+04	X	X	X	
17	0,00E+00	1,88E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,20E+02	4,00E+01	4,96E+03
18	4,00E+01	1,16E+05	0,00E+00	3,20E+05	0,00E+00	2,12E+03	4,00E+01	2,36E+03	0,00E+00	0,00E+00
19	4,00E+01	7,60E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,20E+02	0,00E+00	0,00E+00
20	5,60E+02	3,48E+05	0,00E+00	6,00E+02	0,00E+00	1,72E+04	1,60E+03	7,12E+06	6,40E+02	6,20E+05

X: consulta não realizada.

Tabela A5: Valores de UFC/mL referentes ao palato e à superfície interna da prótese dos pacientes do grupo PDT.

Paciente	Dia 0			Dia 15			Dia 30			Dia 60			Dia 90		
	Palato	Prótese		Palato	Prótese		Palato	Prótese		Palato	Prótese		Palato	Prótese	
21	1,20E+02	1,56E+04		4,80E+02	1,48E+04		0,00E+00	1,72E+03		0,00E+00	1,84E+03		0,00E+00	1,84E+03	
22	8,00E+01	9,88E+04		4,00E+01	4,00E+02		4,00E+01	6,80E+02		0,00E+00	2,08E+05		4,00E+01	1,05E+05	
23	4,00E+01	5,24E+04		0,00E+00	4,72E+03		0,00E+00	1,28E+04		0,00E+00	5,60E+04		0,00E+00	4,36E+03	
24	1,20E+02	6,88E+03		4,00E+01	1,10E+05		6,40E+02	1,33E+05		4,00E+01	2,36E+04		0,00E+00	2,92E+04	
25	0,00E+00	7,64E+03		8,00E+02	8,00E+02		1,20E+02	5,60E+02		0,00E+00	5,80E+03		4,00E+01	4,52E+03	
26	4,00E+01	1,40E+03		0,00E+00	4,64E+03		4,00E+01	2,00E+05		0,00E+00	5,04E+04		0,00E+00	2,72E+04	
27	1,84E+03	3,84E+05		4,00E+01	2,96E+04		0,00E+00	2,60E+04		2,40E+02	9,92E+04		0,00E+00	5,16E+04	

28	8,00E+01	7,92E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,96E+04	4,00E+01	2,16E+04	4,00E+01	4,00E+01
29	4,00E+03	7,72E+04	2,92E+04	0,00E+00	0,00E+00	1,36E+04	0,00E+00	1,52E+04	0,00E+00	7,40E+03	1,20E+02
30	8,00E+01	7,08E+03	0,00E+00	2,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	1,84E+04	4,00E+02	5,36E+04	8,00E+01	5,96E+05
31	0,00E+00	5,24E+04	4,00E+01	0,00E+00	0,00E+01	4,00E+01	6,16E+04	2,40E+02	4,96E+05	0,00E+00	5,76E+05
32	1,88E+04	0,00E+00	7,60E+03	0,00E+00	0,00E+00	5,40E+04	4,00E+01	3,40E+04	3,20E+02	1,12E+05	1,38E+05
33	1,20E+02	1,15E+05	0,00E+00	1,72E+04	4,00E+01	4,00E+01	8,16E+04	8,00E+01	1,12E+04	0,00E+00	9,36E+04
34	2,40E+02	8,08E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
35	0,00E+00	5,24E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,48E+04	0,00E+00	5,72E+03	X	X
36	0,00E+00	7,60E+04	0,00E+00	8,00E+01	2,68E+03	3,40E+05	3,40E+05	2,00E+02	3,28E+05	9,20E+02	2,84E+05
37	1,20E+02	5,64E+04	8,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,60E+03	0,00E+00	5,72E+03	0,00E+00	3,68E+04
38	4,00E+01	7,68E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,08E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,32E+04
39	0,00E+00	2,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	4,00E+02	1,60E+04	1,60E+04	0,00E+00	5,56E+03	0,00E+00	4,84E+03
40	0,00E+00	2,12E+04	0,00E+00	6,24E+04	0,00E+00	7,24E+04	7,24E+04	0,00E+00	1,84E+04	0,00E+00	4,44E+04

X: consulta não realizada.

