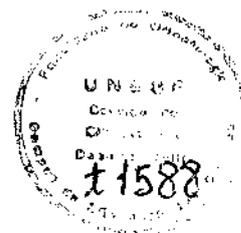


JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA

**CANDIDOSE EXPERIMENTAL E RECUPERAÇÃO DE
Candida albicans NA CAVIDADE BUCAL DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS**



Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2003

TU17

5968e

± 1588

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A. B.; SILVA, E. A. **Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico.** São José dos Campos: FOSJC/ UNESP, 2002. 82p.

JUNQUEIRA, J. C. **Candidose experimental e recuperação de *Candida albicans* na cavidade bucal de ratas ovariectomizadas.** 2003. 143f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2003.

Ao meu marido Adriano,
Aos meus pais, Luiz e Graça.

**Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela orientação criteriosa,
confiança depositada e por seu exemplo de competência,
dignidade e dedicação. Meus sinceros agradecimentos
por toda minha formação científica.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Prof. Paulo Villela Santos Junior**, e ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal.

À **Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha**, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, por sua dedicação, sugestões e auxílio na fase experimental deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa**, Chefe do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pelo apoio e colaborações em diversos momentos deste curso.

À **Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito**, pela disposição em transmitir seus conhecimentos e experiências durante o convívio diário.

À **Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho**, pela competência, orientação constante e auxílio na análise histopatológica.

Ao **Prof. Ivan Balducci**, pela elaboração da análise estatística, pelos ensinamentos e sugestões.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, na pessoa do **Prof. Tit. Oslei Paes de Almeida** e ao Laboratório Associados de Sensores do Instituto de Pesquisas Espaciais/INPE, pela realização da Microscopia eletrônica de varredura.

À Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP, na pessoa da **Prof. Dra. Catarina Segretti Porto**, pela elaboração das dosagens hormonais.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, por ter concedido a bolsa de estudo.

À **Clélia Aparecida de Paiva Martins**, pela atenção e auxílio nas técnicas laboratoriais.

À **Maria Salete Faria**, por todo cuidado durante o preparo dos cortes histológicos.

Às secretárias **Sílvia Scarpel e Terezinha de Fátima Arantes de Mello**, pela disponibilidade, auxílio e paciência.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacob e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pelo imenso auxílio no manuseio dos animais.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Maria Aparecida Consiglio de Souza**, pela atenção e disponibilidade.

À bibliotecária **Angela de Brito Bellini**, pela paciência e orientação na revisão deste trabalho.

Aos amigos de curso **Carlos Eduardo Dias Colombo e Patrícia Monteiro Ribeiro**, pela imensa colaboração durante todos os momentos desta pesquisa.

À aluna da graduação **Joyce da Silva Martins**, pela amizade e auxílio durante a fase experimental.

Aos demais colegas do Programa de Biopatologia Bucal, aos funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos e a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	18
RESUMO.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 <i>C. albicans</i>	22
2.2 Patogenicidade de <i>Candida albicans</i>	24
2.3 <i>Candida albicans</i> e candidose na cavidade bucal.....	29
2.4 Candidose bucal experimental em ratos.....	33
2.5 Hormônios ovarianos.....	40
2.6 Hormônios ovarianos e candidose.....	43
3 PROPOSIÇÃO.....	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Animais experimentais.....	49
4.2 Colonização natural por leveduras do gênero <i>Candida</i> na cavidade bucal das ratas.....	51
4.3 Ovariectomia.....	51
4.4 Peso corporal de ratas controles e ovariectomizadas.....	52
4.5 Dosagem de estrógeno e progesterona.....	52
4.6 Avaliação morfológica do dorso da língua de ratas controles e ovariectomizadas.....	54
4.7 Inoculação de <i>C. albicans</i> na cavidade bucal das ratas.....	54
4.8 Candidose experimental.....	55
4.8.1 Sacrifício dos animais.....	56
4.8.2 Análise macroscópica.....	56
4.8.3 Microscopia de luz.....	57

4.8.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	58
4.9 Recuperação de <i>C. albicans</i> da cavidade bucal das ratas.....	58
4.10 Identificação dos isolados.....	59
4.10.1 Tubo germinativo.....	60
4.10.2 Microcultivo.....	60
4.10.3 Fermentação de carboidratos.....	60
4.10.4 Assimilação de carboidratos.....	61
4.10.5 Interpretação das provas.....	61
4.11 Caracterização dos isolados quanto à sensibilidade às toxinas <i>killer</i>	63
4.12 Análise estatística.....	64
5 RESULTADOS.....	65
5.1 Colonização natural por leveduras do gênero <i>Candida</i> na cavidade bucal das ratas.....	65
5.2 Peso corporal de ratas controles e ovariectomizadas.....	65
5.3 Dosagem de estrógeno e progesterona.....	66
5.4 Morfologia do dorso da língua de ratas não infectadas por <i>C.</i> <i>albicans</i>	68
5.5 Candidose experimental.....	76
5.5.1 Análise macroscópica.....	76
5.5.2 Microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.....	78
5.6 Recuperação de <i>C. albicans</i> da cavidade bucal das ratas.....	97
6 DISCUSSÃO.....	100
7 CONCLUSÕES.....	111
8 REFERÊNCIAS.....	112
ANEXOS.....	133
APÊNDICES.....	136
ABSTRACT.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Número (n) e percentual (%) de ratas que apresentaram lesões clínicas no dorso da língua entre as 96 examinadas.....	76
Tabela 2-	Escores atribuídos aos animais dos grupos controle e ovariectomizado, nos diferentes tempos de sacrifício, para análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por <i>C. albicans</i>	96
Tabela 3-	Médias e desvios-padrão do logaritmo do número das unidades formadoras de colônias (ufc/mL) de <i>C. albicans</i> recuperadas da cavidade bucal de ratas controles e ovariectomizadas nos diferentes períodos de observação.....	98
Tabela 4-	Pesos corporais (g) das ratas do grupo controle no dia da ovariectomia (peso inicial) e nos dias sete, 14 e 28 após essa cirurgia.....	136
Tabela 5-	Pesos corporais (g) das ratas do grupo ovariectomizado no dia da ovariectomia (peso inicial) e nos dias sete, 14 e 28 após essa cirurgia.....	137
Tabela 6-	Concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) das ratas dos grupos controle e ovariectomizado.....	138
Tabela 7-	Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) das ratas dos grupos controle e ovariectomizado.....	139
Tabela 8-	Escores médios obtidos na análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por <i>Candida</i> , realizada nos grupos controle e ovariectomizado, em relação aos períodos de sacrifício de 6 horas, 24 horas e 7 dias após a inoculação de <i>C. albicans</i>	140

Tabela 9-	Logaritmo do número das ufc/mL de <i>C. albicans</i> recuperadas da cavidade bucal de ratas controles após a inoculação desse microrganismo, nos diversos períodos de observação.....	141
Tabela 10-	Logaritmo do número das ufc/mL de <i>C. albicans</i> recuperadas da cavidade bucal de ratas ovariectomizadas após a inoculação desse microrganismo, nos diversos períodos de observação.....	142

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Fluxograma ilustrando a distribuição dos animais nos experimentos. ML: microscopia de luz; MEV: microscopia eletrônica de varredura.....	50
FIGURA 2-	Fórmula utilizada para cálculo do percentual de aumento de peso das ratas, após 28 dias da cirurgia de ovariectomia.....	52
FIGURA 3-	Médias e desvios-padrão do peso corporal das ratas pertencentes aos grupos controle e ovariectomizado, no dia da ovariectomia (dia 0) e nos dias sete, 14, 21 e 28 após essa cirurgia.....	66
FIGURA 4-	Médias e desvios-padrão dos níveis plasmáticos de estradiol para os grupos controle e ovariectomizado. Diferença estatisticamente significativa (Teste <i>t</i> de Student, $\alpha = 5\%$, $p = 0,0003$).....	67
FIGURA 5-	Médias e desvios-padrão dos níveis plasmáticos de progesterona para os grupos controle e ovariectomizado. Diferença estatisticamente significativa (Teste <i>t</i> de Student, $\alpha = 5\%$, $p = 0,0002$)....	68
FIGURA 6-	Aspecto macroscópico do dorso da língua de rata do grupo controle. A papila valada (\rightarrow) separa a porção faríngea da língua (F) da região bucal. As papilas gigantes (\Rightarrow), separam os dois terços anteriores da língua do tubérculo intermolar (TI).....	71

FIGURA 7-	Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle. A porção bucal apresenta papilas filiformes, denominadas cônicas simples (PCS) na região anterior, gigantes (PG) e verdadeiras (PV) na região posterior. Abaixo do epitélio, observam-se a lâmina própria e as fibras musculares estriadas. HE; aumento original: 25X.....	71
FIGURA 8-	Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado. As papilas cônicas simples exibem superfície anterior convexa. HE; aumento original 100X	72
FIGURA 9-	Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle na região de papilas verdadeiras. Verifica-se a presença de bactérias (→) aderidas à superfície anterior (convexa) das papilas. HE; aumento original 100X.....	72
FIGURA 10-	Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle nas regiões de papilas gigantes (PG) e verdadeiras (PV). Bactérias (→) estão aderidas à superfície posterior (convexa) das papilas gigantes e superfície anterior (convexa) das papilas verdadeiras. HE; aumento original 100X.....	73
FIGURA 11-	Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, observando-se papila fungiforme com corpúsculo gustativo (→). HE; aumento original 400X...	73
FIGURA 12-	Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle. As papilas cônicas simples (PCS) e verdadeiras (PV) apresentam inclinação para posterior e as gigantes (PG) para anterior. Aumento original: 75X.....	74

FIGURA 13-	Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle. As papilas cônicas simples possuem inclinação para posterior, determinando superfície anterior convexa e posterior côncava. Aumento original: 180X.....	74
FIGURA 14-	Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle na região de papilas verdadeiras. Bactérias (→) estão aderidas à superfície anterior (convexa) dessas papilas. Aumento original: 500X.....	75
FIGURA 15-	Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle nas regiões de papilas gigantes (PG) e papilas verdadeiras (PV). Aumento original: 130X.....	75
FIGURA 16-	Aspecto macroscópico do dorso da língua de rata controle, 15 dias após a inoculação de <i>C. albicans</i> . Verificam-se áreas de atrofia papilar (→). Aumento original: 6,5X.....	77
FIGURA 17-	Aspecto macroscópico do dorso da língua de rata ovariectomizada, 15 dias após a inoculação de <i>C. albicans</i> . Nota-se região de atrofia papilar (→). Aumento original: 8,0X.....	77
FIGURA 18-	Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de <i>C. albicans</i> . Observa-se intensa proliferação de leveduras e hifas (→) na queratina. O epitélio demonstra áreas com duplicação da camada basal e exocitose (▶). PAS; aumento original 200X.....	80
FIGURA 19-	Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, seis horas após a inoculação de <i>C. albicans</i> . Verifica-se a presença de hifas (→) na queratina e células inflamatórias na camada basal do epitélio (▶). PAS; aumento original 200X.....	80

- FIGURA 20- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Presença de leveduras e hifas na queratina (→) e exocitose neutrofílica (▶). PAS; aumento original 630X. 81
- FIGURA 21- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Nota-se grande quantidade de hifas (→) e microabscesso intra-epitelial (▶). PAS; aumento original 630X..... 81
- FIGURA 22- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se leveduras (→) e biofilme bucal entre as papilas cônicas simples. Aumento original: 600X..... 82
- FIGURA 23- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Leveduras (→) e bactérias (▶) estão aderidas à superfície anterior das papilas cônicas simples. Aumento original:1900X..... 82
- FIGURA 24- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Leveduras e hifas estão na queratina, que parece estar se descamando da superfície (→). PAS; aumento original 200X..... 84
- FIGURA 25- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se leveduras e hifas na queratina (→) e células com degeneração hidrópica nas outras camadas do epitélio (▶). PAS; aumento original 400X.. 84

- FIGURA 26- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Verifica-se a presença de bactérias (→) aderidas à superfície anterior (convexa) das papilas cônicas simples, leveduras e hifas na queratina e degeneração hidrópica no epitélio (▶). PAS; aumento original 200X..... 85
- FIGURA 27- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Leveduras e hifas penetram na queratina (→) e o epitélio apresenta degeneração hidrópica (▶). PAS; aumento original 400X..... 85
- FIGURA 28- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*: Verificam-se hifas (→), descamação celular (▶) e degradação tecidual (◆). Aumento original: 1000X..... 86
- FIGURA 29- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se hifas (→) e degradação tecidual. Aumento original: 2500X..... 86
- FIGURA 30- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Nota-se a presença de hifas (→), descamação celular (➡) e bactérias (▶). Aumento original: 1200X..... 87

- FIGURA 31- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Verifica-se proliferação de hifas (→) entre as papilas filiformes. Aumento original: 300X..... 87
- FIGURA 32- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão tecidual, caracterizada por perda das papilas filiformes, hiperparaqueratose e hiperplasia do epitélio. HE; aumento original 100X..... 89
- FIGURA 33- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Detalhe da Figura 31, demonstrando hiperparaqueratose, hiperplasia do epitélio, espongirose, exocitose, duplicação e perda de estratificação da camada basal. HE; aumento original 200X..... 89
- FIGURA 34- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Nota-se formação de microabscesso intra-epitelial (→) em área de lesão tecidual. HE; aumento original 630X.. 90
- FIGURA 35- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão tecidual representada por perda das papilas filiformes, hiperplasia do epitélio com focos de duplicação da camada basal e exocitose (→). HE; aumento original 200X..... 90

- FIGURA 36- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Área de atrofia papilar (◆) na região de papilas cônicas simples anteriormente às gigantes (▶). Observa-se sulco transversal (→) na lesão. Aumento original: 75X..... 91
- FIGURA 37- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Detalhe da Figura 36, demonstrando atrofia das papilas filiformes e aumento da superfície interpapilar. Aumento original: 200X..... 91
- FIGURA 38- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Atrofia das papilas cônicas simples e aumento da superfície interpapilar. Aumento original: 300X..... 92
- FIGURA 39- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se atrofia das papilas cônicas simples e presença de papilas fungiformes (→). Aumento original: 220X..... 92
- FIGURA 40- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Observa-se perda das papilas filiformes, hiperparaqueratose, hiperplasia do epitélio, espongirose, exocitose, duplicação e perda de estratificação da camada basal. HE; aumento original 200X..... 94

- FIGURA 41- Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão tecidual caracterizada por perda das papilas filiformes e hiperplasia do epitélio com focos de duplicação da camada basal. A lâmina própria contém vasos sangüíneos congestos (→). HE; aumento original 200X..... 94
- FIGURA 42- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão representada por atrofia das papilas filiformes e aplainamento do tecido. Aumento original: 500X..... 95
- FIGURA 43- Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Observa-se sulco transversal profundo na área de lesão tecidual. Aumento original: 180X..... 95
- FIGURA 44- Faixa (máximo e mínimo) e valores medianos obtidos na análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por *C. albicans*. Não ocorreram diferenças estatisticamente significantes (Teste de *Mann-Whitney*, $\alpha = 5\%$) entre os grupos controle e ovariectomizado para os períodos de seis horas ($p = 0,12$), 24 horas ($p = 0,19$) e sete dias ($p = 0,34$)..... 97
- FIGURA 45- Médias e desvios-padrão dos dados (em log) de ufc/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal das ratas nos vários períodos de observação. *Diferenças estatisticamente significantes (Teste *t* de *Student*, $\alpha = 5\%$) entre os grupos controle e ovariectomizado nos tempos de 1 dia ($p = 0,00$), 2 dias ($p = 0,04$), 5 dias ($p = 0,001$) e 22 dias ($p = 0,00$)..... 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E1 = Estrona
E2 = 17 β -estradiol
E3 = Estriol
EBP = Proteína de ligação ao estrógeno
FSH = Hormônio do folículo estimulante
HE = Hematoxilina-eosina
HIV = Vírus da imunodeficiência humana
Ig = Imonoglobulina
LH = Hormônio luteinizante
MEV = Microscopia eletrônica de varredura
ML = Microscopia de luz
PAS = Ácido Periódico de Schiff
PL = Fosfolipase
SAP = Proteinase aspartil secretória
ufc = Unidades formadoras de colônias
pg/mL = picograma por mililitro
ng/mL = nanograma por mililitro
 μ L = microlitro

JUNQUEIRA, J. C. **Candidose experimental e recuperação de *Candida albicans* na cavidade bucal de ratas ovariectomizadas**. 2003. 143f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2003.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de candidose e a recuperação de *Candida albicans* na cavidade bucal de ratas controles e ovariectomizadas. Foram utilizadas 124 ratas não portadoras do gênero *Candida* na cavidade bucal, divididas em dois grupos: controle e ovariectomizado. Em cada grupo, quatro ratas foram utilizadas para avaliação morfológica do dorso da língua por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura; e 58 ratas receberam inoculações de *C. albicans* para estudo da candidose e recuperação de leveduras. O desenvolvimento de candidose no dorso da língua foi observado em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura nos períodos de seis horas, 24 horas, sete e 15 dias após a última inoculação. A recuperação de *C. albicans* foi realizada através de coletas de amostras bucais em intervalos de tempo de um, dois, cinco, sete dias, e progressivamente, a cada 15 dias até a obtenção de culturas negativas para leveduras. Os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de *Student* e *Mann-Whitney*. A morfologia do dorso da língua das ratas do grupo ovariectomizado não infectado por *Candida* foi semelhante ao controle. Entre as ratas infectadas, o grupo ovariectomizado exibiu menor quantidade de lesões de candidose em relação ao controle. A recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos animais ovariectomizados foi inferior aos controles em todos os períodos de observação. Concluiu-se que a candidose e a recuperação de *C. albicans* na cavidade bucal das ratas foram menos frequentes no grupo ovariectomizado em relação ao controle.

PALAVRAS-CHAVES: *Candida albicans*; candidíase; ratos; ovariectomia

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Candida* estão, comumente, presentes na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente (WEBB et al.¹³⁶, 1998; SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001). Alterações na microbiota bucal ou no sistema imunológico do hospedeiro podem levar ao desenvolvimento de candidose (ALLEN⁵, 1994; CANNON et al.²⁷, 1995; WEBB et al.¹³⁶, 1998).

A candidose tornou-se uma doença humana de crescente importância nos últimos anos, devido ao aumento do número de pacientes com comprometimentos imunológicos associados com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), uso de imunossupressores após transplantes de órgãos e terapias antineoplásicas (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

Ao tentar esclarecer os mecanismos relacionados com a patogênese da candidose bucal, muitos pesquisadores desenvolveram uma variedade de modelos experimentais em ratos, demonstrando que a cavidade bucal desses animais é facilmente colonizada por *Candida* e desenvolve infecções semelhantes às lesões clínicas observadas em seres humanos (ALLEN⁵, 1994; SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

Vários fatores predisponentes da candidose bucal foram estudados em modelos experimentais, incluindo: terapia com antibióticos de amplo espectro (FISKER et al.⁴⁰⁻¹, 1982; ALLEN et al.⁶, 1985), uso de próteses acrílicas (SHAKIR et al.¹¹⁹, 1986), diabetes mellitus (WASAN & CONKLIN¹³⁴, 1996), aplicação tópica de corticosteróides (DESLAURIES et al.³², 1995), xerostomia (JORGE et al.⁵⁸⁻⁹, 1993; TOTTI¹³³, 1998) e terapia imunossupressora (ALLEN et al.⁹, 1994; TAKAKURA et al.¹²⁸, 2003).

Além desses fatores, a infecção por *Candida* parece ser influenciada pelos níveis de hormônios ovarianos. Estudos demonstraram que ratas ovariectomizadas são resistentes à colonização vaginal por *Candida*, entretanto desenvolvem infecções prolongadas quando tratadas com altas doses de estrógeno (SOBEL et al.¹²⁴, 1985; FIDEL JÚNIOR et al.³⁹, 1993). Os mecanismos pelos quais esses hormônios agem na candidose vulvovaginal não estão totalmente esclarecidos, mas vários fatores têm sido sugeridos como: a) acúmulo de glicogênio no tecido epitelial (DENNERSTEIN & ELLIS³¹, 2001); b) aumento da adesão de *C. albicans* às células epiteliais (POWEL et al.¹⁰⁰, 1983; SEGAL et al.¹¹⁸, 1984); c) diminuição da resposta imunológica celular para leveduras (KALO-KLEIN & WITKIN⁶⁴, 1989); e d) indução da germinação e crescimento de *C. albicans* (WHITE & LARSEN¹³⁷, 1997; ZHANG et al.¹⁴⁴, 2000).

A influência dos níveis de estrógeno e progesterona na candidose vulvovaginal tem sido amplamente investigada. Entretanto, estudos similares na mucosa bucal são raramente descritos. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar os efeitos da ovariectomia no desenvolvimento de candidose e na recuperação de *C. albicans* na cavidade bucal de ratas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida*, constituído por cerca de 150 espécies de leveduras, é classificado como fungos imperfeitos da classe *Deuteromycetes* por não apresentar ciclo sexual (SAMARANAYAKE & McFARLANE¹⁰⁹, 1990; CANNON et al.²⁷, 1995). São células constantemente diplóides e incapazes de sofrerem meiose (McCULLOUGH et al.⁸⁵, 1996). As principais espécies de *Candida*, consideradas importantes patógenos humanos, são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guillemondii* e *C. dubliniensis* (CANNON et al.²⁷, 1995; SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

C. albicans é a espécie mais patogênica e mais freqüentemente isolada do organismo humano, tanto como microrganismo comensal como patógeno oportunista (CANNON et al.²⁷, 1995; McCULLOUGH et al.⁸⁵, 1996). É um fungo dimórfico, que pode existir sob a forma de levedura ou hifa (FARAH et al.³⁶, 2000). Leveduras são organismos eucarióticos, unicelulares, que medem aproximadamente 2 a 8µm de largura por 3 a 14µm de comprimento, e se multiplicam por um processo específico de divisão celular mitótica conhecido como brotamento. Hifas são filamentos lineares contendo múltiplas unidades celulares divididas por septos, podendo originar-se de uma hifa já existente ou de uma levedura (WEBB et al.¹³⁶, 1998). A produção de leveduras a partir de outras de forma linear resulta em uma estrutura denominada pseudohifa, que pode ser definida como cadeia de células alongadas com constrictões nas regiões de septos (LIU⁷⁸, 2001).

A transição entre células leveduriformes de *C. albicans* para a forma filamentosa requer algumas condições, como estágio nutritivo apropriado da levedura, presença de fatores indutores, temperatura elevada (maior que 33°C) e pH próximo ao neutro (SAMARANAYAKE & McFARLANE¹⁰⁹, 1990).

Análises químicas revelaram que *C. albicans* contém aproximadamente 60% de polissacarídeos, 13% de proteínas, 8,5% de lipídeos e 18,5% de compostos inertes, de acordo com a forma de crescimento. Na forma de hifas, a parede celular é composta por quantidade de quitina, cerca de três vezes maior, bem como maior concentração protéica. Ocorrem também diferenças qualitativas na composição de aminoácidos e teor de polissacarídeos (LACAZ⁷², 1980).

Ao ser observada em material colhido de lesões, *C. albicans* apresenta-se como uma célula oval, leveduriforme, Gram-positiva, de parede delgada e com germinação. Após 48-72 horas de incubação em ágar-Sabouraud, mostra colônias de 4 a 8mm de diâmetro, esbranquiçadas, úmidas e cremosas, com odor típico de levedo (WEBB et al.¹³⁶, 1998). Em ágar CHROM, as colônias de *C. albicans* apresentam coloração verde, diferenciando-se de colônias de *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa pálido) e *C. glabrata* (roxo) (WILLIAMS & LEWIS¹³⁸, 2000).

Em soro a 37°C, *C. albicans* produz uma projeção a partir das leveduras denominada tubo germinativo. Quando cultivada em ágar-fubá, apresenta estruturas esféricas características, denominadas clamidoconídeos ou clamidósporos. Fermenta glicose e maltose, e apresenta ação fermentativa variável para sacarose e galactose. Assimila galactose, maltose, trealose, amido solúvel, D-xilose e D-manitol. A assimilação é variável com L-sorbose, sacarose, melezitose, L-arabinose, D-arabinose, glicerol, ribitol, D-glucitol, DL-ácido láctico, ácido succínico e ácido cítrico (LACAZ et al.⁷³, 1998).

C. albicans foi classificada por Hasenclever & Mitchell⁴⁵ (1961) em sorotipos A e B. Em 653 amostras isoladas de diferentes

materiais clínicos, esses autores encontraram sorotipo A em 68% das amostras e sorotipo B em 32%. A predominância do sorotipo A em isolados clínicos tem sido confirmada por vários trabalhos em pacientes com estomatite por prótese (MARTIN & LAMB⁸², 1982; McMULLAN-VOGEL et al.⁸⁷, 1999), em indivíduos hospitalizados (RESENDE et al.¹⁰⁴, 2002) e em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (CAPOLUONGO et al.²⁸, 2000; SANT'ANA et al.¹¹², 2002).

Estudos experimentais realizados por Hasenclever & Mitchell⁴⁶ (1961) demonstraram que o grau de patogenicidade para camundongos é igual em ambos os sorotipos. Entretanto, em estudo mais recente, foi observada uma correlação do sorotipo B com potencial patogênico do microrganismo em indivíduos hospitalizados com severa imunodepressão (BRAWNER et al.¹⁷, 1992).

2.2 Patogenicidade de *Candida albicans*

Os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* não estão totalmente esclarecidos e são difíceis de serem definidos, pois dependem do tipo e local da infecção, estágio de invasão e resposta do hospedeiro (HAYNES⁴⁷, 2001; HUBE & NAGLIK⁵¹, 2001). Vários fatores de virulência foram sugeridos, como capacidade de aderência à mucosa, habilidade em formar tubos germinativos e hifas, secreção de enzimas histolíticas e produção de toxinas (DOUGLAS³⁴, 1987; AKPAN & MORGAN³, 2002).

O grau de colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro por espécies de *Candida* depende da capacidade desse microrganismo de se aderir à superfície da mucosa (McCULLOUGH et al.⁸⁵, 1996). Kimura & Pearsal⁶⁶ (1978) demonstraram que as espécies de *Candida* mais comumente isoladas de processos infecciosos, como *C. albicans* e *C. tropicalis*, possuem maior capacidade de aderência às

células do hospedeiro *in vitro* do que espécies menos patogênicas, como *C. krusei* e *C. guilhermondii*.

C. albicans apresenta capacidade de aderência a vários tipos celulares do hospedeiro, como epitélio, endotélio e células fagocíticas (CANNON et al.²⁷, 1995), além de se aderir em superfícies inanimadas, como o acrílico (SAMARANAYAKE & McFARLANE¹⁰⁹, 1990; SEGAL et al.¹¹⁷, 1988).

A aderência de *C. albicans* aos tecidos envolve mecanismos específicos, representados pela interação entre moléculas de superfície do microrganismo com receptores celulares do hospedeiro, e mecanismos inespecíficos, como forças eletrostáticas, agregação celular e hidrofobicidade de superfície (COTTER & KAVANAGH³⁰, 2000).

C. albicans expressa adesinas, moléculas especializadas de superfície que reconhecem estruturas do tecido hospedeiro, incluindo proteínas celulares, colágeno, fibrinogênio, fibronectina e laminina (CANNON et al.²⁷, 1995; WEBB et al.¹³⁶, 1998). A principal adesina de *C. albicans* é a manoproteína (PENDRAK & KLOTZ⁹⁶, 1995), mas glucana, quitina, proteínas da parede celular e lipídeos também podem atuar como adesinas (OLSEN⁹⁵, 1990).

A adesão de *Candida* às células epiteliais ocorre através da interação entre a porção protéica da manoproteína da levedura e a fucose ou N-acetilglicosamina, presentes nas glicoproteínas das células do epitélio (WEBB et al.¹³⁶, 1998).

