AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DESPRENDIMENTO DE BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* DE RESINA ACRÍLICA E REEMBASADOR TEMPORÁRIO

Victoria Schlumberger Cachoeira (PIBIC/CNPq/UEPG), Falyne Kiratcz, Thaís Albach, Carolina Yoshi Campos Sugio, Gustavo Simão Moraes, Karin Hermana Neppelenbroek, Vanessa Migliorini Urban (Orientador), e-mail: vanurban@yahoo.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia

Odontologia/Materiais Odontológicos

Palavras-chave: estomatite sob prótese, reembasadores de dentadura, *Candida albicans*.

Resumo

Este estudo comparou diferentes métodos de desprendimento de biofilme de *Candida albicans* de amostras de resina acrílica termopolimerizável (Vipi Cril®) e de material condicionador de tecido (Softone™). Os corpos de prova foram confeccionados (n=7; 10x1mm), imersos em inóculo (≈ 2 x 10^7 UFC/mL) de *C. albicans* SC5314 e permaneceram por 90 min em agitação orbital de 75 rpm a 37ºC. Após a remoção das células não aderidas, os espécimes foram imersos em meio RPMI-1640 com glicose 2% e MOPS por 48 h. Os espécimes foram imersos em 3 mL de PBS e submetidos à agitação em vórtex ou sonicação em ultrassom pelos tempos de 1, 2, 5 ou 10 min a 4ºC, para desprendimento do biofilme. A quantificação do biofilme desprendido foi feita por contagem de UFC/mL. Os resultados foram submetidos à ANOVA fator único/teste de Tukey HSD (α=0,05). Para ambos os materiais, não houve diferença significante (p>0,05) entre os grupos experimentais avaliados. Qualquer um dos métodos testados poderia ser utilizado para realizar o destacamento de biofilme de materiais acrílicos rígidos e macios visando à avaliação de tratamentos de esterilização e desinfecção de próteses removíveis.

Introdução

Estomatite protética é uma reação inflamatória da mucosa subjacente a próteses removíveis (TOBOUTI et al., 2016) que afeta de 30 a 75% dos pacientes saudáveis portadores de próteses. O principal agente etiológico é *Candida albicans* (JOHNSON et al., 2012), que pode causar a doença sob determinados fatores predisponentes (TOBOUTI et al., 2016). As manifestações clínicas podem variar desde assintomatologia, a edema no palato, dor, hiperplasia papilar e até dificuldade para engolir (JOHNSON et al., 2012; NETT et al., 2010).

Diversas modalidades terapêuticas têm sido propostas na literatura, as quais geralmente são focadas no uso de agentes antifúngicos tópicos (BANTING et al., 2001; SCHNEID, 1992). Entretanto, o insucesso dessas terapias não é incomum, visto que esses agentes diminuem a sintomatologia da doença, mas não necessariamente erradicam completamente os fungos da cavidade oral e, principalmente, do biofilme complexo formado nas próteses removíveis. Portanto, a pesquisa de uma modalidade terapêutica efetiva no tratamento da estomatite protética ainda se faz necessária. Uma vez que a reincidência da doença está associada à reinfecção da mucosa via prótese, o biofilme aderido aos materiais das bases das próteses deveria ser quantificado. A literatura propõe diferentes métodos

para despredimento e posterior quantificação do biofilme, incluindo agitação por vortex (JOHNSON et al., 2012), banho em ultrassom (OLIVEIRA, 2013), associação de vortex e ultrassom (NETT et al., 2010), centrífuga (CHANDRA et al., 2001) e associação de vortex e centrífuga (AL-THOBITY et al., 2017). O objetivo desse trabalho foi comparar diferentes métodos de desprendimento de biofilme de *C. albicans* de amostras de resina acrílica e de material reembasador de prótese removível.