Tabela A6: Sumário da análise de variância para os valores obtidos da prótese.

Fonte de variação	Graus de liberdade	F	P
Intercepto	1	246,751	<0,0001
Grupo	1	1,676	0,203
Tempo	4	16,379	<0,0001
Grupo X Tempo	4	0,461	0,764

Tabela A7: Sumário da análise de variância para os valores obtidos do palato.

Fonte de variação	Graus de liberdade	F	P
Intercepto	1	55,876	<0,0001
Grupo	1	0,120	0,731
Tempo	4	5,262	0,001
Grupo X Tempo	4	2,247	0,067

Tabela A8: Teste de comparações múltiplas para os valores da prótese. O P-valor foi adaptado para modelos com efeitos aleatórios.

Tempos	Diferença estimada	Erro padrão	Estatística z	P
15 – 0	-20,685	3,663	-5,647	<0,001
30 – 0	-10,328	3,723	-2,774	0,04382
60 – 0	-5,508	3,854	-1,429	0,60847
90 – 0	-5,544	3,928	-1,411	0,62005
30 – 15	10,357	3,723	2,782	0,04297
60 – 15	15,176	3,854	3,937	<0,001
90 – 15	15,141	3,928	3,854	0,00105
60 – 30	4,819	3,889	1,239	0,72796
90 – 30	4,784	3,962	1,207	0,74681
90 – 60	-0,035	4,045	-0,009	1,00000

Tabela A9: Teste de comparações múltiplas para os valores do palato.

Tempos	Diferença estimada	Erro padrão	Estatística z	P
15 – 0	-3,894	0,809	-4,816	<0,001
30 – 0	-2,574	0,822	-3,131	0,015
60 – 0	-1,191	0,851	-1,399	0,628
90 – 0	-1,779	0,868	-2,050	0,242
30 – 15	1,320	0,822	1,606	0,493
60 – 15	2,704	0,851	3,176	0,013
90 – 15	2,115	0,868	2,437	0,105
60 – 30	1,383	0,859	1,611	0,490
90 – 30	0,795	0,875	0,908	0,894
90 – 60	0,588	0,893	-0,659	0,965

Avaliação clínica das fotografias intra-bucais

As medidas de correlação inter-classes ou entre examinadores (análise de concordância) têm por objetivo comparar se a resposta de um julgamento ou fenômeno é idêntica quando dois ou mais indivíduos a avaliam. Essas medidas podem variar de -1, indicando total discordância, a 1, que corresponde a total concordância. Na presente investigação, as fotografias foram classificadas de acordo com o grau de severidade da estomatite protética (0, 1, 2 ou 3) por especialistas em Diagnóstico Bucal que não conheciam os pacientes, os tratamentos avaliados e nem o período a que cada foto se referia (Tabelas A10 e A11). Para essa análise, foi utilizada a estatística k (kappa), com probabilidade de erro em 5% (Tabela A12). Os coeficientes k obtidos demonstram elevada concordância entre os observadores.

Tabela A10: Análise das fotografias intrabucais da mucosa palatina dos pacientes do grupo NYS.

Paciente	Dia 0		Dia 15		Dia 30		Dia 60		Dia 90	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	3	3	2	2	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
5	2	2	2	2	2	2	2	0	1	0
6	2	2	2	2	2	0	0	1	0	1
7	2	2	2	1	0	1	1	1	1	0
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	3	3	1	1	2	2	2	2	3	3
11	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
12	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1
13	2	2	0	0	2	2	2	2	X	X
14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15	2	2	2	2	2	2	2	2	X	X
16	2	2	3	3	3	3	3	3	X	X
17	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
18	2	2	1	1	0	0	2	2	0	0
19	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
20	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2

X: paciente desistente ou fotografia sem qualidade

Tabela A11: Análise das fotografias intrabucais da mucosa palatina dos pacientes do grupo PDT.