Outro mecanismo envolvido na adesão é a hidrofobicidade da superfície celular, que parece ser determinada por alterações protéicas da parede celular de *C. albicans* (WEBB et al.¹³⁶, 1998; COTTER & KAVANAGH³⁰, 2000). Células hidrofóbicas são mais virulentas, pois aderem-se mais aos tecidos do hospedeiro (HAZEN et al.⁴⁸, 1991; WEBB et al.¹³⁶, 1998).

A formação de tubos germinativos e hifas por *C. albicans* tem sido associada com aumento da aderência às células epiteliais

(KIMURA & PEARSALL⁶⁷, 1980) e resistência aos fagócitos, devido as suas dimensões físicas (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001). Existem várias evidências da associação entre formação de hifas e patogenicidade de *C. albicans*, visto que as mesmas sempre estão presentes na candidose e são comumente observadas na cavidade bucal de pessoas com lesões por *Candida* (KIMURA & PEARSALL⁶⁷, 1980).

A correlação entre germinação e aumento de aderência de *C. albicans* às células epiteliais da cavidade bucal foi demonstrada em vários estudos. Kimura & Pearsall⁶⁷ (1980) verificaram que a inibição parcial da germinação pela cisteína resultou em diminuição da aderência. Martin et al.⁸³ (1984) observaram que cepas variantes de *C. albicans*, negativas para tubo germinativo, não produziram lesões na cavidade bucal de ratos, enquanto que cepas positivas provocaram lesões teciduais, caracterizadas por inflamação crônica, invasão de hifas e hiperplasia epitelial. Santoni et al.¹¹³ (1994) relataram que a alta capacidade de aderência das hifas está relacionada com o aumento da expressão de receptores para fibronectina $\alpha 5\beta$ -1.

Existem duas grandes famílias de enzimas produzidas por *C. albicans* que estão associadas com patogenicidade: as proteinases aspartil secretórias (SAP) e as fosfolipases (PL) (CANNON et al.²⁷, 1995; CALDERONE & FONZI²⁴, 2001; HAYNES⁴⁷, 2001). As proteinases foram primeiramente descritas por Staib¹²⁵ (1965) e, atualmente, constituem o fator de virulência mais estudado dos fungos (HAYNES⁴⁷, 2001). O termo proteinase aspartil secretória foi adotado em 1993, pela Sociedade Americana de Microbiologia (HOEGL et al.⁵⁰, 1996).

As proteinases são secretadas predominantemente por espécies de *Candida* patogênicas, como *C. albicans* e *C. tropicalis*. Cepas de *C. parapsilosis* possuem moderada atividade proteolítica, enquanto que espécies de menor interesse médico não secretam proteinase (CANNON et al.²⁷, 1995; HOEGL et al.⁵⁰, 1996).

As proteínas responsáveis pela defesa inespecífica da mucosa, incluindo lactoferrina, lactoperoxidase e mucina, são susceptíveis à degradação pela proteinase *in vitro*. Além disso, imunoglobulinas presentes na saliva, como IgA, IgG e IgM, são substratos naturais da proteinase. Assim, essa enzima pode facilitar a colonização de *C. albicans* na mucosa bucal (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

As proteinases secretadas por *Candida* estão associadas com a capacidade de aderência dessas leveduras. Ollert et al.⁹⁴ (1993) demonstraram que a pepstatina, um inibidor da proteinase aspartil secretória, diminuiu a aderência, *in vitro*, de *C. albicans* aos queratinócitos humanos. Outro importante papel dessa enzima é a capacidade de digerir queratina, permitindo invasão de *C. albicans* aos tecidos mais profundos (HOEGL et al.⁵⁰, 1996).

As proteinases aspartil secretórias de *C. albicans* são codificadas por uma família de genes *sap* composta por dez genes denominados *sap* 1 a 10 (SCHALLER et al.¹¹⁵, 1999; HUBE & NAGLIK⁵¹, 2001; SCHALLER et al.¹¹⁶, 2001). Esses genes parecem apresentar funções distintas nos vários tipos de infecção e nos diferentes estágios do processo infeccioso (SCHALLER et al.⁸⁷, 1999). Os genes *sap* 4 a 6 estão associados com candidose sistêmica, enquanto que a expressão dos genes *sap* 1 a 3 parece ser importante para a virulência de *C. albicans* nas infecções superficiais (HUBE & NAGLIK⁵¹, 2001; SCHALLER et al.¹¹⁶, 2001).

A fosfolipase também é uma enzima importante na patogenicidade de *C. albicans* (GHANNOUM⁴³, 2000), sendo capaz de catalizar a hidrólise de fosfolípidos, principais componentes das membranas celulares do hospedeiro (LANE & GARCIA⁷⁵, 1991).

Até o momento, foram identificadas quatro classes de fosfolipases (PL): PLA, PLB, PLC e PLD (CALDERONE & FONZI²⁴, 2001), entretanto apenas PLB parece ser requerida para a virulência do fungo em modelos experimentais de candidose. A eliminação do gene

plb1 em amostras de *C. albicans* atenuou a patogenicidade para animais. Além disso, PLB foi detectada na extremidade da hifa durante a invasão tecidual (GHANNOUM⁴³, 2000).

A produção de toxinas também é considerada importante fator de virulência de *C. albicans*. Esse microrganismo produz endotoxinas, que são letais para camundongos quando injetadas endovenosamente (MOURAD & FRIEDMAN⁸⁹, 1961) e causam eritema em pele de coelhos e cobaias (WINNER¹⁴⁰, 1958). Iwata⁵² (1975) isolou e caracterizou uma endotoxina, a candidoxina, que apresenta natureza protéica, alto peso molecular, localiza-se no citoplasma da célula e tem como ação principal a liberação de histamina dos mastócitos.

Várias espécies do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon* e outros produzem exotoxinas, que são substâncias protéicas com efeitos letais sobre outros fungos e uma variedade de bactérias (SAMARANAYAKE & MacFARLANE¹⁰⁹, 1990). Essas exotoxinas são conhecidas como toxinas *Killer*, fator *killer*, zimocina ou micocina (CANDIDO et al.²⁶, 1995).

O fenômeno *Killer* foi primeiramente descrito em *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan & Makower¹⁵ (1963) e representa um modelo de competição biológica semelhante à produção de bacteriocinas por bactérias (MAGLIANI et al.⁷⁹, 1997). Esse fenômeno tem sido útil na diferenciação de leveduras dentro da própria espécie, podendo ser usado como marcador epidemiológico (BENDOVA¹⁴, 1986).

Polonelli et al.⁹⁹ (1983) selecionaram nove leveduras produtoras de toxinas *killer*, pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula*, e preconizaram um método de biotipagem de espécies de *Candida*, denominado sistema *killer*, baseado na sensibilidade de uma cepa testada frente às toxinas *killer*. Jorge et al.⁶¹ (2000), empregando esse sistema, encontraram 11 biotipos de *C. albicans* em 120 amostras isoladas da cavidade bucal de pacientes saudáveis e com candidose.

2.3 *Candida albicans* e candidose na cavidade bucal

Espécies de *Candida* são comumente isoladas da cavidade bucal, trato gastrointestinal, vagina e pele de indivíduos saudáveis. Geralmente, a distribuição de *Candida* spp. nas várias partes do organismo é similar. *C. albicans* representa a espécie mais isolada, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Uma exceção é observada na pele, onde *C. parapsilosis* e *C. guilhermondii* são as espécies mais freqüentes (SAMARANAYAKE & MacFARLANE¹⁰⁹, 1990).

Leveduras do gênero *Candida* estão presentes na cavidade bucal de 3 a 48% de adultos e 45 a 65% das crianças saudáveis (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001). Esses valores variam conforme o método de coleta do material. Amostras obtidas através da coleta de saliva ou enxágües bucais apresentam médias mais elevadas do que amostras coletadas com *swab* (SAMARANAYAKE & MacFARLANE¹⁰⁹, 1990).

C. albicans apresenta predileção por locais anatômicos específicos da cavidade bucal (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001). O dorso da língua parece ser o reservatório primário dessas leveduras e o restante da mucosa, superfície dos dentes, placa bacteriana e saliva constituem sítios secundários (ARENDORF & WALKER¹², 1980). A quantidade de leveduras do gênero *Candida* presentes na saliva de indivíduos saudáveis pode sofrer grande variação, apresentando, normalmente, menos de 400 ufc/mL (STENDERUP¹²⁶, 1990).

A razão pela qual apenas algumas pessoas são portadoras de leveduras na boca ainda não está esclarecida. Provavelmente, fatores nutricionais, interações com a microbiota bacteriana normal e resposta imunológica estejam envolvidos (STENDERUP¹²⁶, 1990). Além disso, a colonização por *Candida* na

cavidade bucal parece ser favorecida em indivíduos do grupo sanguíneo O (BURFORD-MASON et al.²¹, 1988).

A presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal é mais elevada em pacientes com diabetes *mellitus* (MANFREDI et al.⁸¹, 2002) e em indivíduos infectados pelo HIV (CAMPISI et al.²⁵, 2002) que apresentam, respectivamente, uma porcentagem de isolamento de *Candida* spp. de 77% e 61,9%.

Jorge et al.⁶⁰ (1997) observaram maior número de pacientes positivos para *Candida* na cavidade bucal de portadores de prótese total (82,66%), de respiradores bucais (68,75%) e de usuários de prótese parcial removível (68,00%), quando comparados com um grupo controle (37,38%).

A colonização por leveduras na cavidade bucal também está relacionada com cárie dentária (RUSSEL et al.¹⁰⁸, 1990; RAITIO et al.¹⁰¹, 1996). Moalic et al.⁸⁸ (2001) isolaram leveduras da cavidade bucal de 70% dos indivíduos com índice de CPOD maior ou igual a oito e de 68,33% dos pacientes com mais de sete restaurações. Além disso, maiores quantidades de *Candida* (ufc/mL) foram observadas em indivíduos com lesões ativas de cárie.

Arendorf & Walker¹² (1980) salientaram que o estado de portador de *C. albicans* não é influenciado pela doença periodontal; entretanto, outros estudos têm demonstrado associação entre leveduras e patologias do periodonto. *C. albicans* tem sido detectada em números elevados na microbiota subgingival de abscessos periodontais (DEWIT et al.³³, 1985), na periodontite avançada em pacientes com AIDS (MURRAY et al.⁹⁰, 1987), em pessoas com periodontite juvenil localizada (GONZÁLEZ et al.⁴⁴, 1987) e em pacientes com periodontite crônica (JORGE⁵⁶, 1997).

As defesas dos tecidos da cavidade bucal contra *Candida* podem ser classificadas em mecanismos imunes não específicos, como a integridade da mucosa, presença de bactérias comensais,

polimorfonucleares, macrófagos e fatores salivares; e em mecanismos imunes específicos, representados por anticorpos séricos, anticorpos secretórios e imunidade mediada por células. Elementos salivares que podem inibir o crescimento de *Candida* incluem proteínas ricas em histidina e prolina, peroxidase, lactoferrina e lisozima (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

A relação entre patogenicidade de *C. albicans*, condições ambientais da cavidade bucal e fatores de defesa do hospedeiro podem levar ao desenvolvimento de um processo infeccioso, conhecido como candidose (FARAH et al.³⁶, 2000).

Candidose é um termo coletivo para um grupo de doenças que resultam da infecção por *Candida* spp. (McINTYRE⁸⁶, 2001), que podem variar de lesões mucosas superficiais até graves infecções sistêmicas (WEBB et al.¹³⁶, 1998). Lesões por *Candida* foram primeiramente observadas por Galeno no século II, sendo descritas como *ad aphthas albus*. Entretanto, o agente etiológico da candidose só foi identificado em meados do século XIX (McCULLOUGH et al.⁸⁵, 1996).

Em 1950, houve um aumento do número de casos de infecções superficiais por *Candida* associadas com a administração de antibióticos de amplo espectro, como a tetraciclina. Nos anos subsequentes, o extensivo uso de corticosteróides, agentes imunossupressores e antineoplásicos, contribuiu para o aumento da morbidade relacionada com *Candida*. Mais recentemente, a candidose tem recebido grande atenção devido ao advento da infecção pelo HIV, afinal mais de 90% dos indivíduos infectados por esse vírus apresentam candidose orofaríngea (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

C. albicans é a espécie mais frequentemente associada à candidose bucal, entretanto outras espécies podem estar relacionadas, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (FARAH et al.³⁶ 2000; McINTYRE⁸⁶, 2001). Recentemente, uma nova espécie, *C. dubliniensis*, tem sido isolada, principalmente, de lesões de pacientes

infectados pelo HIV. Essa espécie apresenta potencial de virulência muito semelhante à *C. albicans* devido à similaridade entre os genomas dessas duas espécies (SULLIVAN et al.¹²⁷, 1995).

Vários estudos experimentais e em seres humanos têm demonstrado a influência de fatores predisponentes para a candidose bucal. Entre eles, podemos citar: imunossupressão, distúrbios endócrinos, deficiência nutricional, medicações, doenças malignas, próteses dentárias, alterações epiteliais, mudança quantitativa ou qualitativa da saliva, dieta rica em carboidrato, idade, higiene oral deficiente e tabagismo (SHERMAN et al.¹²⁰ 2002; TAKAKURA et al.¹²⁸, 2003).

A candidose bucal pode apresentar três formas clínicas principais: pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001). A candidose pseudomembranosa é caracterizada por placas brancas aderentes à mucosa bucal, que podem ser removidas pela raspagem, expondo a mucosa adjacente normal ou eritematosa (SHERMAN et al.¹²⁰ 2002). Esta forma de candidose é bastante comum em crianças, idosos e pacientes com disfunções imunológicas (FARAH et al.³⁶, 2000). Normalmente, ocorrem no palato mole, orofaringe, dorso da língua, mucosa jugal e gengiva (McINTYRE⁸⁶, 2001).

Histologicamente, as placas brancas consistem de aglomerados de hifas, leveduras, células epiteliais descamadas e tecido necrótico (FARAH et al.³⁶, 2000). Observa-se invasão de hifas até a camada espinhosa do epitélio, formação de abscessos intra-epiteliais, acantose e infiltrado inflamatório subepitelial (FARAH et al.³⁶, 2000; REICHART et al.¹⁰³, 2000).

A candidose eritematosa está associada com o uso de corticosteróides e antibióticos de amplo espectro. Tem sido associada também com infecção por HIV, sendo que 50% das candidoses encontradas nesses pacientes apresentam essa forma da doença. Clinicamente, esta lesão é caracterizada por áreas eritematosas no dorso

da língua ou palato, com perda das papilas na superfície da língua (FARAH et al.³⁶, 2000; SHERMAN et al.¹²⁰ 2002).

No exame histopatológico é semelhante a forma pseudomembranosa, entretanto com menor quantidade de hifas penetrando no epitélio e infiltrado inflamatório mais intenso no conjuntivo (BUDTZ-JORGENSEN²⁰, 1990).

A candidose hiperplásica ou leucoplásica é uma condição crônica, caracterizada por placas brancas que não podem ser removidas pela raspagem (NEVILLE et al.⁹², 1998; SHERMAN et al.¹²⁰ 2002). Ocorrem na mucosa jugal, língua e palato (FARAH et al.³⁶, 2000), e freqüentemente estão associadas com tabagismo (REICHART et al.¹⁰³, 2000; AKPAN & MORGAN³, 2002). Histologicamente, é caracterizada por intensa penetração de hifas na superfície do epitélio, que exhibe hiperplasia e acantose. No conjuntivo subepitelial encontra-se infiltrado inflamatório que varia de moderado a severo (REICHART et al.¹⁰³, 2000).

2.4 Candidose bucal experimental em ratos

A candidose bucal tem sido amplamente estudada em animais experimentais, principalmente em ratos *Sprague-Dawley* e *Wistar*, por apresentarem facilidade de manuseio, baixo custo e tamanho suficiente da cavidade bucal para inoculação de *C. albicans* e coleta de amostras (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

Jones & Adams⁵³ (1970) foram os primeiros autores a estabelecer um modelo experimental de candidose bucal em ratos. Um volume de 0,25mL de suspensão de *C. albicans*, contendo 3×10^8 células viáveis/mL, foi inoculado na cavidade bucal desses animais. Após um período de observação de dez dias, constatou-se colonização por *Candida* em todos os ratos e evidências histológicas de candidose em 50% desses animais. Além disso, foram observados vários sítios de infecção, incluindo dorso da língua, mucosa jugal, gengiva livre e inserida.



Russel & Jones¹⁰⁷ (1973) estudaram os efeitos da dieta, normal ou rica em carboidratos, e da fase do microrganismo inoculado (leveduras ou hifas) na presença de *Candida* e candidose na cavidade bucal de ratos tratados com tetraciclina na água de beber (0,1%). A administração desse antibiótico resultou em persistência de *C. albicans* em todos os animais após um período de 24 dias. Observaram-se lesões teciduais, principalmente no dorso da língua, representadas por perda das papilas filiformes, hiperqueratose, acantose e presença de polimorfonucleares no epitélio. Tanto a persistência de *Candida*, como as alterações histológicas não foram influenciadas pela dieta ou fase do microrganismo inoculado.

Com o objetivo de descrever as características histológicas da infecção por *Candida* em um período mais prolongado, Jones & Russel⁵⁴ (1974) inocularam leveduras na cavidade bucal de ratos tratados com tetraciclina. Depois de 22 semanas, apenas dois dos quarenta animais estudados apresentavam alterações microscópicas na mucosa da língua, sugerindo que os efeitos da infecção por *Candida* foram reversíveis.

Através da administração de tetraciclina e inoculações de *C. albicans* na cavidade bucal de ratos durante 24 semanas, Allen et al.⁷ (1982) verificaram lesões clínicas bem delimitadas, com áreas queratóticas e bordas eritematosas, localizadas na linha média do terço posterior da língua, lembrando glossite rombóide mediana observada em seres humanos.

Após uma semana das inoculações de *C. albicans* na boca de ratos tratados com tetraciclina, Fisker et al.⁴⁰ (1982) recuperaram leveduras em 100% desses animais. Essa incidência diminuiu nos períodos subseqüentes, chegando a atingir 33% na quinta semana. Em relação aos focos de infecção, 98,8% foram encontrados na gengiva marginal, mucosa jugal, sulcos alveolares e dorso da língua. Infecções no

palato e gengiva inserida foram extremamente raras, representando 1,2% dos achados.

Philipsen et al.⁹⁷ (1982) analisaram a morfologia de diferentes mucosas da boca através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, verificando que a baixa coesão celular e os abundantes espaços intercelulares do epitélio da gengiva marginal, mucosa jugal, sulcos alveolares e dorso da língua favorecem a penetração de hifas.

Allen et al.⁸ (1985) estudaram os efeitos da tetraciclina na patogenicidade da candidose crônica em língua de ratos. Foram utilizados dois grupos, um composto por animais tratados com esse antibiótico na água de beber (Grupo I) e um segundo constituído por ratos que receberam apenas água destilada (Grupo II). Ambos os grupos foram submetidos a três inoculações de *C. albicans* em dias alternados durante uma semana e depois em intervalos semanais até o fim do experimento. Decorridas vinte semanas, lesões clínicas e histológicas foram observadas em 80% do Grupo I e 85% do Grupo II, não havendo diferença estatisticamente significante entre eles. Entretanto, as lesões do Grupo I eram mais extensas do que as do grupo II. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a exposição ao antibiótico não é um fator essencial para o desenvolvimento de candidose crônica experimental.

O desenvolvimento de candidose crônica em língua de ratos foi estudado por Allen et al.⁶ (1989), através de análise clínica, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. A maior quantidade de lesões clínicas e alterações epiteliais ocorreram durante a segunda e terceira semanas do experimento. Essas lesões iniciaram-se na região das papilas cônicas gigantes, entre os dois terços anteriores e o terço posterior da língua, e gradualmente atingiram papilas verdadeiras e cônicas simples. Na microscopia eletrônica de varredura, raramente foram encontradas leveduras e hifas. Esses achados foram concordantes com a

análise histológica que mostrou invasão de hifas no interior do epitélio nesse período de observação.

Lacasse et al.⁷¹ (1990) avaliaram os aspectos histológicos da mucosa jugal e palato mole de camundongos após curtos períodos da inoculação bucal de *C. albicans*. Depois de três horas, leveduras com formação de tubo germinativo apresentavam-se aderidas às células epiteliais. Nos períodos subseqüentes, observou-se progressão da infecção, que atingiu o máximo de colonização em 48 horas. A reação inflamatória iniciou-se após 24 horas com presença de polimorfonucleares e formação de microabscessos.

Jorge⁵⁵ (1991) observou o desenvolvimento de candidose em língua de rato após injeções intra-epiteliais de *C. albicans*. A análise histológica demonstrou que, após uma hora das injeções, as leveduras mostravam brotamentos de tubo germinativo e, decorridas 4 horas, pseudohifas penetravam nas células epiteliais com formação de microabscessos. O máximo de colonização foi observado no período de 12 horas. Depois de 24 a 48 horas, as áreas do epitélio com pseudohifas apresentaram descamação, hiperplasia da camada basal e discreta inflamação no tecido conjuntivo. Aos sete dias, havia poucas pseudohifas e o epitélio exibia acantose, hiperqueratose e perda das papilas filiformes.

Para determinar a velocidade de invasão de *C. albicans* nos tecidos de animais com o mínimo de resposta inflamatória, Bykov²³ (1991) estudou candidose vaginal em camundongos tratados com ciclofosfamida e candidose bucal em ratos neonatais. Após inoculações locais de *C. albicans*, esses animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo, compreendidos entre 2 a 48 horas. A velocidade de invasão fúngica foi calculada pela espessura do epitélio e o tempo necessário para completa penetração das hifas. Os resultados mostraram que a velocidade de invasão de *C. albicans* no epitélio da vagina e da língua foi, respectivamente, de 2,7 e 1,7 μ m/h. Considerando-se a média de invasão tecidual equivalente a 2,2 μ m/h e a espessura de diferentes

epitélios humanos, esses autores presumiram um tempo de invasão para os tecidos do homem de 22 a 59 horas. Assim, em condições severas de imunodeficiência, a colonização por *Candida* na superfície da mucosa pode levar a uma infecção disseminada em apenas dois dias.

O'Grady & Reade⁹³ (1993) estudaram o efeito do trauma, induzido pela aplicação de calor, na infecção por *Candida* em língua de ratos. Após seis inoculações bucais de *C. albicans* em um período de duas semanas, observou-se maior grau de infecção nos ratos sujeitos ao trauma, indicando que a ulceração traumática facilitou a colonização da mucosa por *Candida*.

Jorge et al.⁵⁸ (1993) avaliaram o efeito da xerostomia, provocada pela remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores, na presença de *Candida* na cavidade bucal de ratos. Esses animais receberam doses orais de 0,1mg/mL/dia de tetraciclina durante sete dias antes da inoculação de *C. albicans*, e a seguir, doses de 0,001mg/mL/dia até o fim do experimento. Após cinco semanas da inoculação, leveduras foram recuperadas em 50% dos ratos normais e em 100% dos animais sialoadenectomizados. Utilizando metodologia semelhante ao trabalho anterior, Jorge et al.⁵⁹ (1993) verificaram que, após inoculações de *C. albicans* durante 32 semanas, 20% dos animais normais e 70% dos ratos xerostômicos apresentavam infecção por *Candida* na língua. Esses estudos demonstraram que a sialoadenectomia predispõe à candidose bucal, confirmando a importância dos constituintes salivares na proteção contra esses fungos.

Totti et al.¹³³ (1996) analisaram a persistência de diferentes espécies de *Candida* na boca de ratos normais e sialoadenectomizados durante trinta dias. Grupos de seis animais foram inoculados com diferentes espécies, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilhermondii* e *C. krusei*. Tanto nos animais controle como nos xerostômicos, *C. albicans* foi a única espécie recuperada em grandes quantidades e em todos os períodos. Os autores concluíram que

a sialoadenectomia favoreceu apenas a implantação de *C. albicans*, porém não influenciou a colonização das outras espécies.

Totti¹³² (1998) observou a presença de *C. albicans* e candidose na cavidade bucal de camundongos normais e sialoadenectomizados, após uma e quatro inoculações desse microrganismo. Os animais xerostômicos apresentaram maior tempo de permanência de *C. albicans* na boca e lesões de candidose mais extensas na língua em relação aos camundongos normais, independentemente da quantidade de inoculações.

Freire-Garabal et al.⁴² (1999) estudaram os efeitos da anfetamina no desenvolvimento de candidose bucal em ratos. Antes da administração desse medicamento e inoculação de *C. albicans*, os animais foram submetidos à hipossalivação cirúrgica, para facilitar o estabelecimento e a persistência da infecção. Os resultados mostraram que a porcentagem de área da língua recoberta por lesões clínicas, a porcentagem de papilas alteradas e o grau de colonização do epitélio por hifas foram maiores nos animais tratados com anfetamina em relação ao grupo controle.

Um modelo de candidose orofaríngea em camundongos foi desenvolvido por Kamai et al.⁶⁵ (2001). Os animais receberam duas doses de 4mg de acetato de cortisona subcutaneamente e tetraciclina na água de beber (0,5mg/mL). Antes da inoculação de *C. albicans*, os camundongos foram anestesiados com injeção peritoneal de xilazina e pentobarbital. A seguir, uma bolinha de algodão com 3mm de diâmetro e saturada com 100µL de suspensão de *C. albicans* (10^8 células/mL) foi colocada sublingualmente na cavidade bucal durante 2 horas. Após o sacrifício dos animais, a língua e o esôfago foram excisados, sendo que alguns desses tecidos foram fixados em formaldeído para análise histológica e outros foram homogeneizados, diluídos e semeados em ágar Sabouraud para contagem de leveduras (ufc/tecido). Na análise histológica, observou-se presença de leveduras e hifas na camada

superficial do epitélio da língua e do esôfago. O número de leveduras recuperadas após três e sete dias da inoculação foi de 5 a 6 \log_{10} em ambos os tecidos. Assim, os autores concluíram que o modelo desenvolvido pode ser utilizado para o estudo da candidose orofaríngea.

Teichert et al.¹²⁹ (2002) avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica, mediada por azul de metileno, no tratamento da candidose bucal em camundongos imunossuprimidos. Durante um mês, os animais foram inoculados três vezes por semana com *swab* contendo *C. albicans*, obtido diretamente das colônias no ágar Saboraud dextrose. Além disso, uma suspensão de *C. albicans* contendo 9×10^8 células viáveis/mL foi adicionada à água de beber. No dia do tratamento, os camundongos receberam aplicação tópica bucal de 0,05mL de azul de metileno em diferentes concentrações e irradiação com laser diodo no comprimento de onda de 664nm. Coletas de amostras bucais para pesquisa de leveduras foram realizadas antes e após o tratamento. Os efeitos dessa terapia foram dependentes da dose do azul de metileno, sendo que concentrações entre 250 a 400 μ g/mL apenas reduziram o crescimento fúngico, enquanto que concentrações de 450 e 500 μ g/mL erradicaram totalmente as leveduras da cavidade bucal. Esses dados sugerem que a terapia fotodinâmica pode ser utilizada no tratamento da candidose em pacientes imunodeficientes.