Material e Métodos

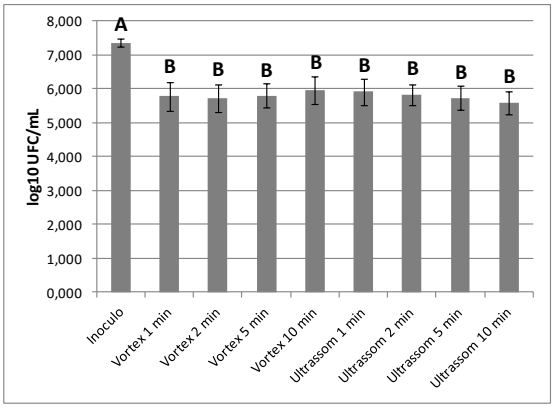
Corpos de prova (n=7; 10x1 mm) do material condicionador de tecido (Bosworth Company, Skokie, IL, EUA) foram confeccionados conforme as instruções do fabricante utilizando matrizes de aço inoxidável vazadas estéreis. Os corpos de prova de resina acrílica (n=7; 10 x 1mm) foram confeccionados a partir de moldes de matrizes metálicas na forma de discos, utilizando silicone laboratorial (Zetalabor; Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália). A resina acrílica termopolimerizável incolor para base de prótese (Vipi Cril; Vipi® Ltda., Pirassununga, SP) foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante. Após a manipulação, a resina foi inserida nos moldes de silicone previamente obtidos pela impressão das matrizes metálicas. A resina foi polimerizada convencionalmente em banho de água em termopolimerizadora (SL-155/22; Solab Equipam. Laborat. Ltda., Piracicaba, SP) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a contaminação das amostras de ambos os materiais, uma alçada da cepa de *Candida albicans* SC5314 foi semeada em meio de cultura YEPD Agar (Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, EUA) e incubada a 37°C por 48 h. Então, uma colônia foi removida da placa, ressuspensa em 20 mL de caldo YEPD e novamente incubada na mesma temperatura *overnight*. A pré-cultura obtida foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 4°C (Shaker - mod. 430/RDBP; Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP) e o *pellet* resultante, diluído em PBS estéril, homegeneizado em vórtex e novamente centrifugado. Este processo repetiu-se mais uma vez, e o *pellet* final foi novamente diluído em 20 mL de PBS e homogeinezado em vórtex (CHANDRA et al., 2001). Os espécimes foram colocados individualmente em placas de 24 poços (TPP®; Techno Plastic Prod., Trasadingen, SH, Suíça), imersos em 2 mL do inóculo obtido e mantidos em incubadora com agitação orbital por 90 minutos a 37°C e 75 rpm. Em seguida, as células não aderidas foram removidas e os corpos de prova foram imersos em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose e MOPS (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Duque de Caxias, SP) e mantidos na incubadora com agitação a 75 rpm por 48 h a 37ºC. Os corpos de prova (n=7) de ambos os materiais foram divididos em grupos de acordo com o método de desprendimento de biofilme ao qual seriam submetidos. Os grupos avaliados foram os seguintes: agitação em vórtex por 1, 2, 5 e 10 minutos e banho em ultrassom a 4°C pelos mesmos tempos. Em todos os grupos, as amostras foram submersas em 3 mL de PBS estéril em tubos de Falcon de 50 mL, para que o biofilme presente no material pudesse ser diluído. Após a submissão aos métodos de desprendimento, a quantificação das células de *C. albicans* foi realizada por meio de contagem de UFC/mL. O conteúdo dos tubos de Falcon de cada amostra foi novamente homogeneizado em vórtex e, então, diluições seriadas foram feitas nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-4}. Foram semeados 25 µL dessas suspensões em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco®, São Paulo, SP) suplementado com cloranfenicol 0,1 mg/mL. Este procedimento foi feito em triplicata. As placas foram armazenadas em estufa

bacteriológica a 37°C por 48 h para a contagem das unidades formadoras de colônias de *C. albicans*.
Análises do poder da amostra foram realizadas utilizando o *software* G*Power 3.1.2. Os resultados de cada material foram submetidos à ANOVA fator único/teste de Tukey HSD (α=0,05).