Paciente	Dia 0		Dia 15		Dia 30		Dia 60		Dia 90	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	2	2	2	2	0	1	2	2	2	2
2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
3	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0
4	3	3	3	2	3	3	2	2	2	2
5	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
6	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
7	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0
11	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0
12	2	2	2	2	2	2	1	2	0	0
13	2	2	0	0	0	1	0	0	0	1
14	3	3	2	2	3	3	3	3	X	X
15	2	3	2	3	0	2	0	0	0	1
16	2	2	0	1	0	1	0	2	2	3
17	3	3	2	3	2	2	2	2	3	3
18	2	2	0	0	2	2	0	0	1	1
19	2	2	2	2	1	1	0	0	1	1
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

X: paciente desistente ou fotografia sem qualidade

Tabela A12: Teste de correlação inter-observadores para todos os tempos de avaliação.

Tempo	% concordância	k	Erro padrão	Intervalo de confiança de 95%		P
				Limite inferior	Limite superior	
Dia 0	97,300	0,907	0,164	0,586	1,000	<0,001
Dia 15	86,500	0,859	0,120	0,624	1,000	<0,001
Dia 30	86,100	0,834	0,118	0,603	1,000	<0,001
Dia 60	91,700	0,852	0,126	0,606	1,000	<0,001
Dia 90	87,500	0,875	0,126	0,629	1,000	<0,001

Fatores predisponentes à estomatite protética

Neste estudo, os fatores predisponentes avaliados foram: o gênero e a idade do paciente, o tempo de uso da prótese, o uso de medicamentos e de tabaco. Dentre os medicamentos utilizados pelos pacientes, os antihipertensivos foram os mais frequentes. Esses dados foram obtidos no início do tratamento (dia 0) e relacionados com o grau de inflamação inicial também registrado no dia 0 (Tabelas A13 e A14). Para essa análise, foi utilizado o teste exato de Fisher com a hipótese nula de que não haveria associações, com nível de significância de 5%. Para os fatores predisponentes idade, gênero, tempo de uso da prótese, uso de antihipertensivos e hábito de fumar foram observados valores de P de, respectivamente: 0,669, 0,103, 0,045, 0,40 e 0,701. Assim, o único fator predisponente considerado significativo foi o tempo de uso da prótese. No entanto, é importante ressaltar que o número de amostras para essa análise foi pequena, o que não permite a obtenção de resultados mais conclusivos.

Tabela A13: Fatores predisponentes dos pacientes do grupo NYS.

Paciente	Grau de inflamação	Idade	Sexo	Tempo de uso da prótese (anos)	Medicação	Fumante
1	3	66	M	16	anticonvulsivante, antihipertensivo	sim
2	2	78	F	3	antihipertensivo, p/ colesterol	não
3	2	65	M	28	antiinflamatório	não
4	2	62	F	33	analgésico, p/ úlcera	não
5	2	56	M	15	não	sim
6	1	58	F	35	antihipertensivo	não
7	1	60	F	47	antihipertensivo	não
8	3	41	F	15	não	não
9	2	59	F	3	não	não
10	2	49	M	27	antihipertensivo, diurético, digitálico	não
11	1	65	F	25	analgésico	não
12	2	73	F	30	anticonvulsivante	não
13	2	65	F	15	não	não
14	3	57	F	20	antihipertensivo	não
15	2	64	F	23	antihipertensivo, benzodiazepínico, analgésico, hormônio	não
16	2	72	M	3	antiparkinsoniano, anticoagulante, corticosteróide	não
17	2	75	F	5	antihipertensivo	não
18	1	70	F	2	antialérgico	não
19	2	69	F	16	antihipertensivo, anticoagulante,	não
20	2	45	F	10	não	não

Tabela A14: Fatores predisponentes dos pacientes do grupo PDT.

Paciente	Grau de inflamação	Idade	Sexo	Tempo de uso da prótese (anos)	Medicação	Fumante
21	1	54	F	5	antihipertensivo	não
22	2	61	F	33	antidepressivo, antihipertensivo e p/ gastrite	não
23	2	65	F	6	antihipertensivo, diurético, diclofenaco	não
24	2	49	F	2	não	não
25	2	74	M	0,75	antiinflamatório	não
26	2	56	F	11	antihipertensivo, p/ artrite	sim
27	2	67	F	30	antihipertensivo, p/ colesterol, labirintite e tireóide	não
28	1	57	F	3	analgésico	não
29	3	50	F	5	não	não
30	2	54	F	20	não	não
31	1	43	F	3	não	sim
32	2	62	F	30	benzodiazepínico, antidepressivo	sim
33	3	80	M	2	anticoagulante, diurético, digitálico	não
34	3	72	M	9	não	não
35	3	66	M	44	estatina (p/ colesterol), anticoagulante	não
36	2	57	F	15	antihipertensivo	não
37	3	70	M	40	não	sim
38	2	67	M	7	antihipertensivo, anticoagulante e para memória	não

39	1	59	F	12	antihipertensivo, diurético	não
40	1	62	M	2	antihipertensivo	não

Prevalência de Candida spp.