Takakura et al.¹²⁸ (2003) desenvolveram um modelo de candidose pseudomembranosa na cavidade bucal de camundongos, baseado na utilização de um sedativo durante a inoculação de *C. albicans*. Os animais foram imunossuprimidos com duas injeções subcutâneas de prednisolona (100mg/kg) e tratados com tetraciclina na água de beber (0,83mg/mL). Para inoculação de *C. albicans*, um *swab* embebido em suspensão contendo $2,5 \times 10^7$ células viáveis/mL, foi aplicado no dorso da língua de camundongos previamente sedados. A sedação foi feita através da inalação de éter ou injeções intramusculares de clorpromazina nas doses de 2, 10 e 50mg/kg, que proporcionaram um

período de sedação, respectivamente, de 5min, 1,5h, 3h e 24h. Durante sete dias após a inoculação de *C. albicans*, foram realizadas recuperações de leveduras da cavidade bucal e análises macroscópicas das lesões no dorso da língua. O grau de infecção aumentou conforme o tempo de sedação, indicando que 10mg/kg (3h) de clorpromazina é a dose ideal para esse modelo de candidose experimental. Além disso, houve uma correlação positiva entre a contagem de leveduras (ufc/mL) recuperadas da cavidade bucal e a quantidade de lesões de candidose pseudomembranosa formadas na língua, sugerindo que as lesões clínicas refletem o grau de colonização da cavidade bucal por *C. albicans*.

2.5 Hormônios ovarianos

Os principais hormônios produzidos pelos ovários são os estrógenos e a progesterona. Os estrógenos normalmente encontrados na espécie humana são: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3). Dentre esses, o mais importante e ativo é o 17 β -estradiol (BYDLOWSKI²², 1999).

A concentração plasmática dos estrógenos é baixa na infância, apresentando menos de 10pg/mL. Os níveis desse hormônio aumentam gradativamente durante a puberdade e atingem concentrações de 30 a 320pg/mL no indivíduo adulto, variando conforme o ciclo menstrual. Após a menopausa, os níveis de estrógeno decrescem bastante, exibindo concentrações inferiores à 10pg/mL (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO¹¹, 1999).

Uma das características mais significantes da fisiologia da reprodução dos mamíferos é a sua ritmicidade sexual. De acordo com essa propriedade, os mamíferos podem ser classificados em dois grupos: aqueles que apresentam ciclo menstrual caracterizados pelo aparecimento cíclico de uma hemorragia genital devido à descamação do endométrio uterino e aqueles que possuem ciclo estral, representado por

modificações hormonais, morfológicas e comportamentais características, que levam o animal a entrar em estro ou cio (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO¹¹, 1999).

O ciclo menstrual é observado entre fêmeas de primatas superiores e o ciclo estral é visto em diversos animais, que podem ser subdivididos em poliestrais durante o ano inteiro, como os ratos, camundongos e hamsters, poliestrais durante apenas determinado período do ano e monoestrais, aqueles que apresentam apenas um estro por ano (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO¹¹, 1999).

Esta ritmicidade sexual depende fundamentalmente das alterações funcionais que ocorrem no sistema hipotálamo-hipofisário-gonadal. Durante o ciclo estral ou menstrual, o ovário apresenta modificações induzidas pelos hormônios hipofisários, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), que determinam a produção de hormônios gonadais, como estrógeno e progesterona. Esses hormônios induzem alterações morfológicas e funcionais nos órgãos sexuais; alterações na secreção de hormônios do sistema hipotálamo-hipofisário, através de sua ação retroalimentadora negativa ou positiva; e modificações comportamentais, por sua ação no sistema nervoso central (BYDLOWSKI²², 1999; ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO¹¹, 1999).

O ciclo menstrual na mulher possui duração de 28 dias e é caracterizado por duas fases: uma inicial, que segue à menstruação e precede à ovulação, denominada de fase proliferativa, folicular ou estrogênica; e outra, a fase secretora, lútea ou progestacional, que se segue à ovulação e precede a menstruação seguinte (BYDLOWSKI²², 1999).

A fase proliferativa é caracterizada pelo desenvolvimento gradual dos folículos ovarianos e secreção de estrógenos, que induz à proliferação do endométrio uterino. Durante os primeiros sete dias, os níveis de estrógeno e progesterona são baixos e relativamente constantes. Dos sete aos 14 dias, os níveis estrogênicos aumentam

gradativamente, atingindo o pico máximo um pouco antes da ovulação. A ovulação consiste no rompimento do folículo maduro e liberação do óvulo, que é captado pelas fimbrias da tuba uterina, onde pode ser fecundado. O restante do folículo torna-se hemorrágico, formando o corpo lúteo. Durante a fase secretora, o corpo lúteo começa a formar quantidades crescentes de estrógeno e principalmente progesterona, que faz do endométrio um tecido secretor e muito vascularizado. No fim dessa fase, o corpo lúteo começa a degenerar e a produção de estrógeno e progesterona diminui gradativamente até a menstruação (JUNQUEIRA & CARNEIRO⁶², 1999; BYDLOWSKI²², 1999; WILSON & ADAIKAN¹³⁹, 1999).

O ciclo estral da rata apresenta duração de quatro a cinco dias (NEQUIM et al.⁹¹, 1979) e após cada estro, forma-se um corpo lúteo não funcionante, ou seja, incapaz de produzir estrógeno e progesterona, a menos que ocorra fecundação. O ciclo estral apresenta quatro fases: o diestro, fase de repouso com duração de um dia; o proestro, período pré-ovulatório que permanece por 12 horas; o estro ou cio com duração de um dia; e o metaestro, fase de retorno ao período de repouso, que persiste por um ou dois dias (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO¹¹, 1999).

Durante o ciclo estral, as concentrações mais altas de estradiol ocorrem no proestro e a de progesterona em dois momentos diferentes do ciclo, no proestro e na transição entre metaestro e o diestro. (NEQUIN et al.⁹¹, 1979; WATANABE et al.¹³⁵, 1990).

As fases do ciclo estral da rata podem ser identificadas através das características celulares do esfregaço vaginal: o diestro caracteriza-se pela presença de células epiteliais, leucócitos e muco; o proestro apresenta somente células epiteliais; o estro possui apenas células queratinizadas; e o metaestro mostra células epiteliais, queratinizadas e muitos leucócitos (ANTUNES-RODRIGUES & FAVARETTO¹¹, 1999).

2.6 Hormônios ovarianos e candidose

A candidose vulvovaginal é uma doença bastante comum, sendo que 75% das mulheres apresentam esse tipo de infecção em algum momento da vida (LANCHARES & HERNÁNDEZ⁷⁴, 2000). Vários estudos epidemiológicos demonstraram que a candidose é rara em meninas antes da menarca e em mulheres após a menopausa, que apresentam baixos níveis de hormônios ovarianos. Por outro lado, essa infecção é muito freqüente durante a gestação e a fase secretora do ciclo menstrual, quando os níveis de estrógeno e progesterona estão elevados. Além de ser, também, bastante comum em mulheres submetidas à terapia de reposição hormonal. Todos esses dados sugerem que a candidose vulvovaginal é influenciada pelos hormônios ovarianos (SOBEL et al.¹²³, 1996; FERRER³⁷, 2000, LANCHARES & HERNÁNDEZ⁷⁴, 2000).

Segundo Ferrer³⁷ (2000), os altos níveis de estrógeno durante a gestação favorecem o acúmulo de glicogênio nas células epiteliais da vagina, aumentando a fonte de carboidrato para o crescimento e germinação de *Candida*.

Dennerstein & Ellis³¹ (2001) observaram 339 mulheres com mais de 55 anos de idade, das quais 142 faziam reposição hormonal. A presença de candidose foi encontrada em 38 pacientes tratadas com estrógeno, sendo que 37 apresentaram infecção por *C. albicans* e apenas uma por *C. glabrata*. Entre as mulheres que não faziam reposição hormonal, a candidose foi observada em dez pacientes, sendo oito infectadas por *C. albicans* e as demais por *C. glabrata* e *C. sake*. Além disso, esses autores verificaram a capacidade de assimilação do glicogênio de várias amostras de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae* e *C. valida*. Todas as amostras de *C. albicans* apresentaram capacidade em assimilar o glicogênio. Entretanto, nenhuma das outras espécies de *Candida* apresentaram essa mesma característica, sugerindo que a alta

patogenicidade de *C. albicans* na candidose vaginal está relacionada com o acúmulo de glicogênio nas células epiteliais.

Existem vários estudos sobre a influência dos hormônios ovarianos na adesão de *C. albicans* às células epiteliais (POWEL et al.¹⁰⁰, 1983; SEGAL et al.¹¹⁸, 1984; KALO & SEGAL⁶³, 1988; THEAKER et al.¹³⁰, 1993). Powel et al.¹⁰⁰ (1983) demonstraram que a aderência é aumentada pela impregnação de estrógeno nas células do epitélio vaginal. Esse hormônio aumenta a exposição de glicoproteínas na superfície celular, que agem como receptores para leveduras. Segal et al.¹¹⁸ (1984) verificaram maior aderência de *C. albicans*, *in vitro*, às células epiteliais da vagina de mulheres grávidas e diabéticas. Kalo & Segal⁶³ (1988) estudaram os efeitos do estrógeno e da progesterona na aderência de *C. albicans* às células epiteliais vaginais e constataram que somente a progesterona foi capaz de aumentar a aderência dessas leveduras ao epitélio vaginal.

Theaker et al.¹³⁰ (1993) observaram a influência do ciclo menstrual na aderência de *Candida* às células epiteliais da boca. A aderência de *C. albicans* foi significativamente maior nas células coletadas no quinto dia do ciclo menstrual, quando comparadas aos dias 15, 22 e 28, sugerindo que os hormônios ovarianos também podem estar associados com a candidose bucal.

Kalo-Klein & Witkin⁶⁴ (1989) estudaram os efeitos das alterações hormonais do ciclo menstrual na morfogênese de *C. albicans* e na resposta imunológica celular para esse microrganismo. Foram coletadas amostras de sangue de mulheres saudáveis durante as quatro semanas do ciclo menstrual. A seguir, uma suspensão de leveduras de *C. albicans* foi acrescentada ao soro obtido dessas pacientes para verificação da formação de tubos germinativos, e proteínas de *C. albicans* foram adicionadas aos linfócitos extraídos do sangue das pacientes, para observação da proliferação de linfócitos em resposta a esses antígenos. Constatou-se que durante a fase secretora do ciclo menstrual ocorreu um

aumento da germinação de *C. albicans*, sendo esse aumento inversamente proporcional à resposta proliferativa dos linfócitos. Assim, o estágio hormonal das mulheres durante o ciclo menstrual parece influenciar a patogenicidade de *C. albicans*, por modular a resposta imunológica celular.

White & Larsen¹³⁷ (1997) analisaram os efeitos do estrógeno na morfogênese de três isolados clínicos de *C. albicans in vitro*. A adição de doses farmacológicas de estradiol (1 μ M) promoveu um pequeno aumento no número de germinações. Concentrações cem vezes menores desse hormônio, semelhante aos níveis fisiológicos, provocaram grande indução de germinação. Os autores concluíram que o estradiol foi um forte indutor morfogênico nos três isolados clínicos de *C. albicans*, quando administrado em doses similares aos níveis fisiológicos.

Zhang et al.¹⁴⁴ (2000) estudaram os efeitos do estradiol no crescimento de *C. albicans* e na resistência desse microrganismo a temperaturas elevadas. Foram preparadas culturas de células de três isolados clínicos de *C. albicans*, nas quais foi adicionado 17 β -estradiol ou apenas o solvente desse hormônio (grupo controle). Maior número de células viáveis de *C. albicans* foi encontrado nas culturas que continham estradiol, e o percentual de crescimento, após incubação em temperatura elevada (48°C), foi superior a 45% no grupo com estrógeno e inferior a 15% no grupo controle. Além disso, o estradiol foi capaz de estimular os genes *cdr1* e *hsp90*, que estão envolvidos com a virulência desse microrganismo.

Uma proteína de ligação ao estrógeno (EBP), com alta especificidade para 17 β -estradiol e outros compostos fenólicos, foi isolada de células de *C. albicans* (SKOWRONSKI & FELDMAN¹²², 1989; BUCKMAN & MILLER¹⁸, 1998). Essa proteína não apresenta homologia com os receptores de estrógeno presentes nos mamíferos, e parece ser um membro da família das flavoproteínas (MADANI et al.⁸⁰, 1994). A função fisiológica da EBP ainda não foi identificada, mas acredita-se que

ela seja responsável pelos efeitos do estrógeno na patogenicidade de *C. albicans* (BUCKMAN & MILLER¹⁹, 2000; ESSMANN & LARSEN³⁵, 2000).

A influência dos hormônios ovarianos na candidose vulvovaginal tem sido amplamente estudada em animais experimentais (SOBEL et al.¹²⁴, 1985; KINSMAN & COLLARD⁶⁸, 1986; FIDEL JUNIOR et al.³⁸, 2000). Sobel et al.¹²⁴ (1985) avaliaram os efeitos da administração de estradiol na candidose vaginal de ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno e ratas controle. Em vários períodos subseqüentes da inoculação de *C. albicans*, foram realizadas lavagens vaginais para quantificação de leveduras. Após três semanas, 13 das 14 ratas tratadas com estrógeno apresentavam *Candida* no fluido vaginal, com média de 4ufc(Log)/mL. Entretanto, apenas nove das 14 ratas controle estavam infectadas, com média de 2,7ufc(Log)/mL. Além disso, a persistência de *C. albicans* após cinco semanas foi observada em dez animais tratados com estrógeno e em apenas uma rata do grupo controle.

Para avaliar os efeitos dos hormônios ovarianos na infecção vaginal por *C. albicans*, Kinsman & Collard⁶⁸ (1986) inocularam uma suspensão de leveduras, contendo 5×10^8 células por mL, na vagina de ratas ovariectomizadas e tratadas com estrógeno e progesterona. Utilizando-se de enxágües vaginais, observaram persistência de *C. albicans* por 32 dias em ratas tratadas com estrógeno e somente por sete dias em animais tratados com progesterona. Além disso, os resultados da citologia esfoliativa revelaram que o estrógeno manteve a infecção, com crescimento de hifas entre as células epiteliais queratinizadas. Entretanto, nos ratos injetados com progesterona, as leveduras foram eliminadas antes da formação de hifas, concluindo que a administração de estrógeno, mas não de progesterona, predispõe à infecção por *Candida*.

Fidel Júnior et al.³⁸ (2000) estudaram os efeitos dos hormônios ovarianos na candidose vaginal experimental em camundongos, induzida pela inoculação de suspensão de *C. albicans*, contendo 5×10^4 células/mL. A administração de estradiol nas

concentrações entre 0,01 e 0,2mg/semana resultou em infecção persistente durante os 35 dias de observação. Entretanto, o tratamento com 0,002mg/semana de estradiol e a não administração desse medicamento mantiveram a infecção, respectivamente, por apenas 14 e sete dias. Esses autores também estudaram os efeitos da progesterona na candidose experimental. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento: estrógeno (Grupo I), progesterona (Grupo II), estrógeno e progesterona (Grupo III) e placebo (Grupo IV). Os Grupos I e III apresentaram alta quantidade de leveduras recuperadas da vagina dos camundongos, durante os 21 dias de observação. Por outro lado, os Grupos II e IV mostraram um curto tempo de infecção (7 dias), sugerindo que apenas o estrógeno é importante na susceptibilidade à infecção vaginal por *C. albicans*.

Essmann & Larsen³⁵ (2000) estudaram os efeitos de um modulador de receptor de estrógeno (LY117018) na colonização vaginal por *C. albicans* em ratas ovariectomizadas. Os animais foram inoculados com $4,5 \times 10^4$ células viáveis de *C. albicans* e tratados com estradiol, modulador de receptor de estrógeno ou placebo. Nos dias dois, cinco, sete e dez após a inoculação, foram realizados enxágües vaginais para recuperação de leveduras e citologia esfoliativa para caracterização das células epiteliais. Leveduras foram recuperadas até dez dias nas ratas tratadas com estrógeno, por apenas cinco dias nos animais que receberam placebo e em nenhum dia nas ratas tratadas com modulador de estrógeno. Na citologia, observou-se a presença de células queratinizadas tanto no grupo tratado com estradiol, como no grupo tratado com modulador de estrógeno. Os resultados desse trabalho indicam que o tratamento com modulador de receptor de estrógeno previne a colonização por *C. albicans*. Entretanto, esse efeito não pode ser atribuído às alterações celulares do epitélio vaginal, uma vez que não foi observada diferença na composição dessas células entre os grupos tratados com estradiol e com modulador de receptor de estrógeno.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) estudar o desenvolvimento de candidose no dorso da língua de ratas controles e ovariectomizadas, após inoculações de *C. albicans*, utilizando-se das análises em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura;
- b) verificar a recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal de ratas controles e ovariectomizadas, após inoculações de leveduras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP, sob protocolo nº 028/2001 (Anexo A).

Foram utilizadas 137 ratas (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) com peso inicial de aproximadamente 250g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP, que foram distribuídas em vários experimentos conforme Figura 1.

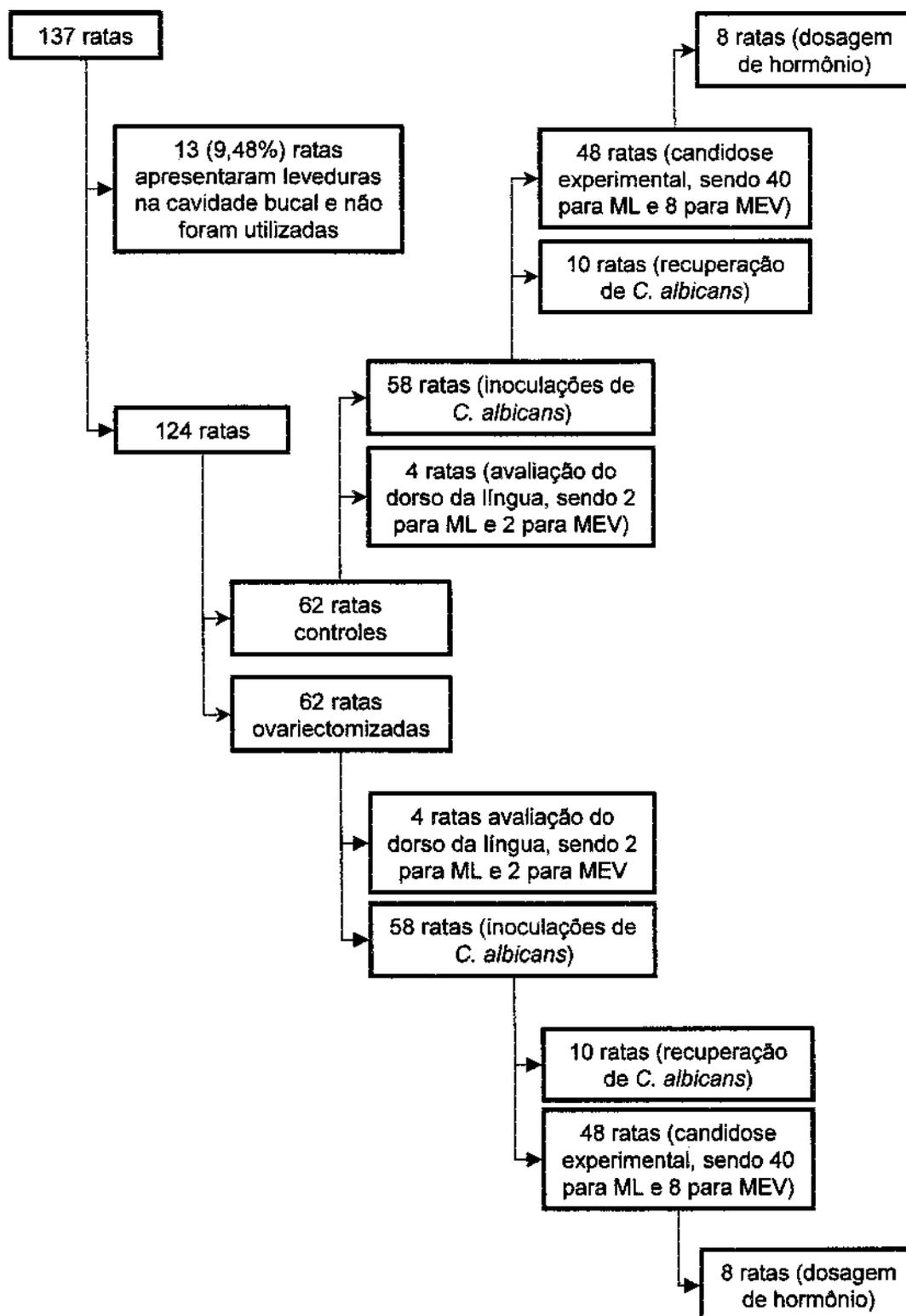


FIGURA 1 - Fluxograma ilustrando a distribuição dos animais nos experimentos.

ML: Microscopia de luz; MEV: Microscopia eletrônica de varredura

4.2 Colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal das ratas

No início desse experimento, foi determinada a colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais. Para isso foi coletado material de toda a cavidade bucal, principalmente do dorso da língua, utilizando-se um *swab* esterilizado, sendo imediatamente semeado em placas com ágar Sabouraud dextrose (Difco), adicionado de 0,1mg de cloranfenicol (Carlo Erba - 0,1mg por mL de meio) em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, permanecendo por mais cinco dias à temperatura ambiente.

Após o crescimento de colônias esféricas, branco-foscas, com aparência de porcelana, medindo de 4 a 8mm e com odor característico, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias por placa (ufc/placa). A seguir, foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram.

Quando na microscopia, foram observadas células ovaladas, Gram-positivas, com ou sem brotamento, apresentando aspecto de *Candida*, as colônias foram transferidas para ágar Sabouraud dextrose inclinado, para obtenção de culturas puras. Foram isoladas todas as colônias que apresentaram morfologia ou coloração diferente. Para colônias com morfologias idênticas, foram isoladas cinco amostras.

As ratas positivas para leveduras do gênero *Candida* não foram utilizadas nesse trabalho.

4.3 Ovariectomia

As ratas foram anestesiadas com solução de Rompun (Bayer) e Francotar (Virbac) na proporção de 1/0,5mL, na dose de 0,1mL/100g de peso corporal, via intramuscular. Após depilação da região

abdominal lateral e anti-sepsia com álcool iodado, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na região próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. O ovário foi identificado, exposto e foi realizada hemostasia, através da ligação da parte superior da trompa com fio de seda (Ethicon/ Johnson & Johnson nº4). O ovário juntamente com a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero foram excisados. As camadas musculares foram suturadas com fio de sutura absorvível (Cirumédica nº4) e a pele com fio de seda (Ethicon/ Johnson & Johnson nº4), sendo esse procedimento realizado bilateralmente.

Os animais controles foram submetidos à mesma cirurgia, porém seus ovários não foram excisados.

4.4 Peso corporal de ratas controles e ovariectomizadas

Vinte animais controles e vinte ovariectomizados foram pesados no dia da ovariectomia e sete, 14 , 21 e 28 dias após essa cirurgia. Cada rata foi colocada em gaiola individual e pesada (g) em balança digital (Micronal B600). O percentual de aumento do peso das ratas, após 28 dias da ovariectomia, foi calculado conforme Figura 2:

$$\text{Aumento de peso (\%)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}}$$

FIGURA 2 - Fórmula utilizada para cálculo do percentual de aumento de peso das ratas, após 28 dias da cirurgia de ovariectomia

4.5 Dosagem de estrógeno e progesterona

Para dosagem de estrógeno e progesterona, foram utilizados oito animais controles e oito ovariectomizados. Esses animais foram sacrificados após 31, 38 ou 46 dias da cirurgia de ovariectomia. Antes da anestesia para o sacrifício, realizou-se um esfregaço vaginal nas

ratas controles para identificação da fase do ciclo estral e somente foram usadas para dosagem de hormônios aquelas que estavam em proestro (Quadro 1).

Quadro 1 - Características das células presentes no esfregaço vaginal das ratas durante as quatro fases do ciclo estral⁸⁴

fases do ciclo estral	leucócitos	muco	células epiteliais	células queratinizadas
diestro	++	++	+	-
proestro	-	-	+++	-
estro	-	-	-	+++
metaestro	+++	-	++	++

(-): ausência, (+): pouco, (++) : moderado, (+++): abundante

Após anestesia para o sacrifício, foi retirado 2mL de sangue da artéria aorta abdominal com auxílio de uma seringa contendo heparina a 1% (Liquemine-Rocha). As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas (centrífuga Excelsa 2 Fanem) a 2500Xg por 10min e o plasma foi estocado a -20°C por no máximo dois meses. A seguir, foi realizada dosagem de estradiol e progesterona por radioimunoensaio (Diagnostic Product Corporation, Estradiol TKE21, Progesterona TKPG1).

Para avaliação das concentrações de hormônios nas amostras de plasma, foi registrada uma curva padrão de referência, utilizando-se soluções de estradiol nas concentrações de 20, 50, 150, 500, 1800 e 3600pg/mL e de progesterona nas concentrações de 0,1, 0,5, 2, 10, 20 e 40ng/mL. Em cada tubo revestido por anticorpos, foram colocados 100µL da amostra do plasma ou da solução padrão e 1mL de lodo reativo (¹²⁵I). Após agitação (Vortex), os tubos foram incubados por três horas em temperatura ambiente. A leitura da radiação gama das paredes do tubo foi feita em aparelho Cobra II Auto-Gama (Packard).

O conteúdo de estradiol presente nas amostras foi expresso em pg/mL de plasma e o de progesterona em ng/mL de plasma, determinados através da curva de referência. A variação intra-ensaio foi de 2,4 a 3,3 para estradiol e 2,1 a 3,0 para progesterona. A variação inter-ensaio foi de 3,2 e 3,7, respectivamente, para estradiol e progesterona.

Esses procedimentos foram realizados na disciplina de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP.

4.6 Avaliação morfológica do dorso da língua de ratas controles e ovariectomizadas

Após 28 dias da cirurgia, oito ratas não infectadas por *C. albicans* foram sacrificadas, sendo quatro do grupo controle e quatro do grupo ovariectomizado. As línguas foram removidas e analisadas macroscópica e microscopicamente, conforme descrito nos itens 4.8.1 a 4.8.4. De cada grupo, dois espécimes foram submetidos à análise em microscopia de luz e dois em microscopia eletrônica de varredura.

4.7 Inoculação de *C. albicans* na cavidade bucal das ratas

Decorridos 28 dias da cirurgia de ovariectomia, 116 ratas receberam inoculações bucais de *C. albicans*, sendo 58 controles e 58 ovariectomizadas. Antes da realização das inoculações, foi novamente coletado material da cavidade bucal dessas ratas, para verificação da colonização natural por leveduras do gênero *Candida*, conforme descrito no item 4.2. A inoculação de *C. albicans* foi realizada apenas nos animais negativos para o gênero *Candida*.

A suspensão de *Candida* a ser inoculada na cavidade bucal das ratas foi preparada através da cepa padrão de *C. albicans* (F-72), proveniente do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, isolada de paciente que

apresentava estomatite por prótese total. Esta cepa apresenta alta letalidade para camundongos e é produtora de proteinase, hialuronidase, condroitin-sulfatase e fosfatase (ALMEIDA¹⁰, 1991), sendo caracterizada através de toxinas *killer* como biotipo 111 (TOTTI¹³², 1998).

Para obtenção da suspensão com número conhecido de microrganismos, a cepa foi semeada em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 37°C por 48 horas. O crescimento foi suspenso em 5mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%) e centrifugado a 1300Xg durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido novamente e o sedimento ressuspenso em 5mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%).

A contagem do número de células viáveis da suspensão foi feita em câmara de Neubauer, após prévia coloração com azul de metileno a 0,05% (REED et al.¹⁰², 1990). A suspensão foi padronizada de forma a obter-se 5×10^8 células viáveis/mL.

Para a inoculação da suspensão de *C. albicans*, os animais foram sedados com solução de Rompun (Bayer) e Francotar (Virbac), na proporção de 1/0,5mL, na dose de 0,05mL/100g de peso corporal, via intramuscular. As ratas receberam um inóculo contendo 5×10^8 células viáveis de *C. albicans* em três dias consecutivos. A inoculação foi realizada colocando-se 0,2mL da suspensão de *C. albicans* na boca dos animais, com auxílio de seringa de 1mL e agulha 30 x 8cm com ponta romba. Imediatamente após a inoculação, o material foi espalhado uniformemente pela mucosa do dorso da língua, com auxílio de um *swab* previamente esterilizado e embebido na suspensão.