Resultados e Discussão

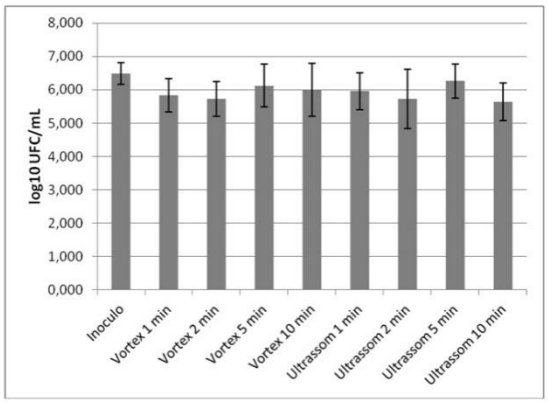
Para o número de corpos de prova utilizado para a contagem de unidades formadoras de colônias após contaminação por 48 h (n=7), este estudo apresentou poder adequado para ambos os materiais (100%; α=0,05). Para o material condicionador de tecido, não houve diferença estatisticamente significante (p>0,05) entre todos os grupos experimentais avaliados, entretanto, o inóculo apresentou maiores valores de unidades formadoras de colônias que todos os grupos de destacamento (p=0,000) (Figura 1). Para a resina acrílica de base de prótese, não houve diferença estatisticamente significante (p=0,068) entre todos os grupos experimentais avaliados e o inóculo (Figura 2). Um dos meios para se avaliar a eficácia antimicrobiana de novas modalidades terapêuticas é a quantificação do biofilme aderido às próteses. Considerando a diversidade de métodos disponíveis com relação às técnicas de desprendimento de biofilme e a falta de detalhes com que usualmente são descritos, fez-se necessário padronizar um protocolo para desprendimento e posterior quantificação do biofilme formado sobre corpos de prova do material condicionador de tecido e do material para base de prótese. Não houve diferença entre o biofilme quantificado a partir do destacamento em vórtex ou em ultrassom durante períodos de 1 a 10 min.

FIGURA 1 - Valores médios e desvio padrão de contagem de unidades formadoras de colônias (log_{10}UFC/mL) dos grupos de destacamento de biofilme dos corpos de prova do material Softone™



Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante (ANOVA fator único/Tukey HSD; p<0,05)

FIGURA 2 - Valores médios e desvio padrão de contagem de unidades formadoras de colônias (log_{10}UFC/mL) dos grupos de destacamento de biofilme dos corpos de prova do material Vipi Cril®



Conclusão

Qualquer um dos métodos testados poderia ser utilizado para realizar o destacamento de biofilme de materiais acrílicos rígidos e macios visando a avaliação de tratamentos de esterilização e desinfecção de próteses removíveis.

Agradecimentos

Agradeço à minha Professora e Orientadora Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban, ao meu co-orientador Ms. Gustavo Simão Moraes, às minhas colegas Falyne Kiratcz e Thaís Albach, ao PIBIC/CNPq/UEPG e à FAPESP (Processo 2017/22996-1).

Referências

AL-THABOTY, M. A. et al. In vitro evaluation of the inhibitory activity of thymoquinone in combating *Candida albicans* in denture stomatitis prevention. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 14, n. 7, p. E-743, 2017.

BANTING, D. W. et al. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec. Care Dentist.**, v. 21, n. 1, p. 4-8, 2001.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*:development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, n.18, p. 5385-5394, 2001.

JOHNSON, C. C. et al. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 5, p. 1736-1743, 2012.

NETT, J. E. et al. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 9, p. 3650-3659, 2010.

OLIVEIRA, D. G. **Estudo in vitro da formação do biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica termopolimerizável revestida por nanopartículas de dióxido de silício (revestimento cerâmico)**. 2013, 97 f, Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

SCHNEID, T. R. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. **Spec. Care Dentist.**, v. 12, n. 6, p. 245-250, 1992.

TOBOUTI, P. L. et al. Expression of secreted aspartyl proteinases in an experimental model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis. **J. Prosthodont.**, v. 25, n. 2, p. 127-134, 2016.