As espécies de *Candida* spp. identificadas em todas as consultas do palato e da prótese dos pacientes de ambos os grupos estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3 do Capítulo 2.



Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 13/2008

Araraquara, 02 de julho de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 02/07/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Fotoativação de cãndida albicans em lesões de candidose em língua de camundongos" (Proc. CEEA nº 13/2008) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL (MARÇO/2009)**

Atenciosamente.

Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO
Coordenadora do CEEA

À

Profª Drª ANA CLÁUDIA PAVARINA

a/c Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, Ewerton Garcia de Oliveira Mima e
Livia Nordi Dovigo
Pesquisador Responsável
Nesta

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa



Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**ESTUDO DA VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO CONTROLE DA ESTOMATITE PROTÉTICA**", sob o protocolo nº 39/05, de responsabilidade do Pesquisador (a) **ANA CLÁUDIA PAVARINA**, 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 02 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "**STUDY OF THE VIABILITY OF THE PHOTODYNAMIC THERAPY ON THE CONTROL OF DENTURE STOMATITIS**", protocol number 39/05, under Dr **ANA CLÁUDIA PAVARINA** 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 02 (two) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 03 de abril de 2006.

Profª Drª **Mirian Aparecida Onofre**
Coordenadora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**(Grupo I – 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 **“Estudo da Viabilidade da Utilização da Terapia Fotodinâmica no Controle da Estomatite Protética”**, sob responsabilidade da cirurgiã-dentista Ana Cláudia Pavarina e de seu orientado, o cirurgião-dentista Ewerton Garcia de Oliveira Mima, 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 esclarecido sobre o que é estomatite protética e o dentista me disse que sou portador dessa doença. Fui esclarecido que esse estudo tem por objetivo avaliar os efeitos de métodos de tratamento da estomatite protética. Para tanto, serei submetido a exames clínicos que possibilitarão constatar o estado atual de minha doença, bem como os efeitos do tratamento ao qual me submeterei. Estou ciente que serei medicado com um remédio utilizado para o tratamento de estomatite protética (Nistatina Solução Oral). Após a remoção da prótese, 1 conta-gotas do remédio deverá ser bochechado por um minuto antes de ser cuspid. A aplicação do medicamento deverá ser feita 4 vezes ao dia, após a limpeza da prótese, por um período de 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.

2 - Fui esclarecido que os pacientes participantes desta pesquisa não serão prejudicados, uma vez que o medicamento já foi bastante estudado e já foi utilizado por outras pessoas. O dentista também me ensinou a utilizar o medicamento na quantidade certa e por 15 dias. Fui orientado quanto à importância dos meus retornos para avaliação do tratamento, e também da necessidade da limpeza das minhas próteses com creme dental e escova. Além disso, devo tirar as próteses

Protocolo CEP Nº 34/05
Aprovado em Reunião de
31/03/06

Secretaria de CEP - FODCA

para dormir. Receberei informações, orientações e tratamento necessários caso não ocorra melhora da minha doença após um mês do início do tratamento.

3 – Estou ciente que deverei retornar à Faculdade de Odontologia de Araraquara 5 vezes, e que não serão cobertas as despesas com o transporte.

4 – Estou ciente de que, durante os exames da minha boca, o dentista estará protegido por meio da utilização de luvas descartáveis, máscara, gorro e óculos, e todo o instrumental clínico será esterilizado em vapor.

5 – 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.

6 – 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.

7 – Caso haja qualquer problema odontológico durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contatar o pesquisador responsável, Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, pelo telefone (16) 3301-6410.

8 – 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, pelo telefone (16) 3301-6431.

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...