4.8 Candidose experimental

Foram utilizadas 96 ratas para o estudo da candidose experimental, sendo 48 do grupo controle e 48 do grupo ovariectomizado.

Esses animais foram divididos em vários períodos de observação, conforme Quadro 2.

Quadro 2 - Número de ratas utilizadas para o estudo da candidose experimental, de acordo com os diferentes períodos de sacrifício (n=96)

Tempo de Sacrifício*	Controles (n = 48)		Ovariectomizadas (n = 48)	
	ML	MEV	ML	MEV
seis horas	10	2	10	2
24 horas	10	2	10	2
sete dias	10	2	10	2
15 dias	10	2	10	2

* Tempo de sacrifício após inoculação de *C. albicans*

ML: Microscopia de Luz

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

4.8.1 Sacrifício dos animais

As ratas foram sacrificadas em seis horas, 24 horas, sete e 15 dias após a última inoculação. Para o sacrifício, os animais foram anestesiados, decaptados em uma guilhotina e suas línguas foram removidas, analisadas macroscopicamente e, a seguir, processadas para análises em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.

4.8.2 Análise macroscópica

Observações e documentações macroscópicas do dorso da língua foram feitas com auxílio de lupa estereoscópica (Zeiss), com aumentos de 6,5; 8; 10 e 12,5 vezes, procurando-se a presença de lesões clínicas características de candidose.

4.8.3 Microscopia de luz

Para análise em microscopia de luz, as línguas foram fixadas em formol a 10% por 24 horas e seccionadas em duas partes no sentido sagital. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 7 μ m de espessura, que foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

A presença de candidose foi observada em toda a superfície do dorso da língua e a descrição dos cortes histológicos foi realizada de acordo com a quantidade de leveduras e hifas presentes, localização e extensão das lesões, e alterações dos tecidos envolvidos.

Foi feita uma análise semi-quantitativa para avaliar o grau de colonização do epitélio por *Candida*, baseada na metodologia proposta por Freire-Garabal et al.⁴² (1999). Foram analisados 28 campos histológicos do dorso da língua de cada corte, no sentido antero-posterior, utilizando-se objetiva de quarenta vezes. Para cada campo histológico foi atribuído um escore, conforme Quadro 3. Assim, foram atribuídos 28 escores para cada corte histológico. De cada animal, foram analisados dois cortes histológicos, escolhidos aleatoriamente, totalizando 56 escores por animal. Para realização da análise estatística, foi determinado um escore médio dos 56 escores.

Quadro 3 - Escores atribuídos aos campos histológicos para análise do grau de colonização do epitélio por *Candida*

Escore	Quantidade de leveduras/hifas
0	ausência
1	de 1 a 5
2	de 6 a 15
3	de 16 a 50
4	mais de 50

4.8.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para observação em microscopia eletrônica de varredura, os espécimes foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1M e pH 7,3) por 24 horas a 4°C.

As línguas foram seccionadas em três partes no sentido transversal. Para análise da candidose experimental, em um animal foi feita análise microscópica das três partes da língua. Após a observação de candidose neste animal, optou-se pela utilização do terço médio da língua para analisar os demais animais.

As peças foram lavadas três vezes com tampão fosfato (0,2M e pH 7,3), sendo que cada lavagem teve duração de 10min. A seguir, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio tampão fosfato (0,2M e pH 7,3) a 1% durante 1 hora. Após mais duas lavagens com esse tampão, os espécimes foram submetidos à desidratação com concentrações crescentes de acetona: 50% por 30min, 70% por 30min, 90% por 30min e 100% por uma hora. Posteriormente, foi realizada a secagem ao ponto crítico com CO₂ (Denton Vacuum DCP 1 - USA).

As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e recobertas com ouro por 160 segundos a 40 miliamperes (Denton Vacuum Desk II) e avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM5600 e Jeol JSM5310).

Esses procedimentos foram realizados na disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP e no Laboratório Associados de Sensores do Instituto de Pesquisas Espaciais/INPE.

4.9 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal das ratas

Vinte ratas foram utilizadas para a recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal, sendo dez controles e dez ovariectomizadas.

Após a inoculação de *C. albicans* conforme descrito no item 4.7, foram feitas recuperações de leveduras da cavidade bucal em intervalos de tempo de um, dois, cinco, sete dias e a seguir, posteriormente em intervalos regulares de 15 dias até se obterem duas culturas negativas para leveduras em cada animal.

Foram coletadas amostras da cavidade bucal dos animais com *swab*, girando-se o mesmo no interior da boca durante 60 segundos, procurando-se preferencialmente coletar material do dorso da língua. O *swab* foi imediatamente colocado em tubo, contendo 0,95mL de solução fisiológica esterilizada e o mesmo foi agitado durante 30 segundos, considerando-se a diluição como sendo 10^{-2} . Foram realizadas diluições até 10^{-4} e 0,1mL de cada diluição foi semeado em duplicata na superfície de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e as placas incubadas a 37°C por 48 horas e, a seguir, por mais cinco dias à temperatura ambiente.

Após período de incubação, colônias típicas de *Candida* foram contadas em placas que exibiram entre trinta a trezentas colônias. Placas com número de colônias inferior a trinta na diluição 10^{-2} foram consideradas como 10^{-1} células de *Candida*.

A cada tempo, foram escolhidas aleatoriamente uma placa com colônias características de *Candida*, de um animal ovariectomizado e um controle, para obtenção de culturas puras, identificação e confirmação da espécie recuperada.

4.10 Identificação dos isolados

As cepas isoladas durante a pesquisa do gênero *Candida* (itens 4.2) e na recuperação de leveduras (item 4.9) foram identificadas de acordo com Samaranayake & MacFarlane¹⁰⁹ (1990) e Sandvén¹¹¹ (1990), realizando-se as seguintes provas:

4.10.1 Tubo germinativo

Uma alçada de cultura pura de 24 horas da levedura foi adicionada em tubo de ensaio (13 x 17mm), contendo 0,5mL de soro estéril de coelho. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por duas horas. A formação de tubo germinativo foi observada em microscópio de luz, colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula por período de até três horas.

4.10.2 Microcultivo

Foi utilizado o meio Corn Meal Ágar (Difco) adicionado de 1% de Tween 80. Para a execução da prova, o ágar previamente fundido foi distribuído em lâminas de vidro colocadas no interior de placas de Petri esterilizadas. Após solidificação do ágar, cada cepa de levedura a ser testada foi semeada em estria única na superfície do meio e foi colocada uma lamínula no centro da lâmina. Após incubação por 48 a 72 horas à temperatura ambiente, a leitura foi feita em microscópio óptico, observando-se presença de clamídoconídeos, leveduras e hifas.

4.10.3 Fermentação de carboidratos

Foi usado caldo vermelho de fenol (Difco) distribuído em tubos de ensaio, contendo tubos de Dühran em seu interior. Cada açúcar (glicose, maltose, sacarose e lactose), esterilizado por filtração (filtro Millipore, GSWP-02500), foi adicionado de forma a obter concentração de 1%. Os tubos foram semeados a partir da cultura pura de 24 horas da levedura em ágar Sabouraud dextrose. A leitura foi realizada após 48 horas e confirmada após uma semana, considerando-se a produção de ácido pela alteração de pH do meio (mudança da cor vermelha para

amarela) e a produção de gás pela formação de bolhas no interior dos tubos de Duhran.

4.10.4 Assimilação de carboidratos

Foi utilizado meio de cultura quimicamente definido (Anexo B). Para a execução da prova, foi preparada uma suspensão de levedura em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%), a partir da cultura pura de 24 horas em ágar Sabouraud dextrose. A concentração da suspensão foi correspondente ao tubo 10 da escala McFarland. Foi colocado 0,1mL desta suspensão em placa de Petri esterilizada. A seguir, o meio de cultura quimicamente definido, previamente liqüefeito à temperatura de 45°C, foi vertido na placa sobre a suspensão da levedura e agitado delicadamente (semeadura em *pour plate*).

Após solidificação do meio de cultura, discos de papel filtro, esterilizados e embebidos em solução de carboidratos a 10% (glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose e rafinose), foram colocados na superfície do meio. A leitura da prova foi realizada após o período de incubação de 48 horas a 37°C, através da observação da formação de halo de crescimento da levedura ao redor do açúcar assimilado.

4.10.5 Interpretação das provas

Os resultados obtidos nas provas realizadas foram interpretados conforme o Quadro 4:

Quadro 4- Classificação das espécies de *Candida* de acordo com a formação de tubo germinativo (TG), produção de clamidoconídeos (Clam) e hifas, fermentação e assimilação de carboidratos; baseado em SAMARANAYAKE & MACFARLANE¹⁰⁹ (1990) e SANDVÉN¹¹¹ (1990) com modificações

Espécies de <i>Candida</i>	TG	Clam	Hifas	Fermentação					Assimilação					
				GL	S	M	L	GA	GL	S	M	L	GA	R
<i>C. albicans</i>	+	+	+	A/G	A/-	A/G	-/-	A/G	+	+	+	-	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	V	V	+	A/G	A/-	A/G	-/-	A/G	+	-	+	-	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	-/-	A/G	+	+	+	-	+	+
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	A/G	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	+	A/G	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	-	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	-/-	A/G	+	+	+	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+	A/G	-/-	-/-	-/-	V	+	+	+	-	+	-
<i>C. tropicalis</i>	-	V	+	A/G	A/G	A/G	-/-	V	+	+	+	-	+	-
<i>C. kefyr</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	A/G	A/G	+	+	-	+	+	-

GL: glicose; S: sacarose; M: maltose; L: lactose; GA: galactose; R: rafinose

A: produção de ácido; G: produção de gás

(+): prova positiva; (-): prova negativa; V: prova variável

4.11 Caracterização dos isolados quanto à sensibilidade às toxinas *Killer*

As leveduras recuperadas da cavidade bucal das ratas (item 4.9) foram caracterizadas fenoticamente quanto à sensibilidade às toxinas *killer*, conforme metodologia proposta por Pollonelli et al.⁹⁹ (1983).

Os isolados de *Candida* a serem testados e as cepas produtoras de toxinas *killer* foram repicadas com 24 horas de antecedência, em ágar Sabouraud dextrose modificado (Anexo B). Cada cepa de *Candida* a ser observada, foi semeada em meio de cultura para verificação do fator *killer* (Anexo B) em *pour-plate*. A seguir, as leveduras produtoras de toxinas *killer* foram inoculadas por picada na superfície do meio e as placas foram incubadas por 72 horas à temperatura ambiente. As amostras foram testadas frente às cepas produtoras de toxinas *killer*, conforme pode ser observado no Quadro 5.

Quadro 5 - Cepas padrão produtoras de toxinas *killer*, origem das mesmas e seus respectivos códigos

Cepas Padrão	Coleção original	códigos
<i>Hansenula sp</i>	Stumn 1034	K ₁
<i>Pichia sp</i>	Stumn 1034	K ₂
<i>Hansenula anomala</i>	Um milano 3	K ₃
<i>Hansenula anomala</i>	CBS 5759	K ₄
<i>Hansenula anomala</i>	Ahearn UM 866	K ₅
<i>Hansenula californica</i>	Ahearn WC 40	K ₆
<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn WC 41	K ₇
<i>Hansenula dimennae</i>	Ahearn WC 44	K ₈
<i>Hansenula mrakii</i>	Ahearn WC 51	K ₉

Foram considerados sensíveis (positivos) os cultivos que produziram halo incolor ao redor das cepas padrão e resistentes

(negativos) os que apresentaram crescimento em torno das mesmas. Feita a leitura do teste para verificação do fator *killer*, os resultados da biotipagem foram designados através do esquema proposto por Pollonelli et al.⁹⁹ (1983), composto por três dígitos, cada um representando uma combinação dos resultados obtidos no *triplet* de três cepas (Quadro 6).

Quadro 6 - Modelo de biotipo *killer*⁹⁹

Atividade do 1° <i>triplet</i>				Atividade do 2° <i>triplet</i>				Atividade do 3° <i>triplet</i>			
k1	k2	k3	Código	k4	k5	k6	Código	k7	k8	k9	Código
+	+	+	1*	+	+	+	1*	+	+	+	1*
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	+	8	-	-	+	8	-	-	+	8

* Exemplo: Biotipo 111

4.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no Programa Minitab, considerado-se nível de significância de 5%.

Em relação ao controle de peso (%), dosagens de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml), e recuperação de *C. albicans* (log ufc/mL), as médias dos grupos controle e ovariectomizado foram comparadas pelo teste *t* de *Student*. Para comparação entre os escores dos grupos controle e ovariectomizado, obtidos na análise histológica da colonização do epitélio por *Candida*, foi aplicado o teste de *Mann-Whitney*.

5 RESULTADOS

5.1 Colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal das ratas

Entre as 137 ratas analisadas no início desse estudo (item 4.2), 13 (9,48%) apresentaram leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal e não foram utilizadas nos demais experimentos do presente trabalho.

Em relação à identificação dos isolados, ocorreu predominância de *C. guilliermondii* (44,44%) e *C. lusitaniae* (38,88%). As demais espécies encontradas foram: *C. tropicalis* (5,55%), *C. krusei* (5,55%) e *C. glabrata* (5,55%).

Após 28 dias da cirurgia de ovariectomia, foi realizada uma nova coleta de saliva da cavidade bucal das ratas (item 4.7) e verificou-se que os animais continuaram revelando resultados negativos para leveduras.

5.2 Peso corporal das ratas controles e ovariectomizadas

As médias e os desvios-padrão dos valores de peso corporal das ratas pertencentes aos grupos controle e ovariectomizado (Apêndice A) estão representados na Figura 3.

A média e o desvio-padrão do percentual de aumento de peso após 28 dias da ovariectomia foi de $11,59 \pm 3,86\%$ para as ratas controle e $20,36 \pm 3,02\%$ para as ratas ovariectomizadas, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Teste *t* de Student, $\alpha = 5\%$, $p = 0,000$).

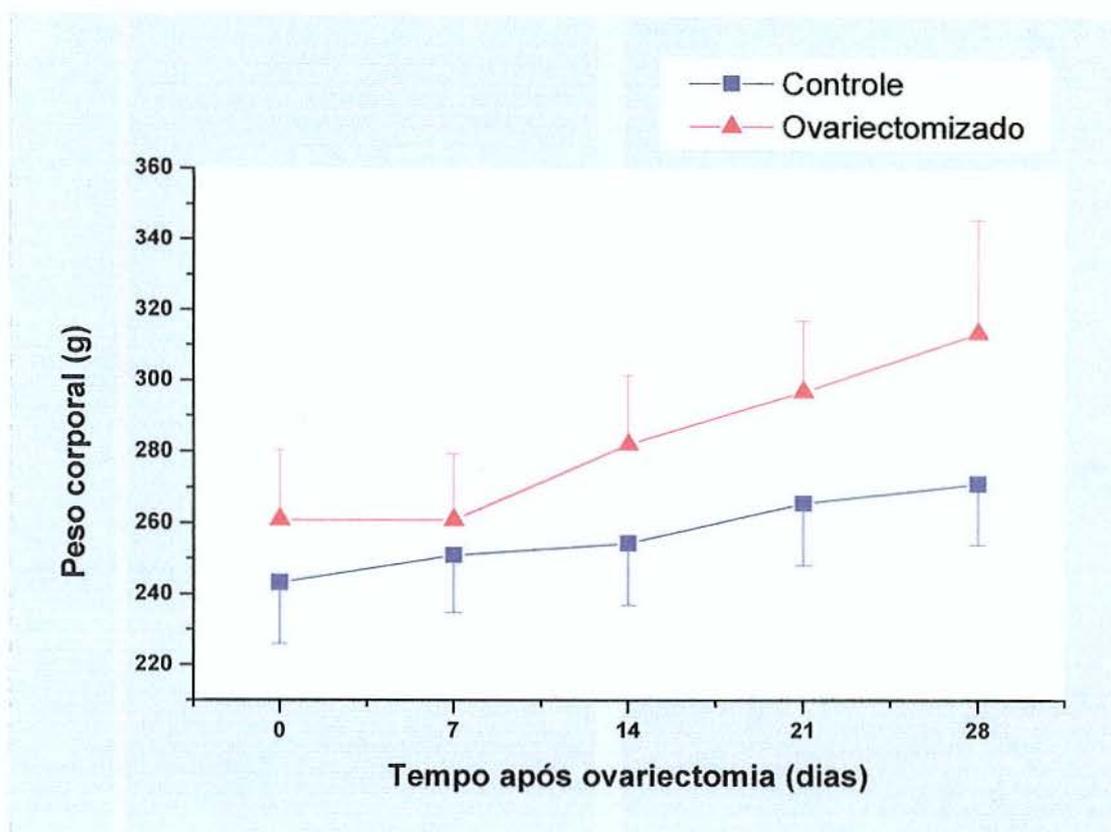


FIGURA 3 - Médias e desvios-padrão do peso corporal das ratas pertencentes aos grupos controle e ovariectomizado, no dia da ovariectomia (dia 0) e nos dias sete, 14, 21 e 28 após essa cirurgia.

5.3 Dosagem de estrógeno e progesterona

Os resultados obtidos na dosagem de estradiol e progesterona (Apêndice B) nos animais dos grupos controle e ovariectomizado estão demonstrados nas Figuras 4 e 5. A média dos níveis plasmáticos de estradiol e progesterona foi maior no grupo controle em relação ao ovariectomizado, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

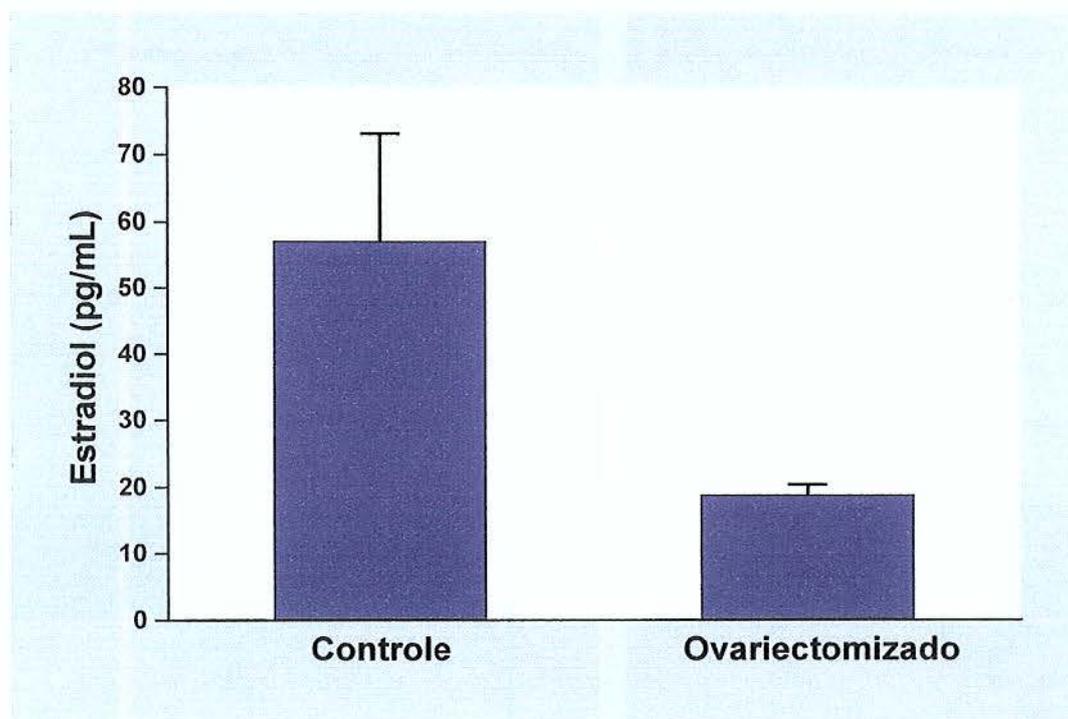


FIGURA 4 - Médias e desvios-padrão dos níveis plasmáticos de estradiol para os grupos controle e ovariectomizado. Diferença estatisticamente significativa (Teste *t* de Student; $\alpha = 5\%$, $p = 0,0003$).

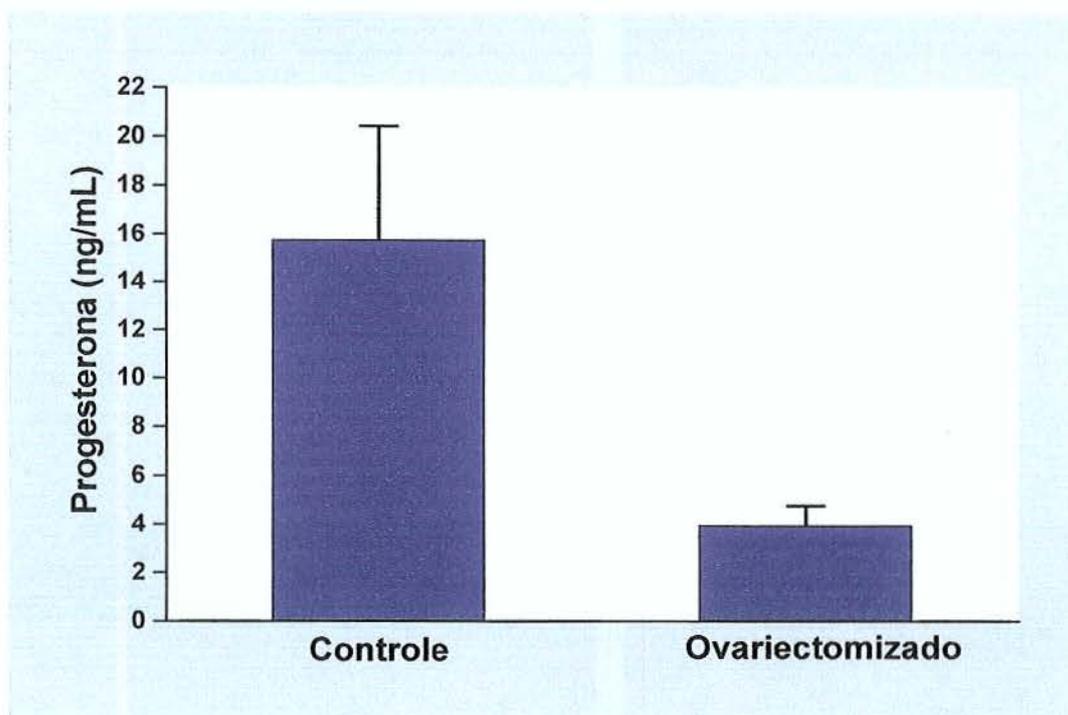


FIGURA 5 - Médias e desvios-padrão dos níveis plasmáticos de progesterona para os grupos controle e ovariectomizado. Diferença estatisticamente significativa (Teste *t* de Student; $\alpha = 5\%$, $p = 0,0002$).

5.4 Morfologia do dorso da língua de ratas não infectadas por *C. albicans*

Na análise macroscópica, na microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura das oito ratas não infectadas por *C. albicans*, observou-se que as línguas do grupo ovariectomizado apresentaram aspecto de normalidade semelhante ao controle.

A língua da rata é um órgão muscular revestido por epitélio queratinizado, formado de uma região superior, o dorso, e uma inferior, o ventre. O dorso apresenta uma porção bucal, que se estende da extremidade anterior da língua até a papila valada, e uma porção faríngea, localizada posteriormente a essa papila. A porção bucal divide-se em duas partes: os dois terços anteriores que possuem sulco mediano

no sentido sagital, e o tubérculo intermolar, que corresponde ao terço posterior (Figura 6).

O dorso da língua é revestido por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, formando interdigitações com o conjuntivo subjacente. Na porção bucal, estão presentes as papilas filiformes e fungiformes. As papilas filiformes são classificadas em cônicas simples, localizadas nos dois terços anteriores; verdadeiras, no tubérculo intermolar; e gigantes, na região que separa as cônicas simples das verdadeiras (Figuras 7 e 12). As papilas fungiformes estão presentes em menor número nos dois terços anteriores, entre as papilas cônicas simples.

As papilas cônicas simples são curtas, exibem base larga e estão distantes umas das outras, com bastante superfície interpapilar (Figuras 8 e 13). Ao contrário, as papilas verdadeiras são mais alongadas, apresentam base mais estreita e estão próximas umas das outras, com pouca superfície interpapilar (Figuras 9 e 14). As papilas gigantes são maiores e mais visíveis do que as outras papilas filiformes (Figuras 10 e 15). As papilas fungiformes são curtas e largas, apresentam base arredondada e corpúsculo gustativo no epitélio da superfície superior (Figura 11).

As papilas filiformes apresentam duas superfícies: anterior, que é convexa nas papilas cônicas simples e verdadeiras, porém côncava nas gigantes; e posterior, que é côncava nas cônicas simples e verdadeiras, e convexa nas gigantes (Figuras 7 e 12). A colonização de bactérias no dorso da língua ocorre na superfície convexa das papilas filiformes, geralmente não ocorrendo nas superfícies côncavas, regiões interpapilares e papilas fungiformes. As bactérias apresentam-se predominantemente na forma de cocos e em maior quantidade nas papilas verdadeiras.

O ventre da língua é revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e conjuntivo rico em vasos sangüíneos e

linfáticos. O epitélio forma poucas interdigitações com o tecido conjuntivo e a camada de queratina é plana e sem evidências de acúmulo de bactérias aderidas à superfície.

Abaixo do conjuntivo subepitelial, a língua é formada por músculo estriado, cujas fibras se encontram agrupadas em feixes dispostos em três planos. Entre as fibras musculares da região posterior, são encontradas glândulas salivares serosas e mucosas.

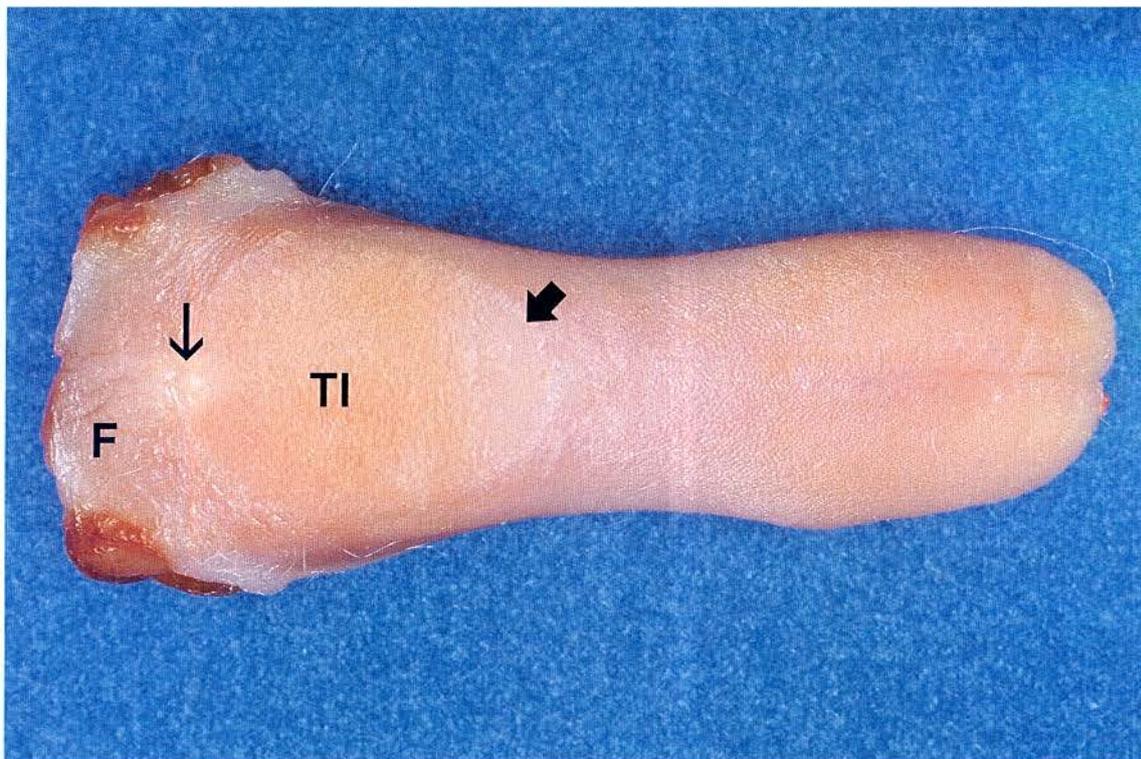


FIGURA 6 - Aspecto macroscópico do dorso da língua de rata do grupo controle. A papila valada (→) separa a porção faríngea da língua (F) da região bucal. As papilas gigantes (➡), separam os dois terços anteriores da língua do tubérculo intermolar (TI).

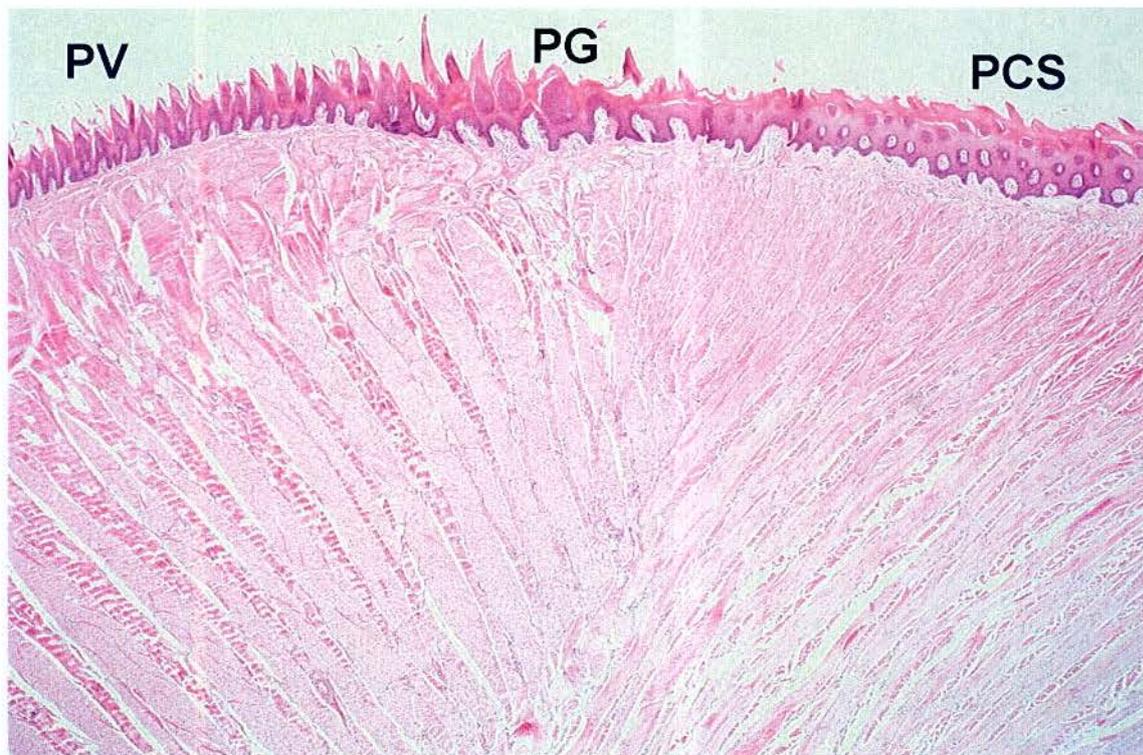


FIGURA 7 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle. A porção bucal apresenta papilas filiformes, denominadas cônicas simples (PCS) na região anterior, gigantes (PG) e verdadeiras (PV) na região posterior. Abaixo do epitélio, observam-se a lâmina própria e as fibras musculares estriadas. HE; aumento original: 25X.

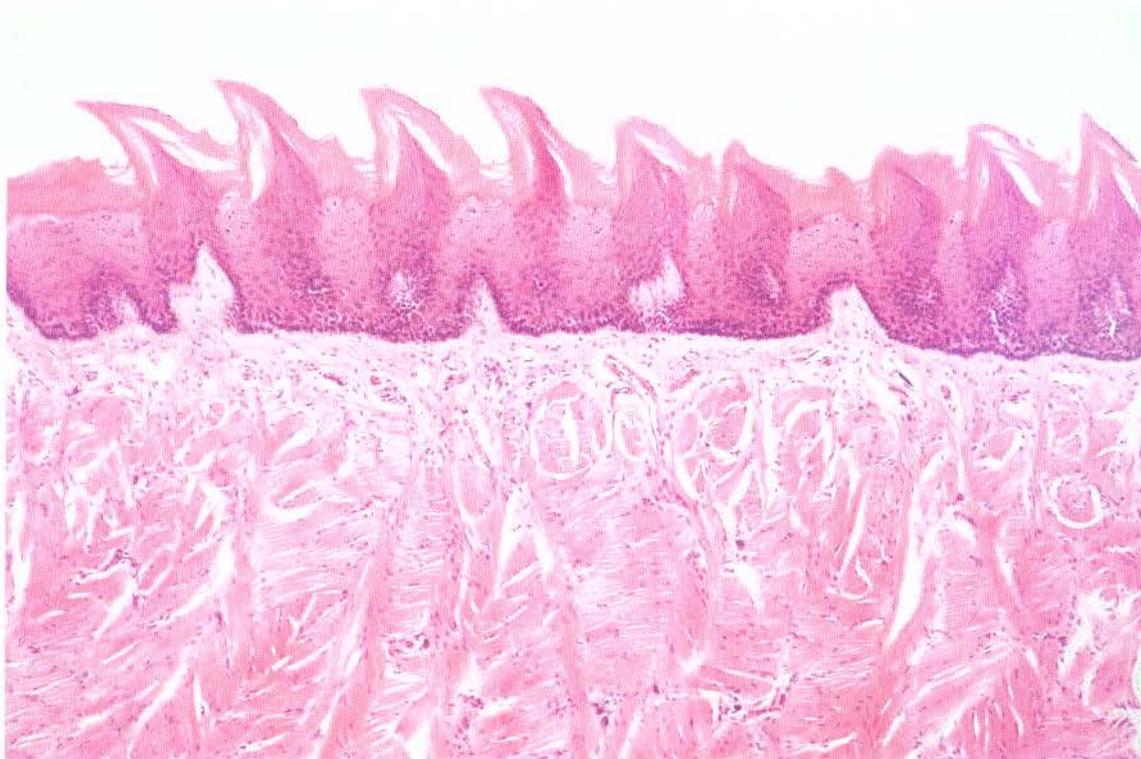


FIGURA 8 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado. As papilas cônicas simples exibem superfície anterior convexa. HE; aumento original 100X.

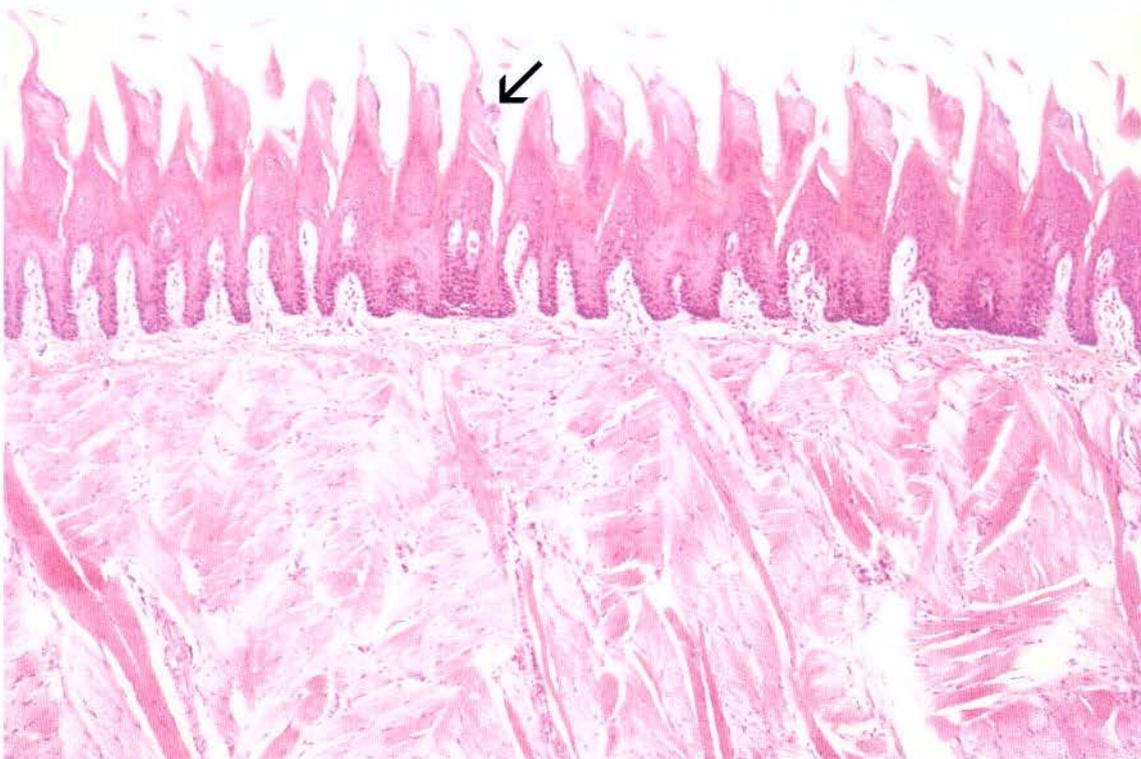


FIGURA 9 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle na região de papilas verdadeiras. Verifica-se a presença de bactérias (→) aderidas à superfície anterior (convexa) das papilas. HE; aumento original 100X.

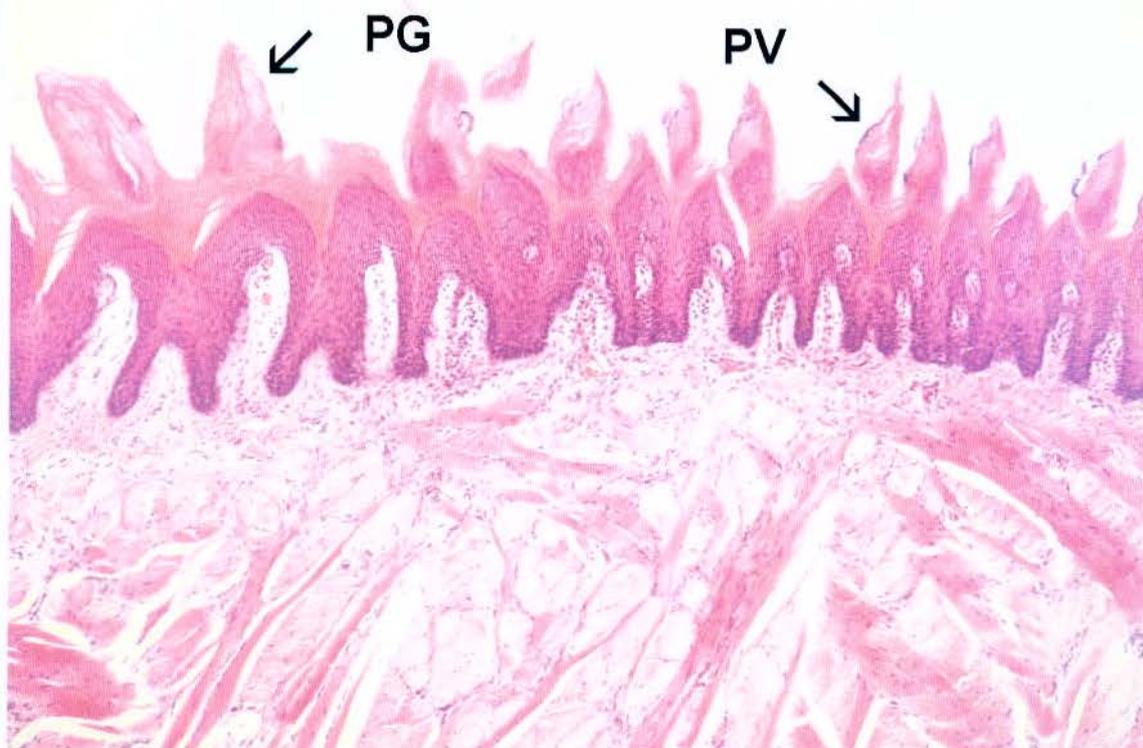


FIGURA 10 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle nas regiões de papilas gigantes (PG) e verdadeiras (PV). Bactérias (→) estão aderidas à superfície posterior (convexa) das papilas gigantes e superfície anterior (convexa) das papilas verdadeiras. HE; aumento original 100X.



FIGURA 11 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, observando-se papila fungiforme com corpúsculo gustativo (→). HE; aumento original 400X.

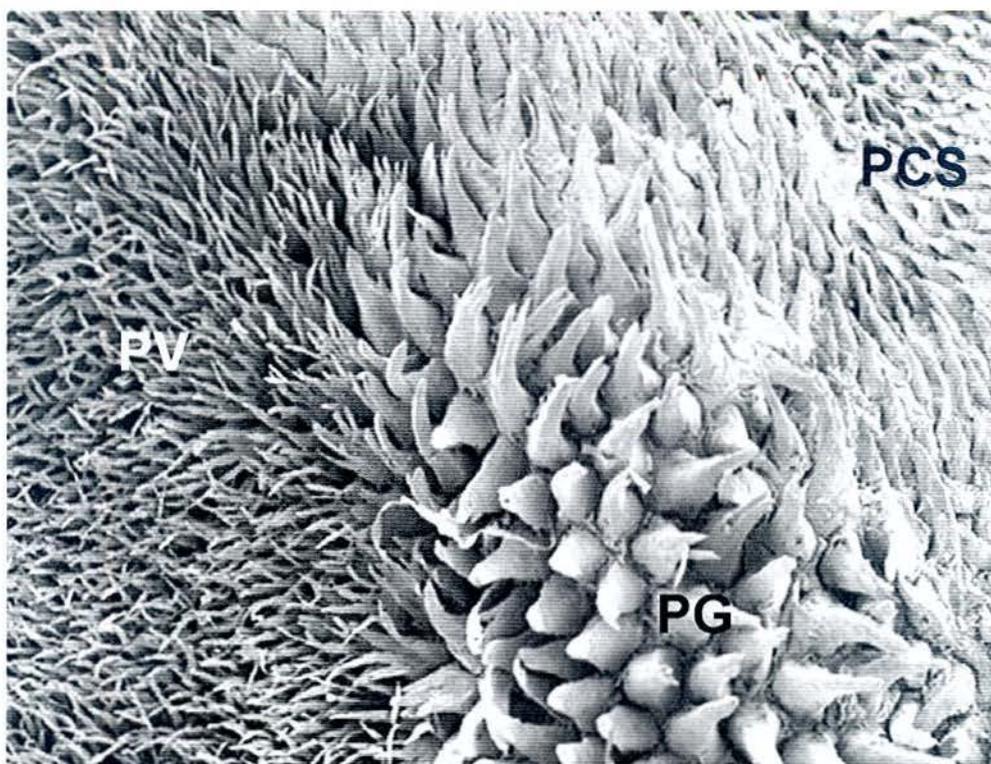


FIGURA 12 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle. As papilas cônicas simples (PCS) e verdadeiras (PV) apresentam inclinação para posterior e as gigantes (PG) para anterior. Aumento original: 75X.

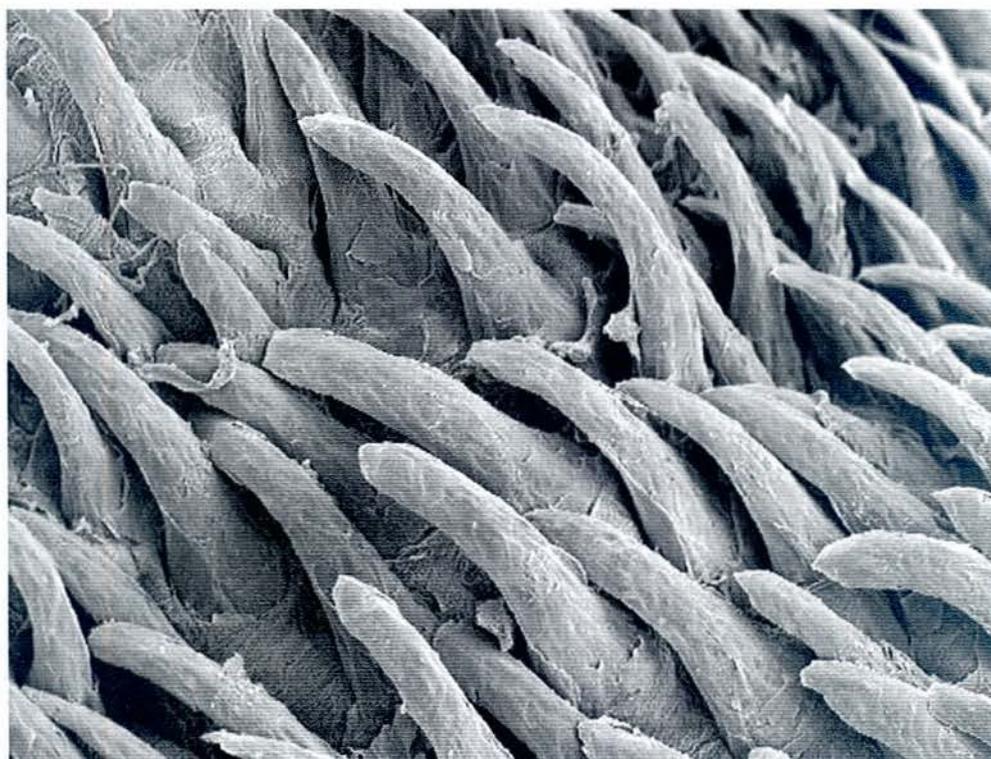


FIGURA 13 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle. As papilas cônicas simples possuem inclinação para posterior, determinando superfície anterior convexa e posterior côncava. Aumento original: 180X.

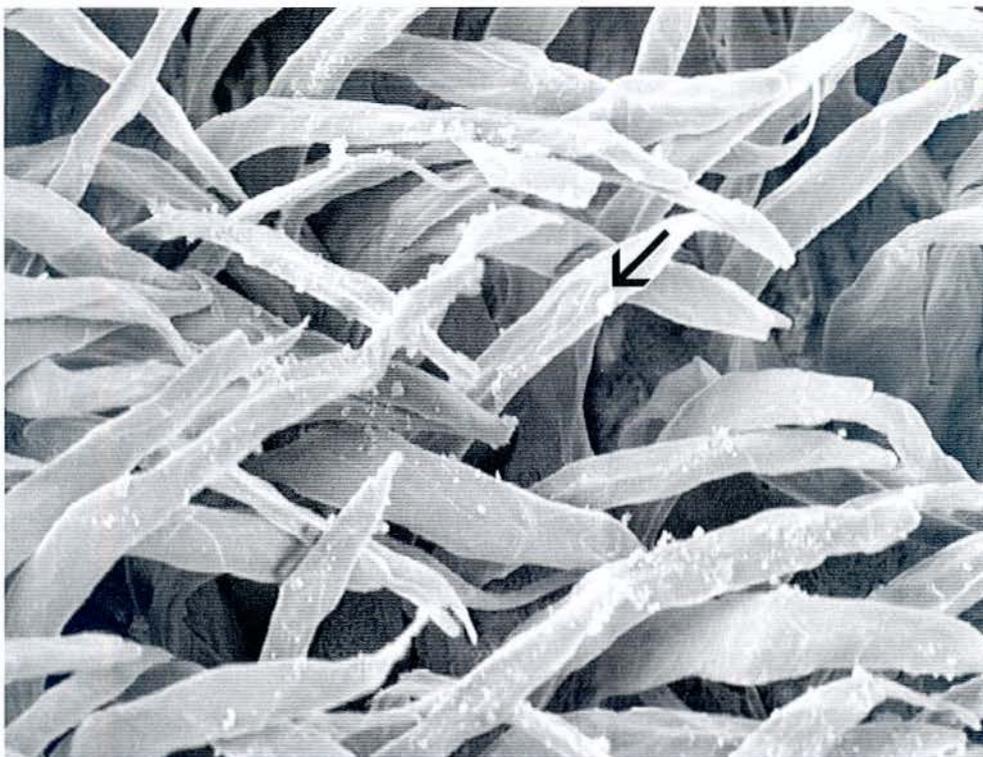


FIGURA 14 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle na região de papilas verdadeiras. Bactérias (→) estão aderidas à superfície anterior (convexa) dessas papilas. Aumento original: 500X.

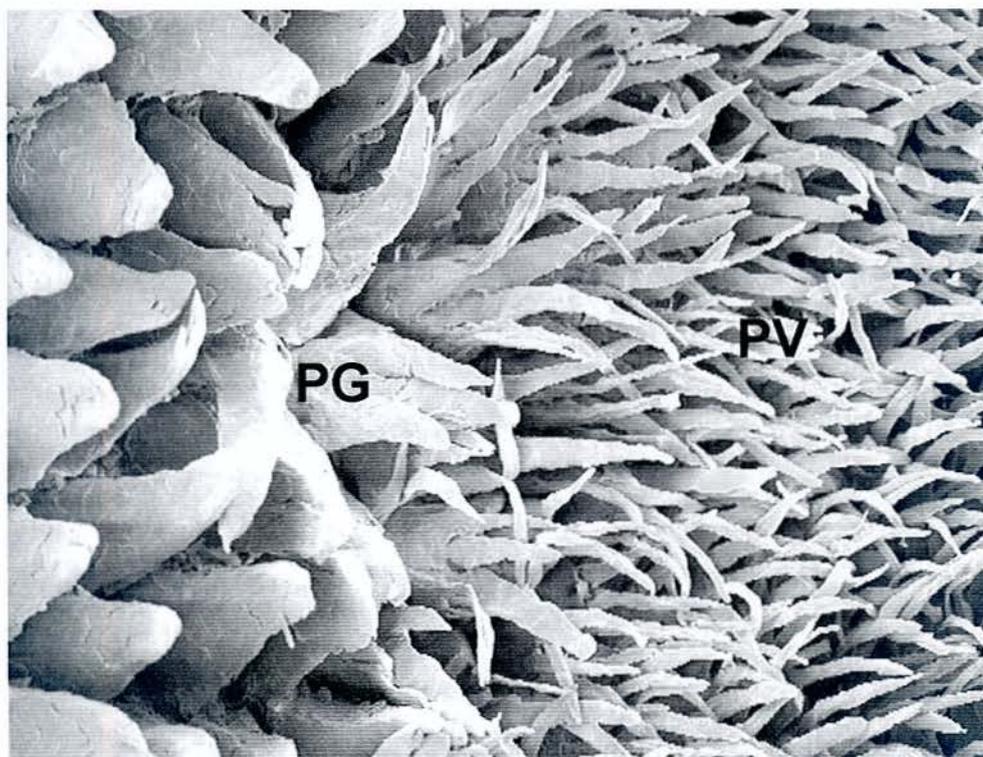


FIGURA 15 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata controle nas regiões de papilas gigantes (PG) e papilas verdadeiras (PV). Aumento original: 130X.

5.5 Candidose experimental

5.5.1 Análise macroscópica

Entre as 96 ratas infectadas com *C. albicans* para o estudo da candidose experimental, verificou-se a presença de lesões clínicas na língua dos animais controles e ovariectomizados após sete e 15 dias da inoculação de *C. albicans* (Tabela 1).

Tabela 1 - Número (n) e percentual (%) de ratas que apresentaram lesões clínicas no dorso da língua entre as 96 examinadas

Períodos de Sacrício*	Controles		Ovariectomizadas	
	n	%	n	%
6 horas	0	0	0	0
24 horas	0	0	0	0
7 dias	8	66,66	5	41,60
15 dias	9	75,00	4	33,00

* n = 12 para cada período de sacrifício

As lesões clínicas de candidose foram caracterizadas por áreas de atrofia papilar, geralmente bem delimitadas e localizadas na região de papilas cônicas simples, próxima às papilas gigantes (Figuras 16 e 17). Duas ratas controle exibiram um sulco transversal na área da lesão.

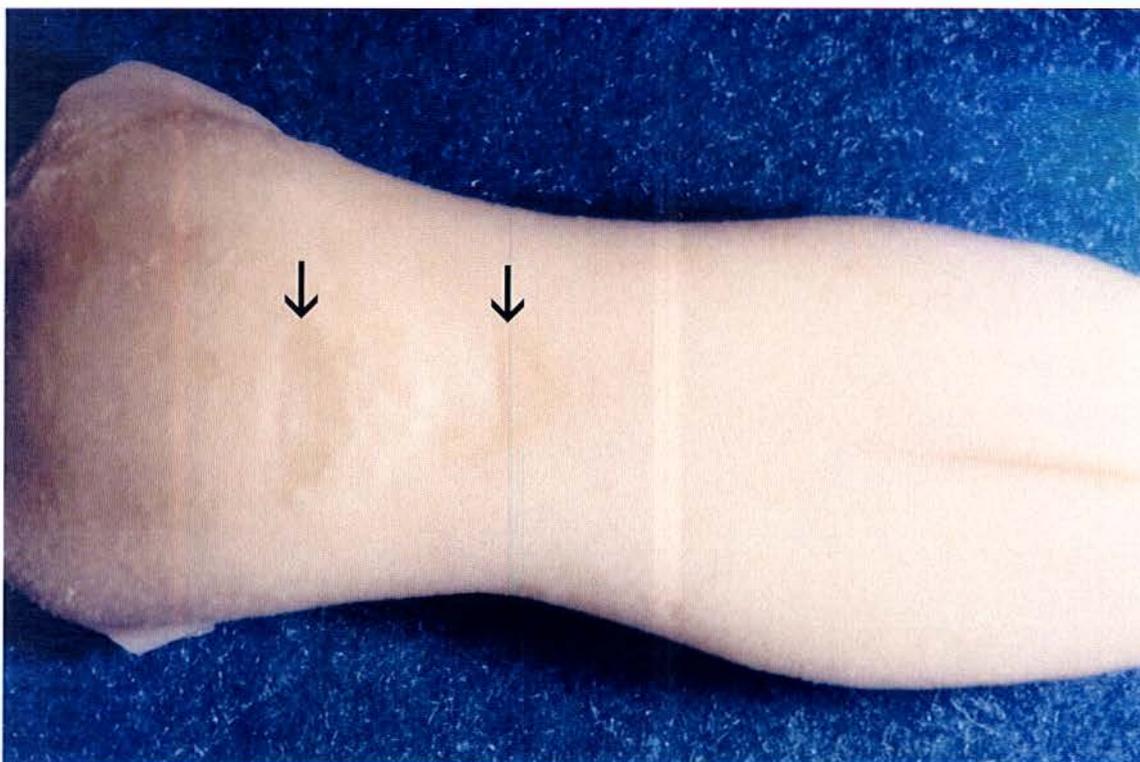


FIGURA 16 - Aspecto macroscópico do dorso da língua de rata controle, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Verificam-se áreas de atrofia papilar (→). Aumento original: 6,5X.