Assinatura do paciente

Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina
Pesquisador responsável

Ewerton Garcia de Oliveira Mima (orientado)

Protocolo CEP N° 36/05
Aprovado em Reunião de
31/03/06
Secretaria da CEP-FO/UA.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**(Grupos II e III – pacientes tratados com porfirina + LED)**

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 **“Estudo da Viabilidade da Utilização da Terapia Fotodinâmica no Controle**

da Estomatite Protética”, sob responsabilidade da cirurgiã-dentista Ana Cláudia Pavarina e de

seu orientado, o cirurgião-dentista Ewerton Garcia de Oliveira Mima, 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 esclarecido sobre o que é estomatite protética e o dentista me disse que sou portador dessa doença. Fui esclarecido que esse estudo tem por objetivo avaliar os efeitos de métodos de tratamento da estomatite protética. Para tanto, serei submetido a exames clínicos que possibilitarão constatar o estado atual de minha doença, bem como os efeitos do tratamento ao qual me submeterei. Fui também esclarecido que minha prótese e meu palato (céu da boca) serão tratados com a porfirina e com a luz do LED, 3 (três) vezes por semana durante 15 (quinze) dias. Não receberei nenhuma forma de tratamento odontológico como parte do estudo, ao menos que minha prótese seja danificada durante a realização do tratamento.

2 - 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 de que a utilização da porfirina e a irradiação com luz de LED não trazem riscos à minha saúde. Fui orientado quanto à importância dos meus retornos para o tratamento das próteses e do palato com a porfirina e a luz de LED. Além disso, devo retornar periodicamente para avaliação de minha doença. Também fui orientado a limpar minhas próteses com creme dental e escova e de tirá-las para dormir. Receberei informações, orientações e tratamento necessários caso não ocorra melhora da minha doença após um mês do início do tratamento.

Protocolo CEP N° 361/05
Aprovado em Reunião
31/05/06
Secretaria da CEP - FC/UAz.

- 3 – Estou ciente que deverei retornar à Faculdade de Odontologia de Araraquara 5 vezes, e que não serão cobertas as despesas com o transporte.
- 4 – Estou ciente de que, durante os exames da minha boca, o dentista estará protegido por meio da utilização de luvas descartáveis, máscara, gorro e óculos, e todo o instrumental clínico será esterilizado em vapor.
- 5 – 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.
- 6 – 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.
- 7- Caso haja qualquer problema odontológico durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contatar o pesquisador responsável, Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, pelo telefone (16) 3301-6410.
- 8 - 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, pelo telefone (16) 3301-6431.

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__

Assinatura do paciente

Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina
Pesquisador responsável

Ewerton Garcia de Oliveira Mima (orientado)

Protocolo CEP Nº 301/05
Aprovado em Reunião de
31/03/06

Secretaria do CEP-FO/GAr.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
CLÍNICA DE PRÓTESE

Data: ____ / ____ / ____

Nome: _____

Idade: _____ Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Estado Civil: _____ Sexo: _____ Raça: _____

Profissão: _____ Fone profissional: (____) _____

Endereço completo: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Fone: (____) _____

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE GERAL

Está tomando algum medicamento? () sim () não

1. () Hipoglicemiantes 2. () Anticoncepcionais 3. () Antihipertensivos

4. () Insulina 5. () Antialérgicos 6. () Antibióticos 7. () Corticóides

8. () Anticoagulantes 9. () Psiquiátricos 10. () Analgésicos

11. () Anticonvulsivantes 12. Outros 13. () Não soube relatar

Qual (is)?

Apresenta ou apresentou algum problema de saúde relacionado aos seguintes sistemas? () sim () não

1. () Cardiovascular 2. () Endócrino 3. () Genito-urinário
4. () Hematológico 5. () Neurológico 6. () Psiquiátrico
7. () imunológico 8. () Respiratório 9. () Gastro-intestinal
10. () Músculo/esquelético 11. () Pele
12. () Doenças infecto-contagiosas 13. () Outros
14. () Não apresenta problemas 16) () História-familiar

Qual (is)?

Vícios:

1. Tabaco () sim () não

Fuma () Masca () Tipo _____

Há qto tempo? _____ Qto/dia/semana? _____

Ex-tabagista? Há qto deixou? _____ Qto/dia/semana?