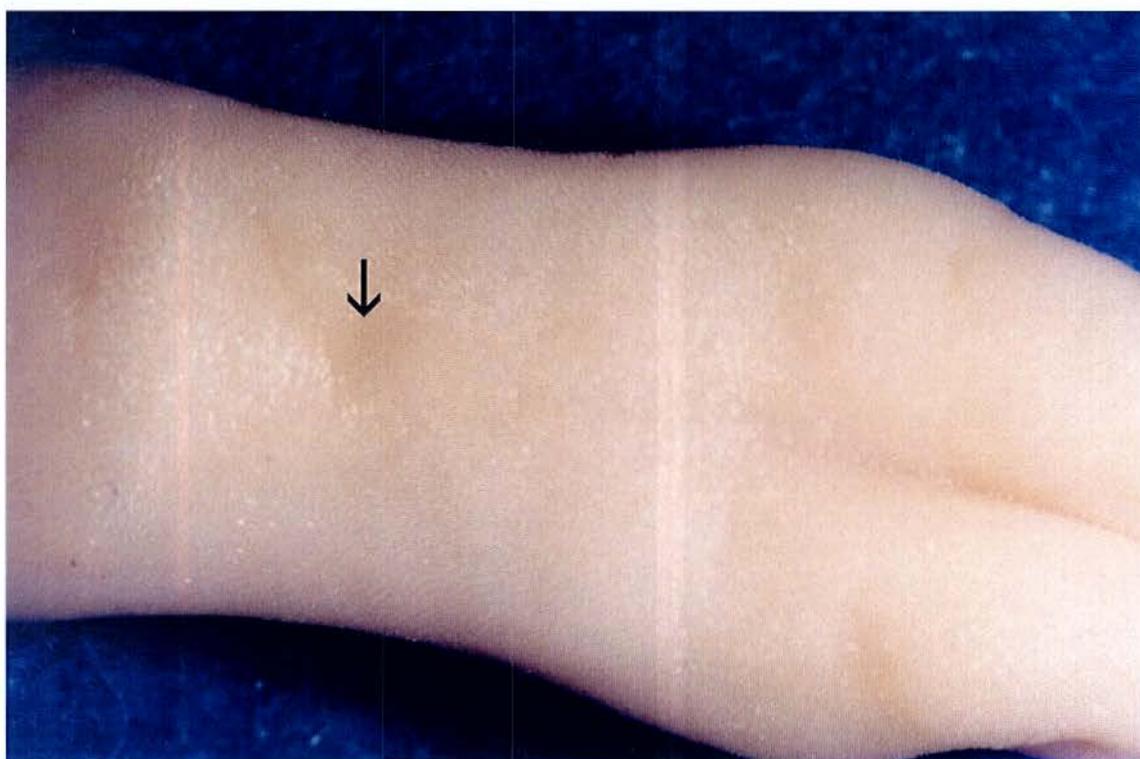


FIGURA 17 - Aspecto macroscópico do dorso da língua de rata ovariectomizada, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Nota-se região de atrofia papilar (→). Aumento original: 8,0X.

5.5.2 Microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura

Após seis horas da inoculação de *C. albicans*, a análise de microscopia óptica mostrou a presença de candidose em todas as ratas controle e em nove ratas ovariectomizadas.

As lesões de candidose eram constituídas por quantidades variáveis de leveduras e hifas no interior da queratina. Essas lesões estavam presentes em diversas regiões do dorso da língua, mas ocorreram predominantemente nas papilas cônicas simples. As lesões ora eram bem localizadas e envolviam apenas uma ou duas papilas filiformes; ora eram mais difusas, atingindo várias papilas. Por vezes, as demais camadas do epitélio e a lâmina própria apresentavam-se normais, porém quando havia maior quantidade de *Candida*, notavam-se vários leucócitos polimorfonucleares nas camadas espinhosa e basal, inclusive formando microabscessos intra-epiteliais (Figuras 18 - 21). Nesses casos, a lâmina própria também apresentava infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear.

Nestas lesões, observaram-se ainda áreas de desorganização epitelial com perda de estratificação. A lâmina própria exibia numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestos.

As ratas controle apresentaram áreas de candidose mais difusas no dorso da língua e maior colonização por leveduras e hifas no epitélio, em relação às ratas ovariectomizadas.

Na análise em microscopia eletrônica de varredura, o dorso da língua apresentou aspecto de normalidade quando observado em pequenos aumentos. Em maiores aumentos, era possível observar a presença de bactérias e leveduras aderidas às papilas filiformes, principalmente nas superfícies anteriores (Figura 22). Em regiões com grande quantidade de leveduras, as papilas filiformes apresentavam-se recobertas por biofilme (Figura 23). Neste período de observação, nenhuma hifa foi encontrada no dorso da língua.

A quantidade de leveduras encontradas no dorso da língua foi maior no grupo controle em relação ao ovariectomizado.

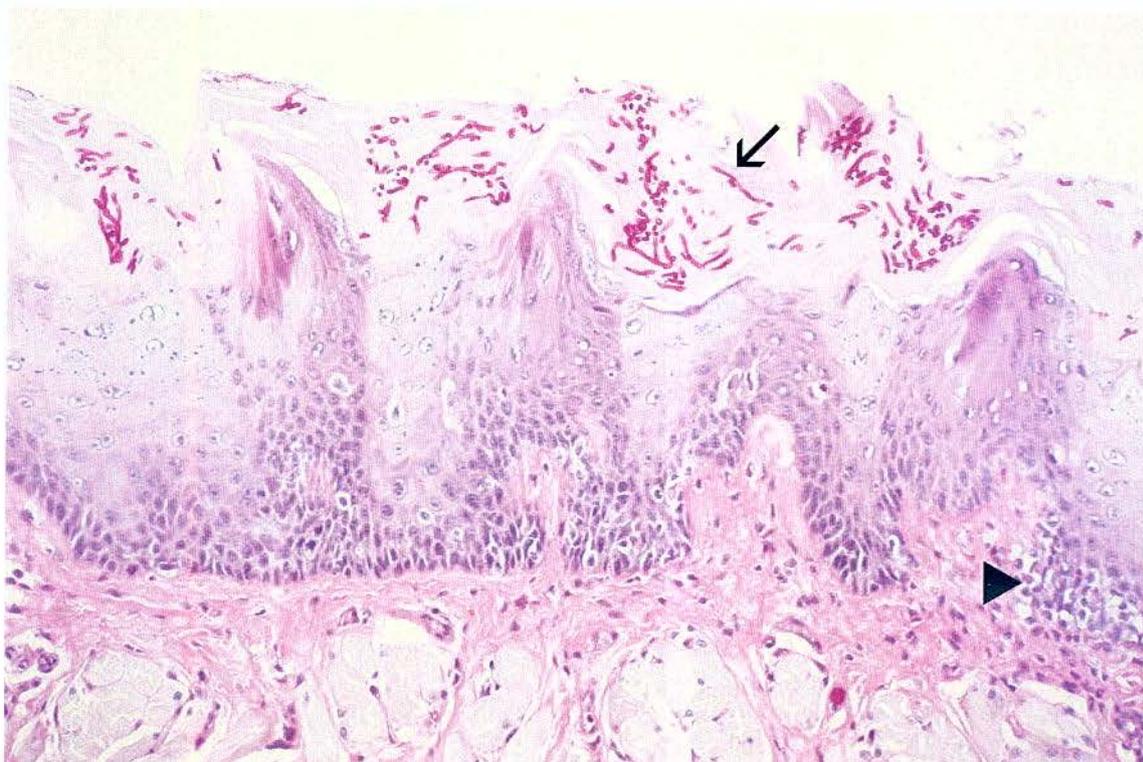


FIGURA 18 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Observa-se intensa proliferação de leveduras e hifas (→) na queratina. O epitélio demonstra áreas com duplicação da camada basal e exocitose (▴). PAS; aumento original 200X.

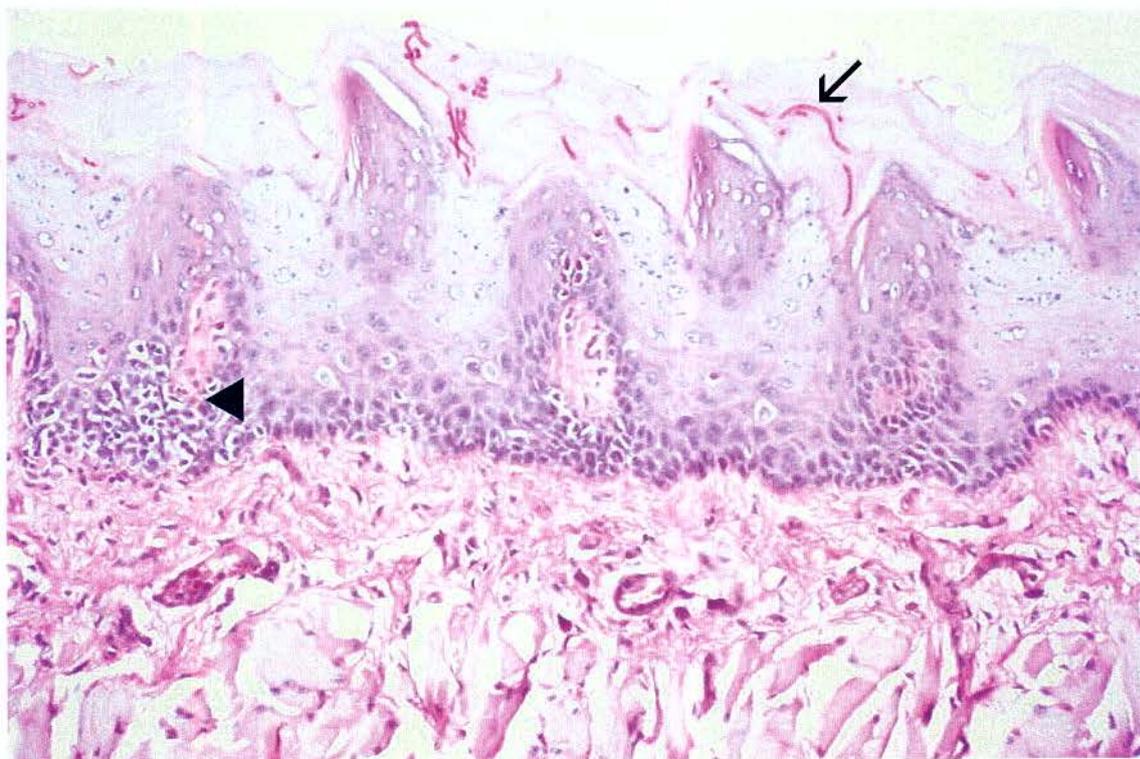


FIGURA 19 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Verifica-se a presença de hifas (→) na queratina e células inflamatórias na camada basal do epitélio (▴). PAS; aumento original 200X.

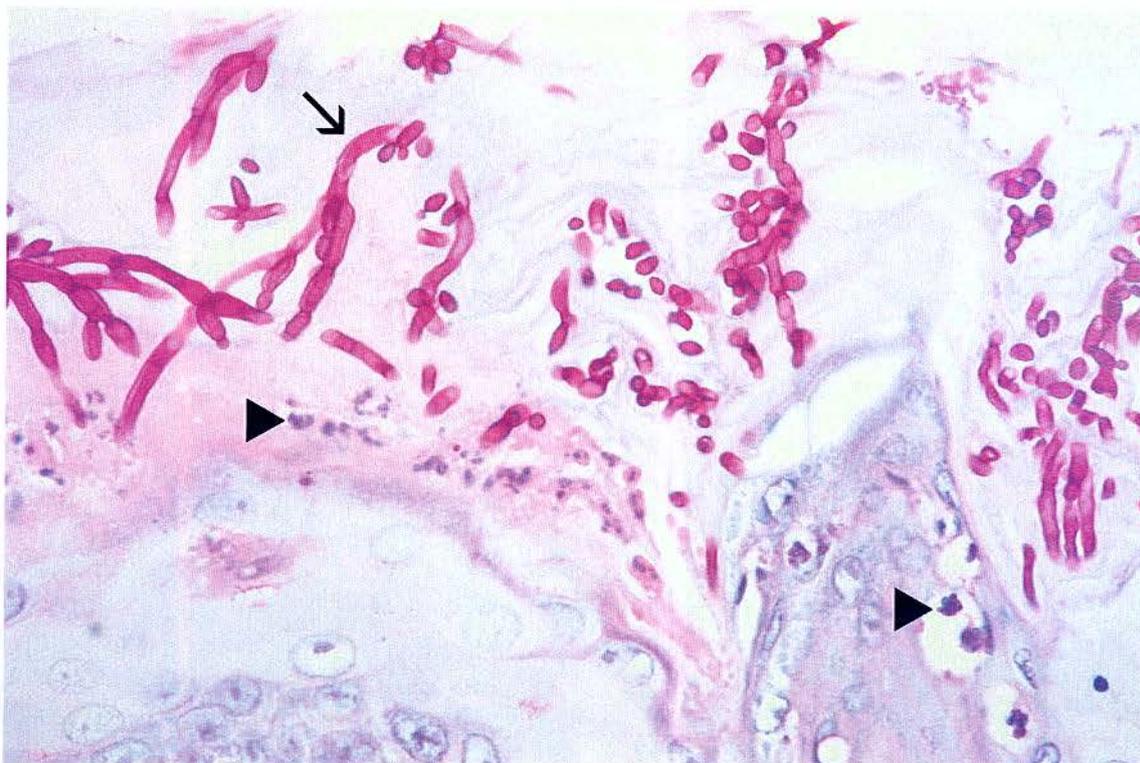


FIGURA 20 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Presença de leveduras e hifas na queratina (→) e exocitose neutrofílica (▴). PAS; aumento original 630X.

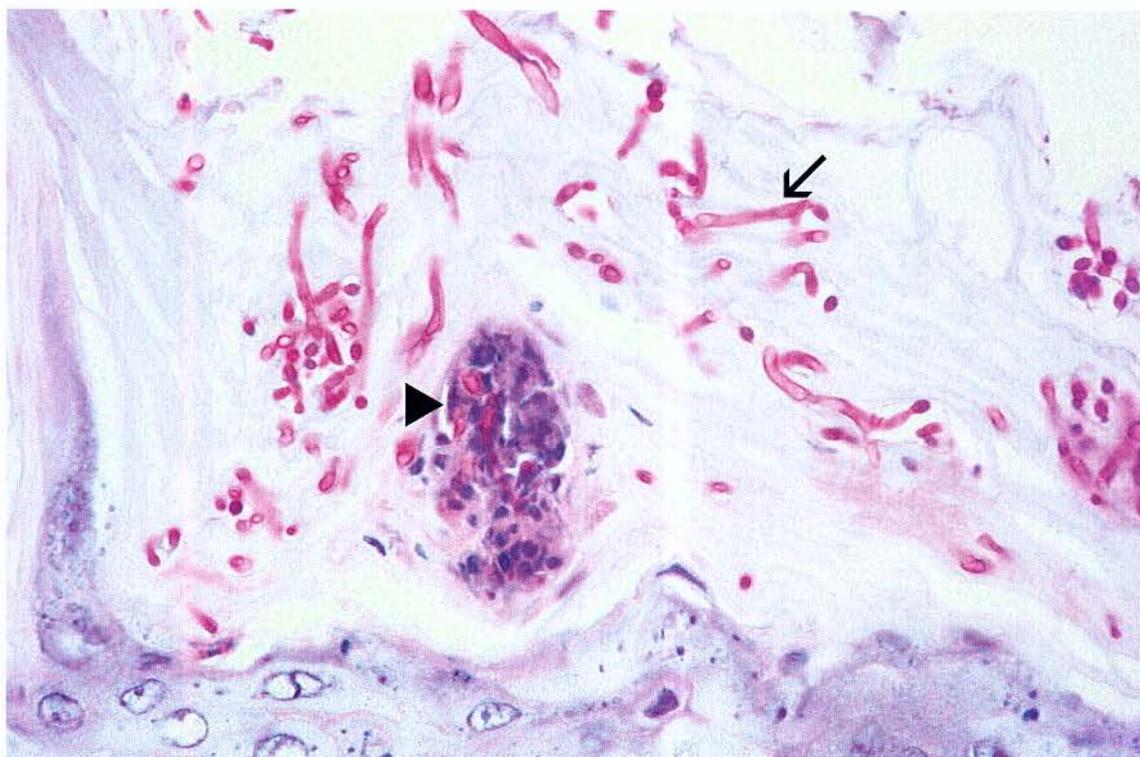


FIGURA 21 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Nota-se grande quantidade de hifas (→) e microabscesso intra-epitelial (▴). PAS; aumento original 630X.



FIGURA 22 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se leveduras (→) e biofilme bucal entre as papilas cônicas simples. Aumento original: 600X.

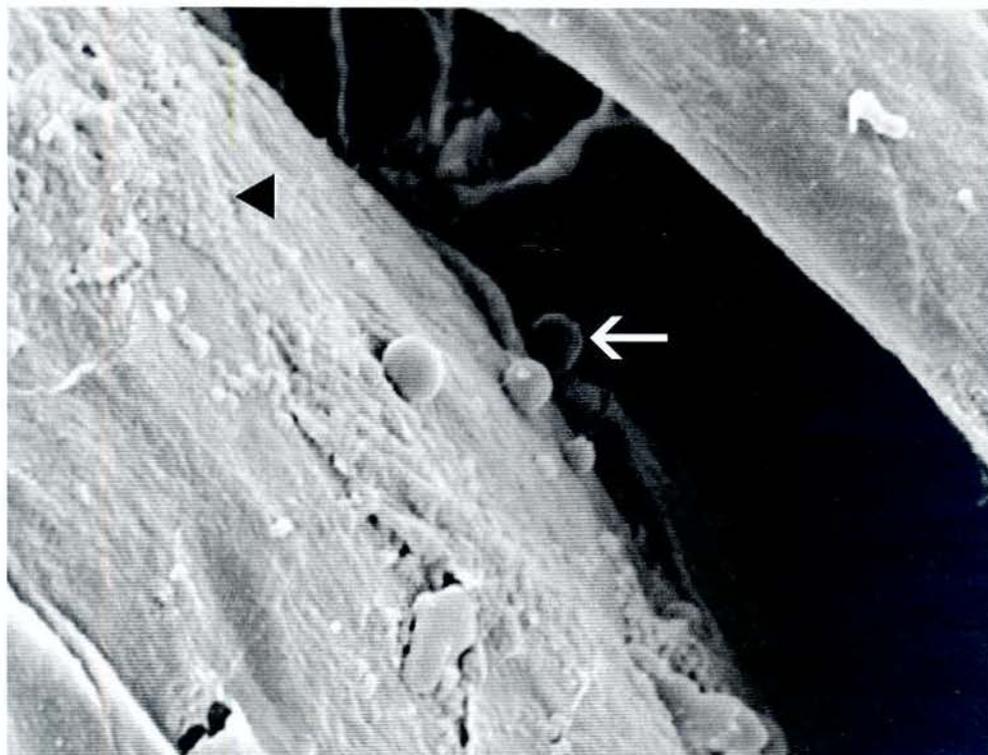


FIGURA 23 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, seis horas após a inoculação de *C. albicans*. Leveduras (→) e bactérias (►) estão aderidas à superfície anterior das papilas cônicas simples. Aumento original: 1900X.

Decorridas 24 horas da inoculação de *C. albicans*, observou-se em microscopia óptica a presença de candidose em todos os animais dos grupos controles e ovariectomizados.

A candidose era constituída por intensa proliferação de hifas na camada de queratina, que se apresentaram bem mais alongadas do que no período de observação de seis horas. Nas áreas de candidose, observaram-se diversos leucócitos polimorfonucleares nas camadas basal e espinhosa do tecido epitelial e no tecido conjuntivo subjacente. O epitélio apresentou degeneração hidrópica em toda a extensão e espongirose, principalmente, nas camadas basal e parabasal. Em algumas áreas, havia descamação da queratina com aglomerados de hifas e células inflamatórias (Figuras 24 - 27).

As lesões de candidose eram mais distribuídas no dorso da língua em relação ao período de observação de seis horas. No grupo controle, essas lesões eram mais intensas do que no grupo ovariectomizado.

Na análise de microscopia eletrônica de varredura, nenhuma alteração morfológica do dorso da língua foi observada em pequenos aumentos. Entretanto, em maiores aumentos foram encontradas leveduras e grandes quantidades de hifas entre as papilas filiformes (Figura 28).

Em algumas regiões, as hifas estavam localizadas perpendicularmente ao tecido e pareciam penetrar no seu interior. Além disso, nas áreas com intensa proliferação de hifas, havia degradação tecidual (Figura 29) e descamação celular das papilas filiformes (Figura 30).

No grupo controle, as hifas foram encontradas em diversas áreas da língua e envolviam várias papilas filiformes (Figura 31). Entretanto, no grupo ovariectomizado, a presença de *Candida* foi observada apenas em algumas regiões.

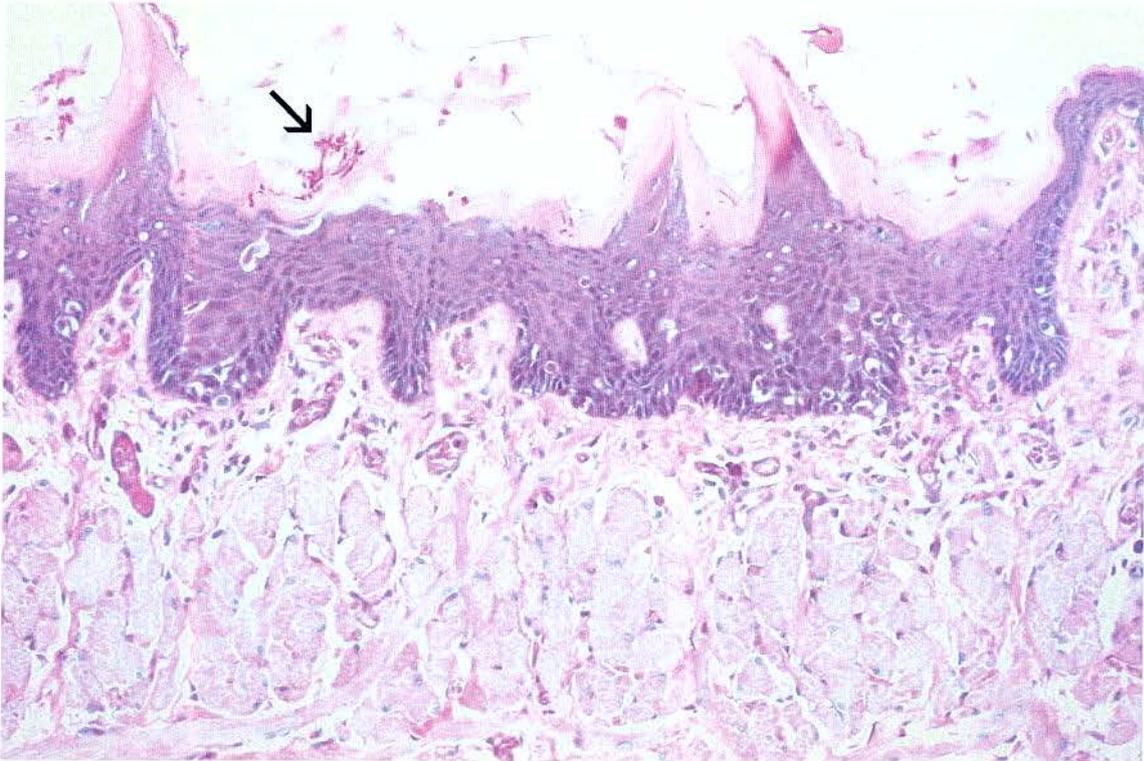


FIGURA 24 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Leveduras e hifas estão na queratina, que parece estar se descamando da superfície (→). PAS; aumento original 200X.

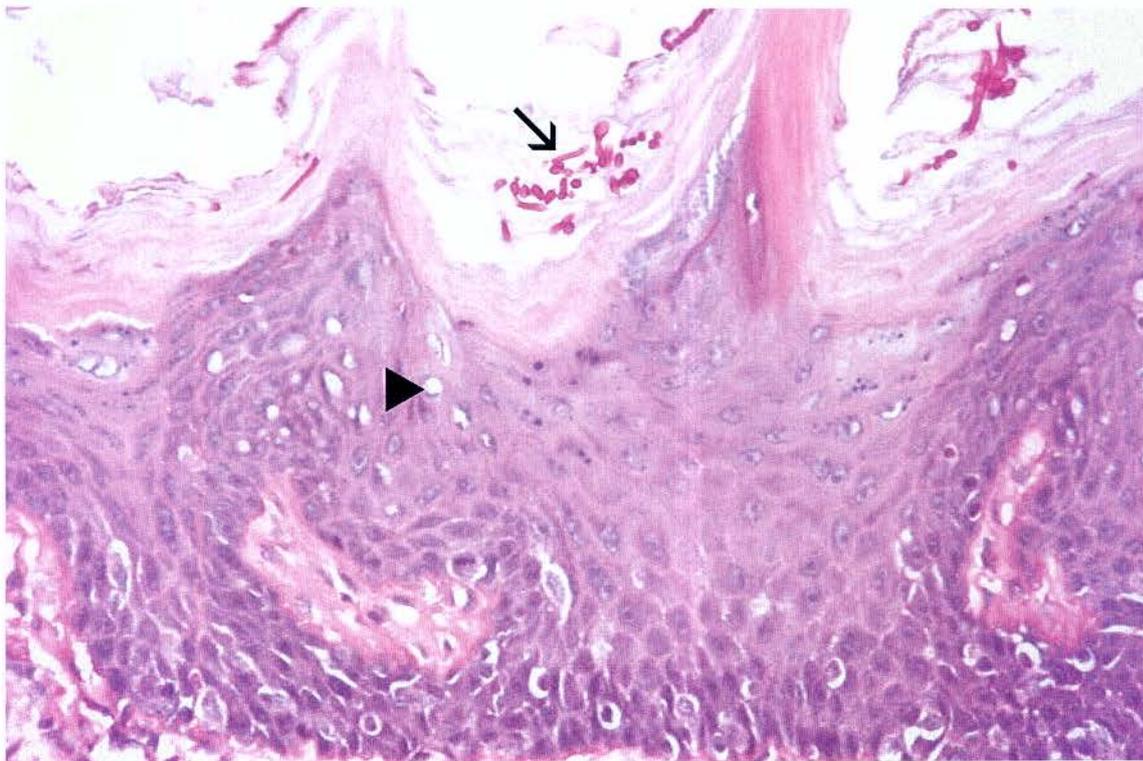


FIGURA 25 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se leveduras e hifas na queratina (→) e células com degeneração hidrópica nas outras camadas do epitélio (▴). PAS; aumento original 400X.

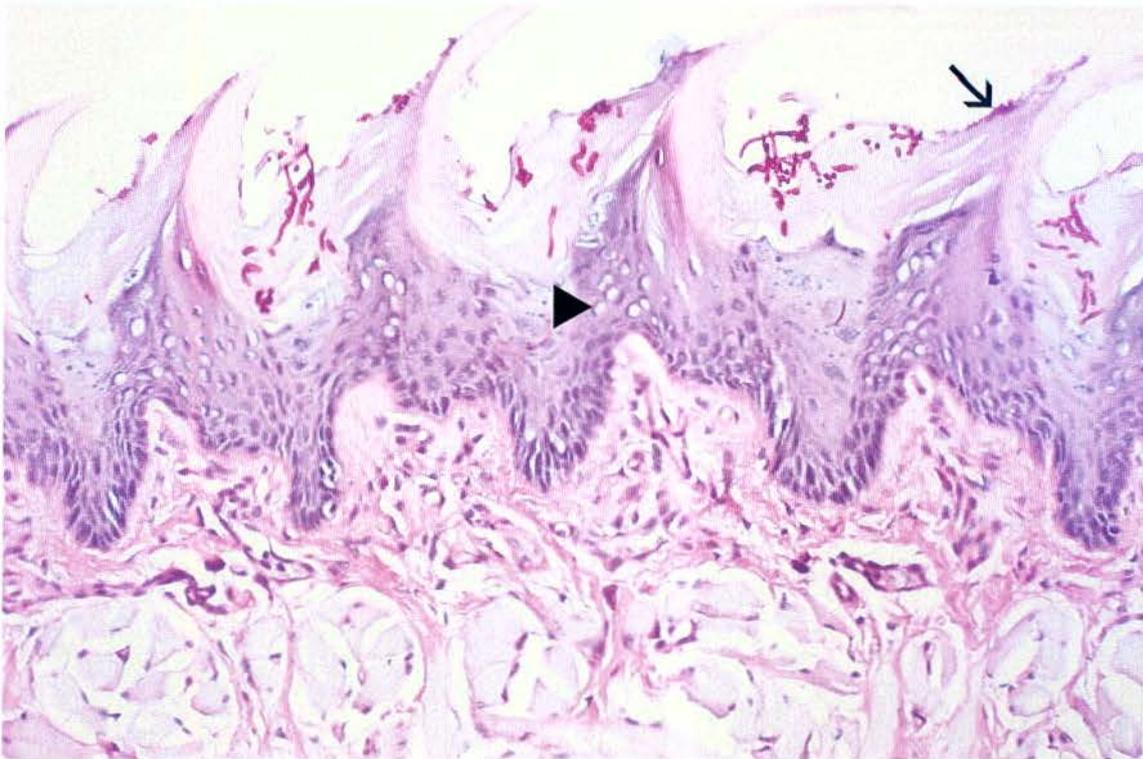


FIGURA 26 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Verifica-se a presença de bactérias (→) aderidas à superfície anterior (convexa) das papilas cônicas simples, leveduras e hifas na queratina e degeneração hidrópica no epitélio (▶). PAS; aumento original 200X.

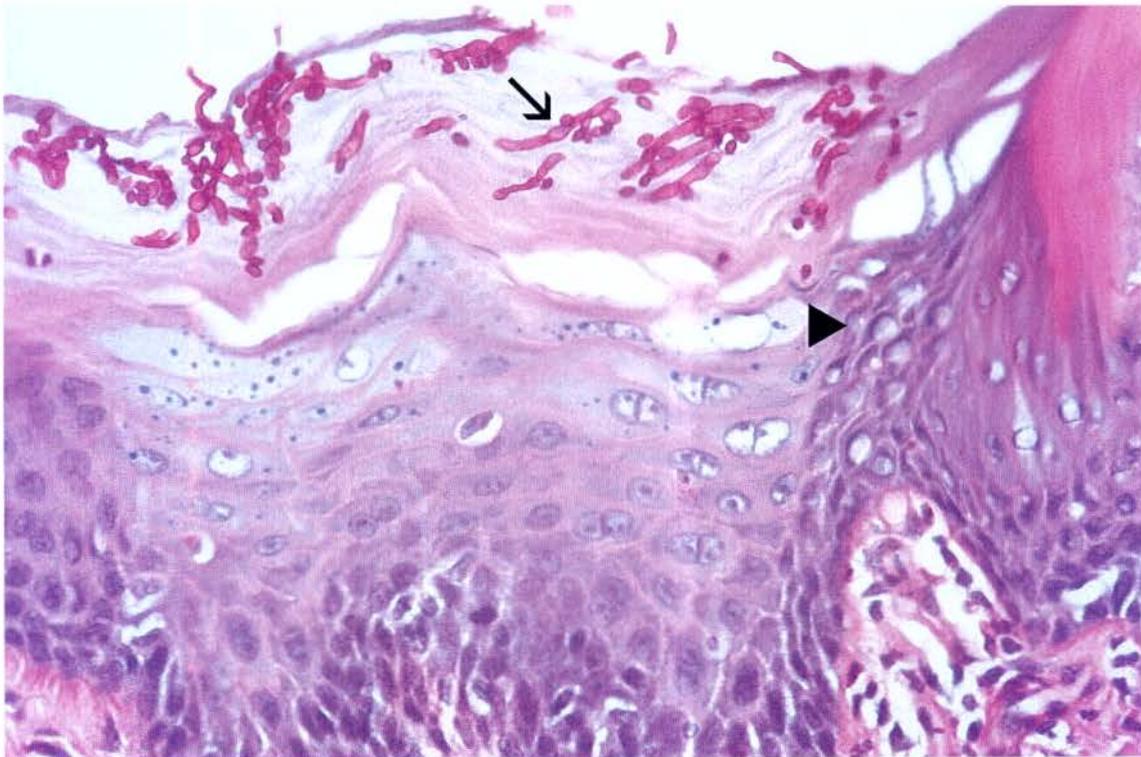


FIGURA 27 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Leveduras e hifas penetram na queratina (→) e o epitélio apresenta degeneração hidrópica (▶). PAS; aumento original 400X.



FIGURA 28 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Verificam-se hifas (→), descamação celular (▶) e degradação tecidual (◆). Aumento original: 1000X.



FIGURA 29 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se hifas (→) e degradação tecidual. Aumento original: 2500X.

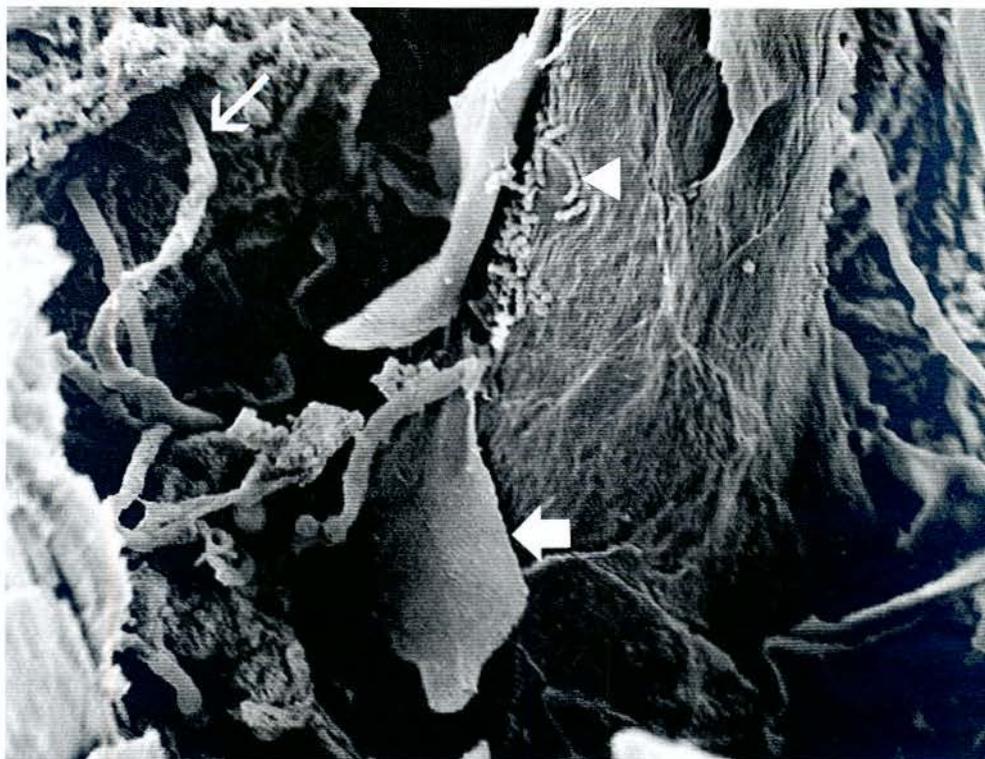


FIGURA 30 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Nota-se a presença de hifas (→), descamação celular (⇨) e bactérias (▶). Aumento original: 1200X.

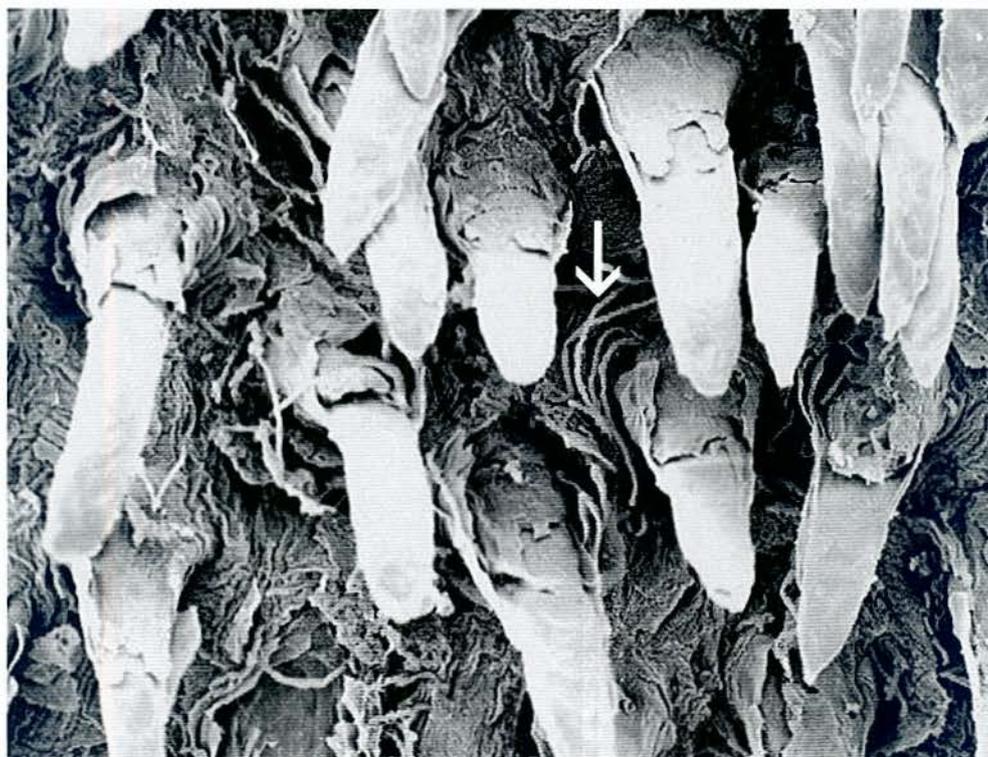


FIGURA 31 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 24 horas após a inoculação de *C. albicans*. Verifica-se proliferação de hifas (→) entre as papilas filiformes. Aumento original: 300X.

Após sete dias da inoculação de *C. albicans*, verificou-se em microscopia óptica que sete ratas controle e cinco ovariectomizadas apresentavam hifas no epitélio do dorso da língua. Essas hifas eram pouco numerosas e estavam localizadas no interior da queratina, que se descamava da superfície epitelial. As demais camadas do epitélio e o tecido conjuntivo subjacente apresentavam-se normais ou com discreto infiltrado inflamatório.

Em seis ratas controle e três ovariectomizadas foram encontradas áreas com intensa lesão tecidual, caracterizadas por perda das papilas filiformes. Essa lesão apresentou dois padrões distintos, no primeiro, notava-se hiperparaqueratose, hiperplasia do epitélio, espongirose, duplicação e perda de estratificação da camada basal, além de células inflamatórias em todas as camadas, por vezes formando microabscessos (Figuras 32 - 34). No segundo padrão, observou-se apenas hiperplasia do epitélio com focos de duplicação da camada basal (Figura 35). O tecido conjuntivo subjacente às áreas de lesão mostrava infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. As lesões teciduais estavam localizadas na região de transição entre as papilas cônicas simples e gigantes, com exceção de duas ratas que exibiram lesões teciduais nas papilas verdadeiras.

Na microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar, em pequenos aumentos, a presença dessas lesões teciduais no dorso da língua (Figura 36). Nas áreas lesadas, notaram-se atrofia e destruição das papilas filiformes e aumento da superfície interpapilar (Figuras 37 - 39). Além disso, em um animal controle, verificou-se presença de um sulco transversal na área de lesão (Figura 36). Neste período de sacrifício, raramente foram observadas leveduras ou hifas no dorso da língua.



FIGURA 32 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão tecidual caracterizada por perda das papilas filiformes, hiperparaqueratose e hiperplasia do epitélio. HE; aumento original 100X.

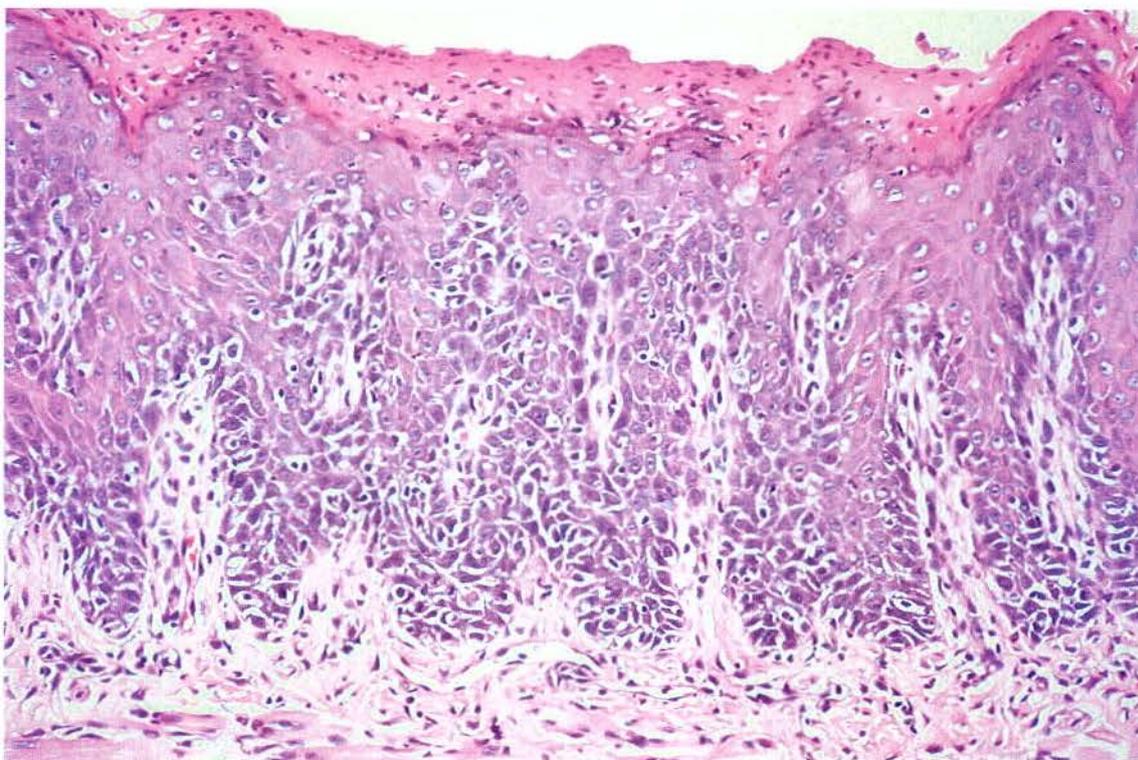


FIGURA 33 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Detalhe da Figura 32, demonstrando hiperparaqueratose, hiperplasia do epitélio, espongiose, exocitose, duplicação e perda de estratificação da camada basal. HE; aumento original 200X.

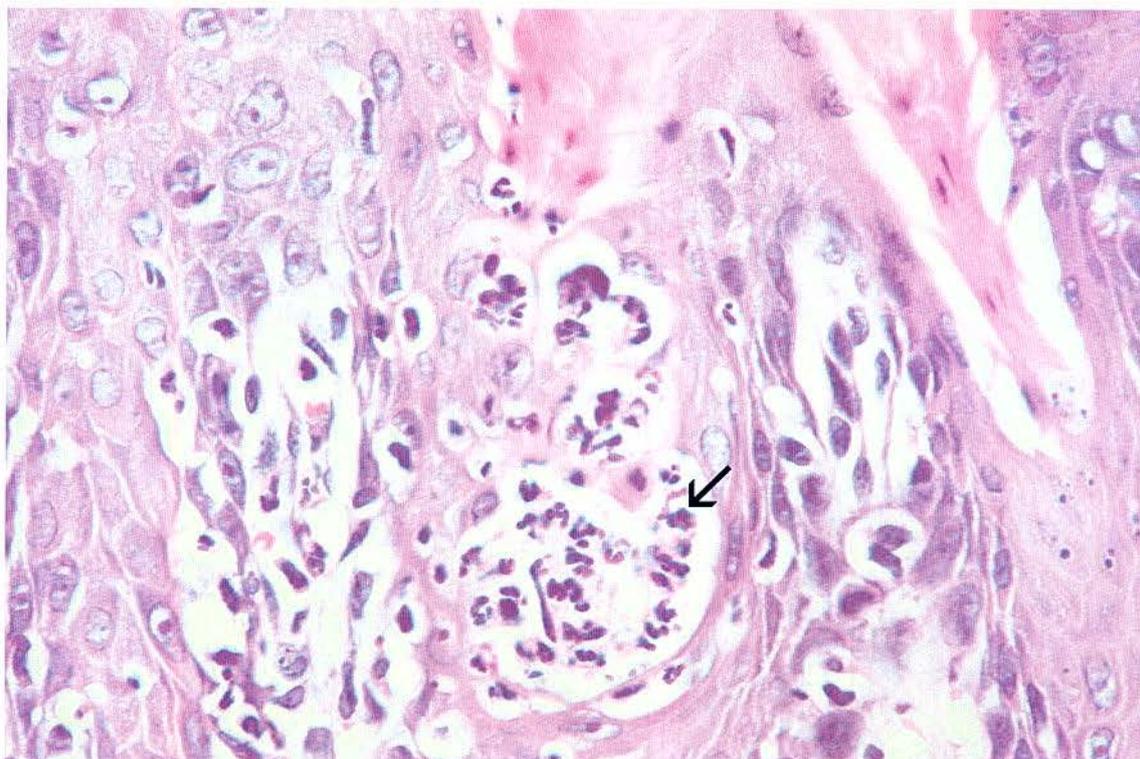


FIGURA 34 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Verifica-se formação de microabscesso intra-epitelial (→) em área de lesão tecidual. HE; aumento original 630X.

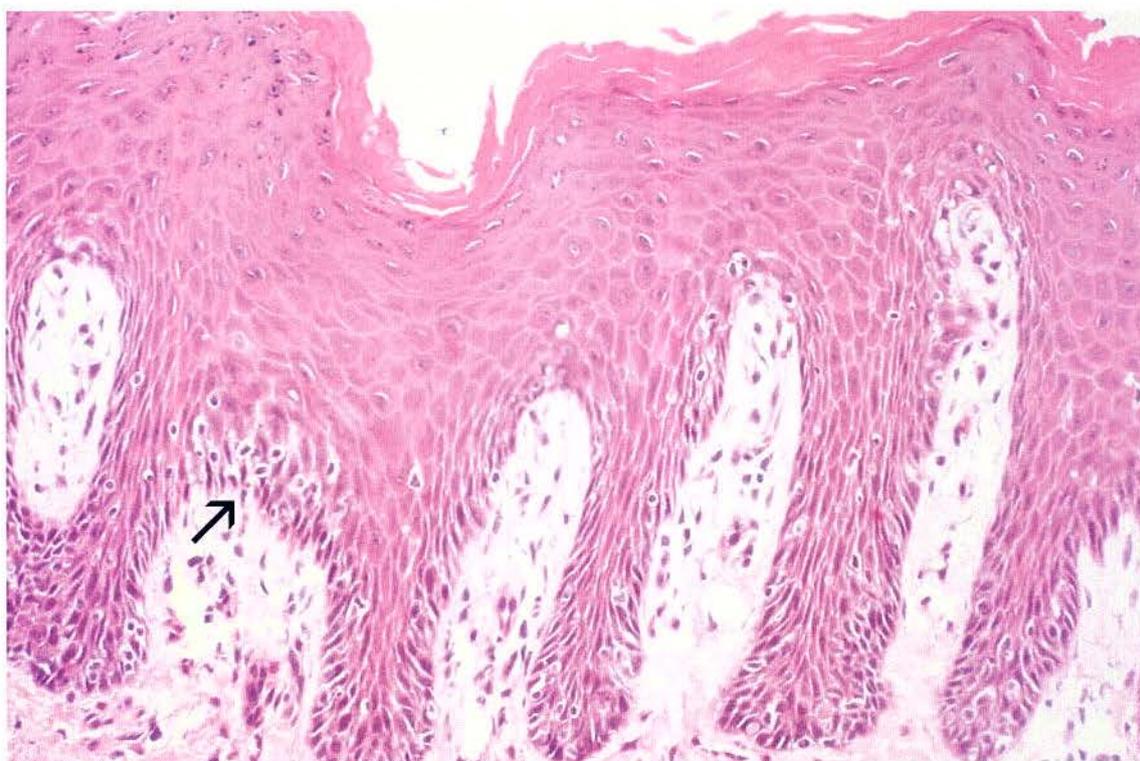


FIGURA 35 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão tecidual representada por perda das papilas filiformes, hiperplasia do epitélio com focos de duplicação da camada basal e exocitose (→). HE; aumento original 200X.



FIGURA 36 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Área de atrofia papilar (◆) na região de papilas cônicas simples anteriormente às gigantes (▶). Observa-se sulco transversal (→) na lesão. Aumento original: 75X.



FIGURA 37 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Detalhe da Figura 36, demonstrando atrofia das papilas filiformes e aumento da superfície interpapilar. Aumento original: 200X.

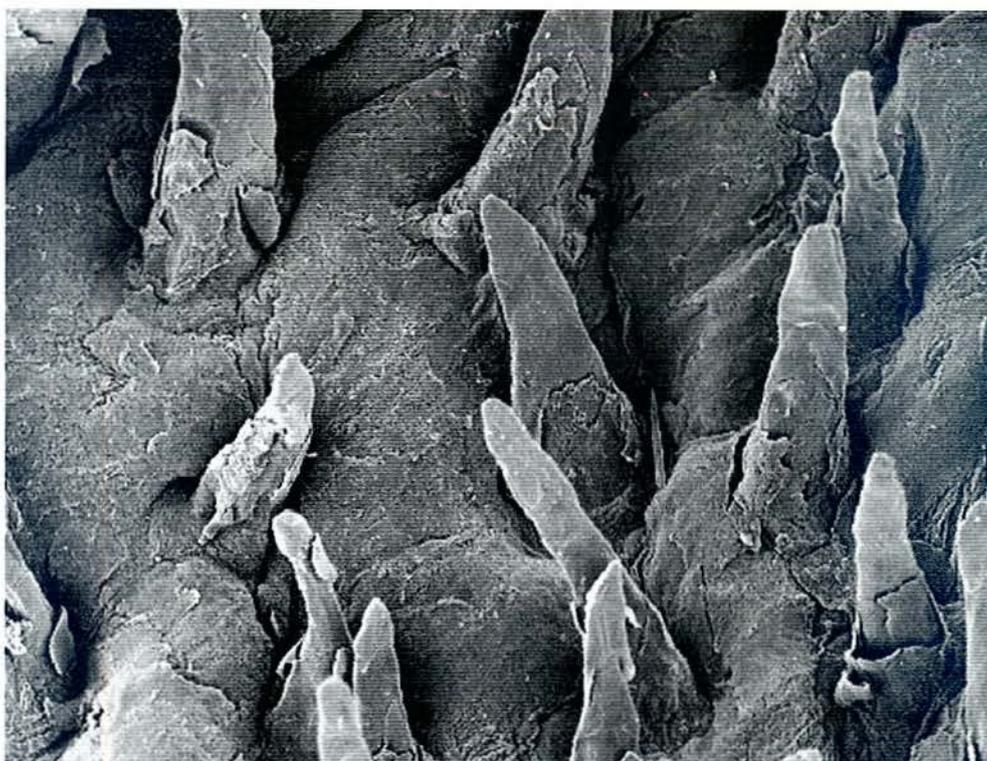


FIGURA 38 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Atrofia das papilas cônicas simples e aumento da superfície interpapilar. Aumento original: 300X.

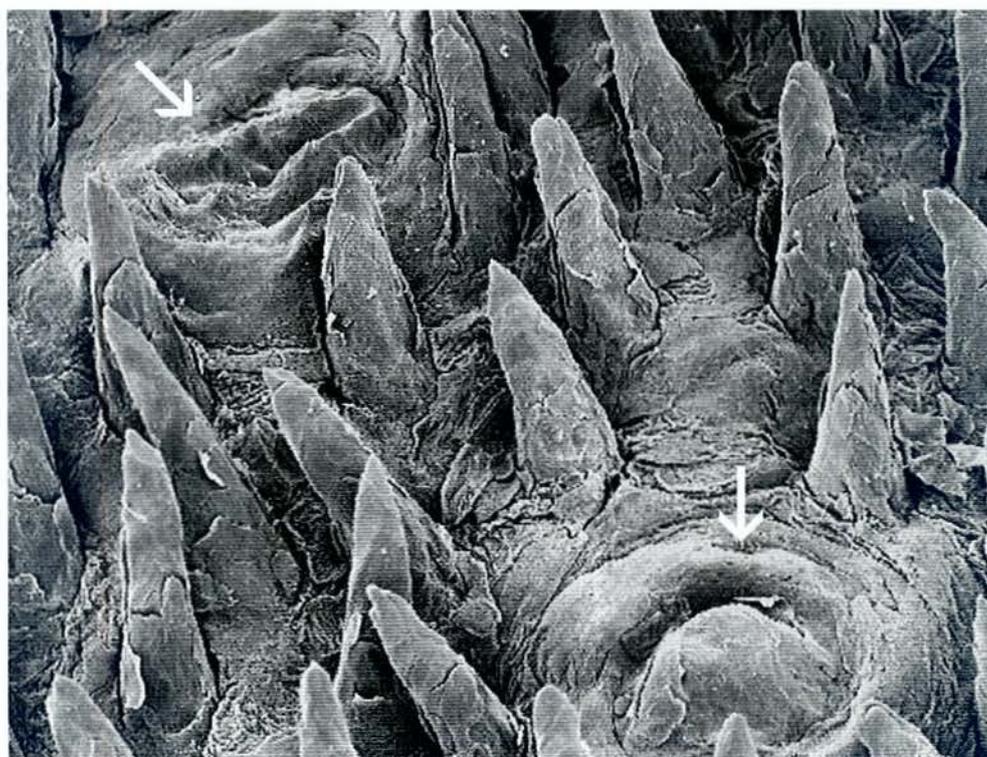


FIGURA 39 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, sete dias após a inoculação de *C. albicans*. Observam-se atrofia das papilas cônicas simples e presença de papilas fungiformes (→). Aumento original: 220X.

Depois de 15 dias da inoculação de *C. albicans*, verificou-se, em microscopia óptica, que dois animais ovariectomizados apresentaram persistência de algumas hifas no interior da queratina. O epitélio e conjuntivo subjacentes mostraram-se normais. Um animal controle exibiu hifas na camada de queratina, associada à lesão tecidual.

Sete ratas controle e duas ovariectomizadas apresentaram lesões teciduais, com padrões semelhantes aos observados no período de sete dias, sendo que o primeiro padrão foi mais difícil de ser encontrado (Figuras 40 e 41). A lâmina própria também exibia infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear.

Uma rata controle demonstrou duas lesões teciduais no dorso da língua, sendo uma localizada nas papilas cônicas simples e a outra nas verdadeiras. De todas as lesões teciduais observadas neste período de sacrifício, nove foram na região de transição entre as papilas cônicas simples e gigantes, uma nas papilas gigantes e duas nas verdadeiras.

Na microscopia eletrônica de varredura, leveduras e hifas não foram mais encontradas. Na região entre as papilas cônicas simples e gigantes, ainda se observava lesão tecidual, representada por atrofia das papilas e aplainamento do tecido (Figura 42).

Uma rata do grupo controle demonstrou um sulco transversal bastante profundo na área de lesão tecidual (Figura 43).