2. Álcool () sim () não

Tipo _____

Há qto tempo? _____ Qto/dia/semana? _____

Ex-alcoolista? Há qto deixou? _____ Qto/dia/semana?

3. Outras drogas? () sim () não

Qto/dia/semana? _____

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE BUCAL

1. Sente a boca seca? () sim () não

2. Usa prótese removível?

Superior () sim () não Tipo : _____

Inferior () sim () não Tipo : _____

3. Há quanto usa prótese?

Superior _____

Inferior _____

4. Há quanto tempo é desdentado?

Superior _____

Inferior _____

5. Há quanto tempo usa a (s) prótese (s) atual (is) ?

Superior: _____

Inferior: _____

6. Frequência de uso: Contínuo () Esporádico ()

Retira pra dormir? () sim () não

7. Condições da (s) prótese (s) atual (is)?

Suporte Adequado () Inadequado ()

Retenção Adequada () Inadequada ()

Estabilidade Adequada () Inadequada ()

Adaptação Adequada () Inadequada ()

8. Condições de higienização da (s) prótese (s)

Superior Boa () Satisfatória () Regular () Insatisfatória ()

Placa () sim () não Cálculo () sim () não

Inferior Boa () Satisfatória () Regular () Insatisfatória ()

Placa () sim () não Cálculo () sim () não

9. Condições de higiene bucal

Escovação da língua () sim () não

Higiene Bucal Boa () Satisfatória () Regular () Insatisfatória ()

10. Estomatite protética

Tipo de estomatite protética : I () II () III ()

Sintomatologia dolorosa () sim () não

Glossite rombóide mediana () sim () não

Queilite angular () sim () não

RECOMENDAÇÕES

Paciente: _____

- 1- Escovar a dentadura superior 4 vezes por dia: após o café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir. A dentadura superior deve ser limpa com a escova dental fornecida pelo dentista. Para a limpeza da dentadura, deve-se primeiro aplicar sabão de coco na escova de dente e esfregar em toda a dentadura. Depois de enxagüar a dentadura, aplicar creme dental na escova e esfregar bem todas as superfícies da dentadura, principalmente a parte que entra em contato com o céu da boca (parte de dentro, rugosa). Não utilizar essa escova dental para limpar a prótese inferior (dentadura ou ponte móvel) nem para escovar outras regiões da boca, como língua e dentes (se houver). A dentadura ou a ponte móvel inferior deve ser limpa com outra escova, da mesma forma como realizado para a dentadura superior.
- 2- Sempre escovar a língua com escova e creme dental, depois com escova e água. A língua deve ser escovada no mínimo 4 vezes ao dia, mesmo que o paciente tenha ânsia. Nesse caso, escovar até aonde conseguir e, aos poucos, ir mais para posterior. A escovação da língua é muito importante, pois acumula sujeira e micróbios. Não adianta limpar a dentadura e não limpá-la, pois a língua pode contaminar de novo a área de infecção no céu da boca.
- 3- Os dentes naturais (quando houver) devem ser escovados com escova macia e creme dental, 4 vezes ao dia. O fio dental deve ser passado no meio dos dentes pelo menos uma vez ao dia, antes de dormir.
- 4- Nunca dormir com as dentaduras. Antes de dormir, limpar as próteses e colocá-las separadamente em copos de vidro limpos contendo água filtrada. Sempre o nível de água dos copos deverá cobrir as dentaduras.

Diariamente, os copos deverão ser limpos com bucha e sabão e água deverá ser trocada.

***LEMBRE-SE: O TRATAMENTO DEPENDE
FUNDAMENTALMENTE DA COLABORAÇÃO DO PACIENTE.
MESMO QUANDO ACABAR O TRATAMENTO, O PACIENTE
DEVERÁ CONTINUAR A SEGUIR OS CONSELHOS ACIMA PARA
EVITAR QUE A DOENÇA INFECCIOSA VOLTE. PORTANTO, OS
CUIDADOS DE DORMIR SEM AS DENTADURAS, DE LIMPÁ-LAS
E DE HIGIENIZAR OS DENTES E A LÍNGUA DEVEM SER
SEGUIDOS PELO PACIENTE PARA O RESTO DA VIDA.***

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

Araraquara, 24 de julho de 2009

Ewerton Garcia de Oliveira Mima