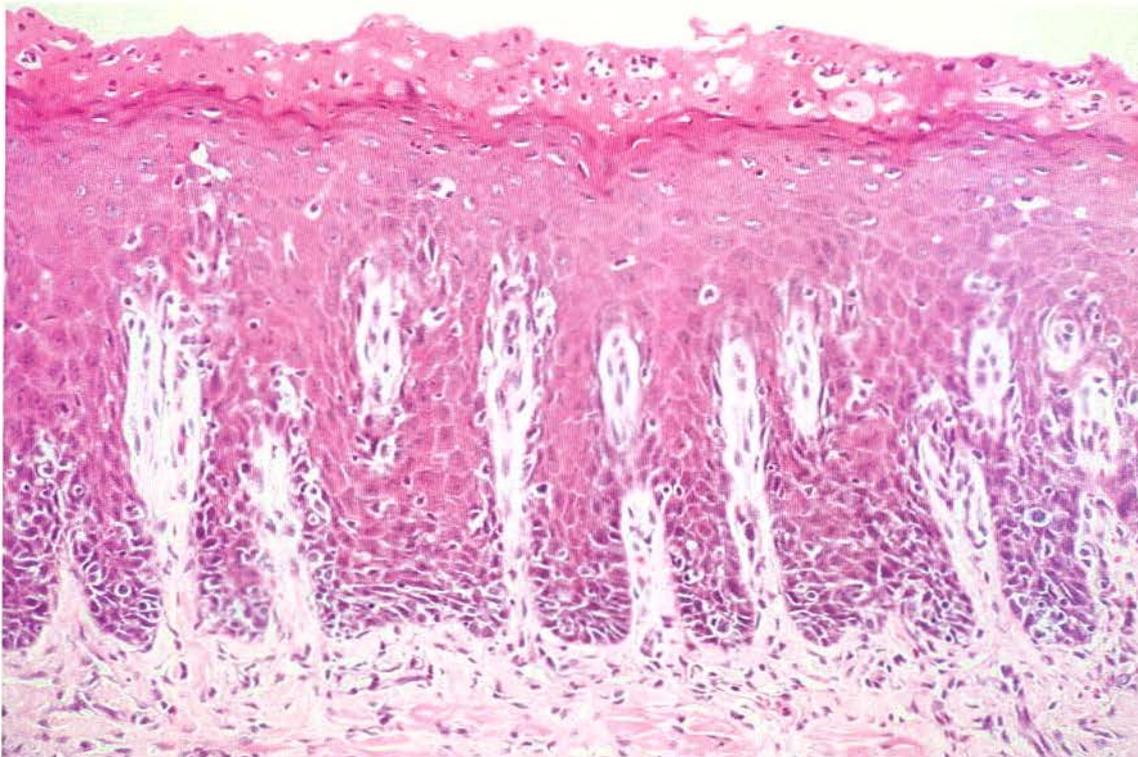


FIGURA 40 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo controle, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Observa-se perda das papilas filiformes, hiperparaqueratose, hiperplasia do epitélio, espongiose, exocitose, duplicação e perda de estratificação da camada basal. HE; aumento original 200X.



FIGURA 41 - Corte sagital do dorso da língua de rata do grupo ovariectomizado, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão tecidual caracterizada por perda das papilas filiformes e hiperplasia do epitélio com focos de duplicação da camada basal. A lâmina própria contém vasos sanguíneos congestionados (→). HE; aumento original 200X.



FIGURA 42 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Lesão representada por atrofia das papilas filiformes e aplainamento do tecido. Aumento original: 500X.



FIGURA 43 - Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua de rata do grupo controle, 15 dias após a inoculação de *C. albicans*. Observa-se sulco transversal profundo na área de lesão tecidual. Aumento original: 180X.

Os resultados da distribuição dos escores para a análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por *Candida*, realizada em microscopia óptica, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Escores atribuídos aos animais dos grupos controle e ovariectomizado, nos diferentes tempos de sacrifício, para análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por *C. albicans*

Períodos de Sacrifícios		Escores					Total
		0	1	2	3	4	
6 horas	Co	393	22	28	43	74	560
	Ov	473	16	20	28	23	560
24 horas	Co	322	52	58	78	50	560
	Ov	393	38	40	62	27	560
7 dias	Co	530	21	5	4	0	560
	Ov	542	10	5	3	0	560
15 dias	Co	557	3	0	0	0	560
	Ov	557	3	0	0	0	560

Co: controle; Ov: ovariectomizado

O grupo ovariectomizado apresentou escore médio inferior ao controle nos períodos de seis horas, 24 horas e sete dias após a inoculação de *C. albicans*, entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 44 e Apêndice C). No tempo de observação de 15 dias, o epitélio raramente demonstrou colonização por *Candida*.

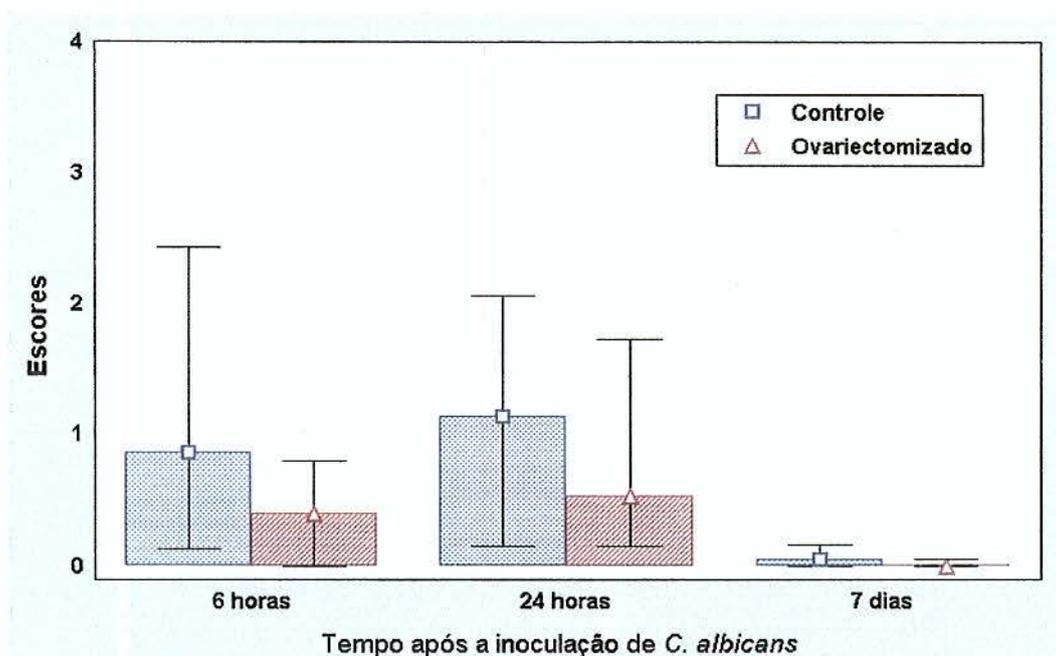


FIGURA 44 - Faixa (máximo e mínimo) e valores medianos obtidos na análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por *C. albicans*. Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas (Teste de *Mann-Whitney*, $\alpha = 5\%$) entre os grupos controle e ovariectomizado para os períodos de seis horas ($p = 0,12$), 24 horas ($p = 0,19$) e sete dias ($p = 0,34$).

5.6 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal das ratas

No grupo controle, *C. albicans* foi recuperada de todos os animais nos períodos de um, dois, cinco, sete e 22 dias após a inoculação. A seguir, houve um declínio no número de ratas positivas para leveduras, para oito após 37 dias, para quatro após 52 dias e uma após 67 dias das inoculações. No período de 82 dias, *C. albicans* não foi mais recuperada (Apêndice D).

No grupo ovariectomizado, a recuperação ocorreu em todos os animais após um, dois, cinco e sete dias da inoculação, decaindo a seguir para cinco após 22 dias. No período de 37 dias, leveduras não foram mais recuperadas (Apêndice D).

A média do logaritmo do número das ufc/mL de *C. albicans*, recuperadas da cavidade bucal, foi menor nos animais ovariectomizados do que nos controles, em todos os períodos de observação, conforme pode ser observado na Tabela 3 e Figura 45.

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão do logaritmo do número das unidades formadoras de colônias (ufc/mL) de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal de ratas controles e ovariectomizadas nos diferentes períodos de observação

Tempo após inoculação (dias)	Controle (n = 10)	Ovariectomizado (n = 10)
1	4,69 ± 0,31	1,99 ± 1,12
2	4,28 ± 0,40	3,61 ± 0,83
5	4,36 ± 0,42	3,32 ± 0,68
7	2,36 ± 0,84	1,82 ± 0,39
22	2,46 ± 0,93	0,50 ± 0,52
37	1,14 ± 0,6	0
52	0,80 ± 1,07	0
67	0,22 ± 0,70	-
82	0	-
97	0	-

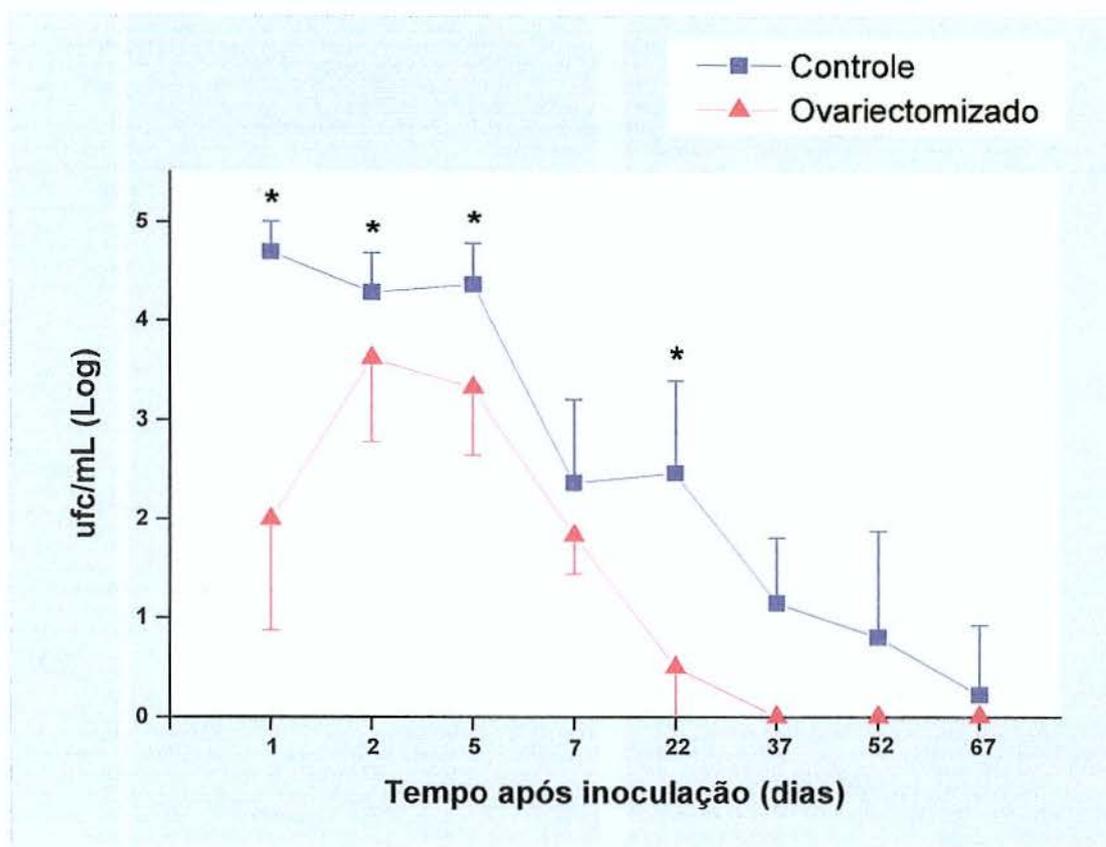


FIGURA 45 - Médias e desvios-padrão dos dados (em log) de ufc/mL de *C. albicans*, recuperadas da cavidade bucal das ratas nos vários períodos de observação. *Diferenças estatisticamente significantes (Teste *t* de Student, $\alpha = 5\%$) entre os grupos controle e ovariectomizado, nos tempos de 1 dia ($p = 0,00$), 2 dias ($p = 0,04$), 5 dias ($p = 0,001$) e 22 dias ($p = 0,00$)

A cada recuperação de leveduras da cavidade bucal das ratas, uma amostra de um animal controle e de um ovariectomizado foi isolada, identificada a nível de espécie e caracterizada através da verificação do fator *killer*. Todas as amostras eram *C. albicans* biotipo *killer* 111, o mesmo biotipo da amostra que foi inoculada, confirmando portanto, que a amostra recuperada foi a mesma utilizada para inoculação.

6 DISCUSSÃO

Além dos dilemas éticos associados com a pesquisa em seres humanos, os mesmos apresentam variações em relação à raça, cultura, dieta, hábitos sociais, resposta imunológica e fisiologia bucal. Estes fatores, associados à dificuldade de se estabelecer a etiologia e patogênese de doenças oportunistas, como a candidose, indicaram a necessidade da utilização de modelos animais experimentais. O modelo animal possibilita maior padronização dos fatores envolvidos na candidose e subseqüentes comparações dos resultados observados em diversos estudos (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001).

Porém, uma das desvantagens em estudar candidose na cavidade bucal de ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* é que estes animais podem ser portadores naturais do gênero *Candida*, apresentando resposta imunológica diferente ao processo infeccioso (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE¹¹⁰, 2001). Assim, no início deste trabalho, foi realizada pesquisa do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais e aqueles que apresentaram colonização natural por leveduras não foram utilizados, evitando-se assim qualquer interferência nos resultados.

A colonização natural por *Candida* foi encontrada na boca de 13 das 137 ratas (9,48%) examinadas no início do experimento. Esse resultado mostra-se inferior aos de Jorge⁵⁵ (1991), Totti¹³¹ (1994) e Jorge et al.⁵⁷ (1997), que relataram a presença de *Candida*, respectivamente, em 17, 42 e 22% dos ratos analisados. Por outro lado, Fisker et al.⁴¹ (1982) isolaram leveduras em apenas dois dos 104 (1,6%) ratos analisados e O'Grady & Reade⁹³ (1993) não encontraram o gênero *Candida* na cavidade bucal dos ratos estudados.

Os diferentes resultados desses trabalhos revelam que a colonização por *Candida* na cavidade bucal de ratos é menos freqüente do que nos seres humanos, uma vez que a prevalência de leveduras em adultos saudáveis varia entre 3 a 48%, dependendo da população em estudo (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE,¹¹⁰ 2001; SHERMAN et al.¹²⁰, 2002).

Entre as amostras isoladas, 44,44% eram *C. guilliermondii*, 38,88% *C. lusitaniae* e as demais *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Jorge et al.⁵⁷ (1997) também encontraram *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* na cavidade bucal de ratos. Entretanto, Fisker et al.⁴¹ (1982) encontraram apenas amostras de *C. famata* entre os ratos analisados.

Embora *C. albicans* seja a espécie mais freqüentemente isolada da cavidade bucal de seres humanos, correspondendo à cerca de 60 a 70% dos isolamentos (STENDERUP¹²⁶, 1990), essa espécie não foi encontrada no presente estudo. Esse resultado concorda com outros trabalhos que mostram que a colonização por *C. albicans* na cavidade bucal de ratos não é tão freqüente como em seres humanos. Jorge⁵⁵ (1991) e Jorge et al.⁵⁷ (1997) encontraram *C. albicans*, respectivamente, em 3,41 e 6,85% das amostras isoladas.

Neste trabalho, as espécies mais comumente observadas foram *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Estas espécies têm sido isoladas do trato digestivo de animais homeotermos (LACAZ et al.⁷³, 1998), podendo, portanto, ser encontradas na boca de ratos. Entretanto, quando inoculadas em animais experimentais, apresentam baixa patogenicidade (ARENDRUP et al.¹³, 2002).

Na cavidade bucal humana, estas espécies são menos freqüentes. Jorge et al.⁶⁰ (1997) encontraram *C. guilliermondii* em 2,5% dos isolados e *C. lusitaniae* em 1,25%. Além disso, Kulak-Ozkan et al.⁷⁰ (2002) observou a presença de *C. guilliermondii* em 2,9% e não encontrou *C. lusitaniae*. O número de infecções causadas por estas espécies tem

aumentado nos últimos anos, principalmente por apresentarem resistência à Anfotericina B e Nistatina. Atualmente, *C. guilliermondii* e *C. lusitanae*, são responsáveis respectivamente, por 1 a 5 e 2 a 8% do total de candidemias (KRCMERY & BARNES⁶⁹, 2002).

Além de constituírem bons modelos experimentais para o estudo da candidose bucal, os ratos têm sido amplamente utilizados para a compreensão dos mecanismos envolvidos na menopausa. A deficiência de estrógeno e outros hormônios observada na menopausa pode ser induzida em animais experimentais, através da cirurgia de ovariectomia (CASTRO²⁹, 2000; WU et al.¹⁴¹, 2000).

O sucesso desta cirurgia em reduzir os níveis de hormônios ovarianos pode ser avaliado através das alterações de peso corporal dos animais. A queda de estrógeno resulta em aumento de peso por induzir maior consumo de alimentos e conseqüente acúmulo de gordura (ALBERT et al.⁴, 1991). O estrógeno modula a excitabilidade dos neurônios do núcleo ventromedial do hipotálamo, que constitui o centro do comportamento alimentar (SHIMIZU et al.¹²¹, 1997).

O acréscimo de peso corporal após 28 dias da cirurgia de ovariectomia foi equivalente a 11,59% para as ratas controles e 20,36% para as ratas ovariectomizadas, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Estes dados coincidem com os resultados obtidos por Rico et al.¹⁰⁶ (2000), que observaram um aumento de peso de 13% para animais controles e 24% para ratas ovariectomizadas, decorridos trinta dias da ovariectomia.

Aitken et al.² (1972) também observaram maior acréscimo de peso nas ratas ovariectomizadas em relação ao grupo controle após um mês da ovariectomia, porém esse acréscimo foi de apenas 3% para o grupo controle e 17% para o ovariectomizado. As diferenças entre esses dados com os anteriormente citados podem ser atribuídas à espécie de animal estudada, visto que Aitken et al.² (1972) analisaram ratas *Sprague-*

Dawley, enquanto que em nosso trabalho e no estudo de Rico et al.¹⁰⁶ (2000), foram utilizadas ratas *Wistar*.

Depois de um mês da cirurgia de ovariectomia, Yoneda et al.¹⁴² (1998) observaram que as médias do consumo de alimento (g/dia) e do peso corporal (g) foram, respectivamente, de 19,6 e 256,9 para ratas controles, 24,6 e 309,2 para ratas ovariectomizadas e 18,2 e 242,7 para ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, indicando que a reposição hormonal pode reverter os efeitos da ovariectomia na ingestão de alimentos e peso corporal.

Em ratas com ovários intactos, as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona variam conforme a fase do ciclo estral (ALBERT et al.⁴, 1991). Segundo Levine et al.⁷⁷ (1996), os níveis plasmáticos de estradiol oscilam aproximadamente entre 30 a 50pg/mL. Neste trabalho, para realização das dosagens hormonais foi necessária uma padronização da fase do ciclo estral. Sendo assim, as ratas controle foram sacrificadas no proestro, fase em que tanto os níveis de estradiol como os de progesterona estão elevados (NEQUIM et al.⁹¹, 1979).

As concentrações plasmáticas de estrógeno e progesterona das ratas controle em proestro foram respectivamente, de 57,14pg/mL e 15,78ng/mL. Abdalla¹ (1999) encontrou 30,95pg/mL de estradiol plasmático e 12,94ng/mL de progesterona no plasma de ratas em estro. Esses resultados confirmam a variação hormonal durante o ciclo estral.

O valor de estradiol plasmático foi cerca de três vezes maior no grupo controle em relação ao ovariectomizado (57,14 e 18,88pg/mL de plasma). Essa diferença foi ainda maior na dosagem de progesterona, na qual o grupo controle apresentou nível hormonal cinco vezes maior do que o ovariectomizado (15,78 e 3,96ng/mL de plasma). Esses dados indicaram que a excisão dos ovários foi bem sucedida e que o modelo de animal ovariectomizado foi capaz de refletir o estágio hormonal da mulher na menopausa.

Na análise em microscopia de luz das línguas das ratas não infectadas por *C. albicans*, observou-se que os animais ovariectomizados apresentaram aspecto de normalidade semelhante aos controles. Esses resultados concordaram com os achados de Hertz et al.⁴⁹ (1971), que descreveram aspectos morfológicos normais das papilas do dorso da língua e do epitélio da mucosa bucal em mulheres após a menopausa. Leimola-Virtanen et al.⁷⁶ (1997) também observaram semelhança entre os padrões celulares das citologias esfoliativas realizadas na mucosa bucal de mulheres jovens e pós-menopausa.

Entretanto, Pisanty et al.⁹⁸ (1975) encontraram alterações histológicas, como atrofia epitelial e espongiose, na mucosa bucal de mulheres após a menopausa. Richman & Arbarbanel¹⁰⁵ (1943) relataram que as alterações epiteliais da mucosa bucal decorrentes dos baixos níveis de estrógeno ocorrem após longo período de tempo. Ziskin & Blackberg¹⁴⁵ (1940) conseguiram produzir gengivite atrófica em macacos, somente após 210 dias da cirurgia de ovariectomia. Possivelmente, neste trabalho, o dorso da língua das ratas ovariectomizadas não apresentou alterações histológicas perceptíveis pela metodologia utilizada, devido ao tempo de observação (28 dias após a ovariectomia).

Na análise em microscopia eletrônica de varredura, o dorso da língua das ratas ovariectomizadas também apresentava aspecto semelhante às ratas controles. Entretanto, Yucel et al.¹⁴³ (2002) demonstraram que as alterações hormonais durante a gestação alteram a morfologia das papilas da língua, levando a um aumento da sensibilidade gustativa. Em microscopia eletrônica de varredura, esses autores observaram que a língua de ratas prenhas apresentavam sulco mais profundo ao redor da papila circunvalada, configuração laminar não circular nas papilas fungiformes e desorganização na direção das papilas filiformes.

Os animais que receberam inoculações de *C. albicans* na cavidade bucal desenvolveram lesões clínicas e microscópicas de

candidose no dorso da língua, mesmo sem apresentarem fatores predisponentes, como uso de antibióticos, imunossupressão, dieta rica em carboidratos ou xerostomia. Esses dados confirmam que a candidose experimental pode ser induzida pela simples inoculação de uma cepa patogênica de *C. albicans* (ALLEN et al.⁶, 1989).

A sedação realizada nos animais durante a inoculação desse microrganismo pode ter favorecido o desenvolvimento da candidose bucal. Takakura et al.¹²⁸ (2003) verificaram que a gravidade das lesões de candidose aumentou conforme o tempo de sedação após a inoculação. Segundo esses autores, a sedação dos animais dificulta a ingestão da suspensão de *C. albicans*, evitando a ocorrência de candidose sistêmica; e aumenta a permanência das leveduras na cavidade bucal, favorecendo a formação de tubos germinativos e filamentação, responsáveis pela invasão tecidual.

A candidose experimental induzida neste trabalho foi menos freqüente no grupo ovariectomizado em relação ao controle, mas as características clínicas e microscópicas foram semelhantes em ambos os grupos.

Lesões clínicas de candidose foram observadas nas ratas sacrificadas após sete e 15 dias da inoculação. Resultado semelhante foi encontrado por Allen et al.⁶ (1989) que, após sacrificarem os animais em vários períodos subseqüentes da inoculação, verificaram lesões macroscópicas após sete dias.

As lesões clínicas foram caracterizadas por áreas de atrofia papilar bem delimitadas e geralmente localizadas na região de papilas cônicas simples, próximo às papilas gigantes. Essas mesmas características foram observadas na candidose experimental induzida em ratos através da simples inoculação de *C. albicans* (ALLEN et al.⁶, 1989), administração de tetraciclina (ALLEN et al.⁶, 1985) ou sialoadenectomia (JORGE et al.⁵⁸⁻⁹, 1993; FREIRE-GARABAL et al.⁴², 1999). Entretanto, lesões semelhantes à candidose pseudomembranosa foram encontradas

na língua de camundongos geneticamente modificados, com Síndrome da Imunodeficiência Severa (TEICHERT et al.¹²⁹, 2002) e em camundongos imunossuprimidos por prednisolone (TAKAKURA et al.¹²⁸, 2003).

Após seis horas da inoculação de *C. albicans*, observou-se, em microscopia óptica, a presença de aglomerados de leveduras e hifas na queratina, em diversas regiões do dorso da língua. Utilizando a mesma metodologia desse trabalho, Jorge⁵⁵ (1991) verificou que a formação de hifas, a partir da filamentação das leveduras, ocorre após quatro horas da inoculação. Esses achados confirmam que a produção de hifas por *C. albicans* é importante para a invasão do microrganismo aos tecidos (WEBB et al.¹³⁶, 1998).

Em microscopia eletrônica de varredura, notou-se a presença de bactérias e leveduras aderidas, principalmente à superfície convexa das papilas filiformes. Segundo Brady et al.¹⁶ (1975), a aderência das bactérias é maior na superfície convexa (anterior) das papilas cônicas simples e verdadeiras, devido ao maior contato dessa superfície com a saliva, que contém proteínas importantes para a adesão bacteriana.

Além disso, observou-se que em regiões com grande quantidade de leveduras, as papilas filiformes apresentavam-se recobertas por biofilme. Santos¹¹⁴ (1999) também estudou a aderência de *C. albicans* às papilas filiformes e verificou que a mesma ocorre predominantemente nas papilas verdadeiras, sobre a placa bacteriana. Esses dados indicam possível interação de *C. albicans* com outros microrganismos presentes no biofilme, o que pode ter contribuído para sua colonização e proliferação na cavidade bucal (CANNON et al.²⁷, 1995; WEBB et al.¹³⁶, 1998).

Ainda em relação ao período de seis horas, a presença de hifas foi observada em microscopia óptica, mas não em microscopia eletrônica de varredura. Alien et al.⁶ (1989) relataram que a observação de hifas em microscopia eletrônica de varredura é bastante rara, uma vez que as mesmas ficam no interior da queratina.

Depois de 24 horas da inoculação de *C. albicans*, a análise de microscopia óptica revelou intensa proliferação de hifas e descamação da queratina. Shakir et al.¹¹⁹ (1986) demonstraram que a infecção por *Candida* resultou em aumento do número de mitoses na camada basal do epitélio e da quantidade de descamação. Segundo esses autores, essas alterações constituem mecanismos de defesa frente à invasão fúngica.

Além da proliferação de hifas e descamação, observou-se em microscopia eletrônica de varredura, presença de degradação tecidual. *C. albicans* secreta enzimas histolíticas, como as proteinases, capazes de digerir queratina e facilitar a invasão do microrganismo (HOEGL et al.⁵⁰, 1996; HUBE & NAGLIK⁵¹, 2001).

A degradação tecidual e descamação da queratina com aglomerados de hifas, observados após 24 horas da inoculação, possivelmente podem explicar a grande quantidade de hifas encontradas em microscopia eletrônica de varredura nesse período de observação.

Decorridos sete e 15 dias após a inoculação de *C. albicans*, notou-se em microscopia óptica a presença de pequenas quantidades de hifas e de lesões teciduais, caracterizadas por perda das papilas filiformes, acantose e hiperplasia do epitélio, além de infiltrado inflamatório nos tecidos epitelial e conjuntivo. Samaranayake & Samaranayake¹¹⁰ (2001) relataram que, embora a infecção por *Candida* seja restrita à camada de queratina na superfície epitelial, alterações teciduais podem ocorrer nas camadas mais profundas do epitélio e na lâmina própria. Provavelmente, esses efeitos podem ser atribuídos à produção de enzimas extracelulares, como proteinases e fosfolipases.

Na microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, constataram-se áreas de atrofia papilar e aplainamento do tecido, que corresponderam às lesões macroscópicas observadas neste trabalho.

No período de 15 dias, vários animais exibiram aspecto de normalidade no dorso da língua, sem a presença de hifas ou de lesões teciduais. Esses achados concordam com Samaranayake & Samaranayake¹¹⁰ (2001), que verificaram resolução do processo infeccioso após 15 dias da inoculação, sugerindo que o sistema imunológico do animal é suficiente para eliminar infecção por *C. albicans*.

Na análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por *C. albicans*, o grupo ovariectomizado apresentou resultado inferior ao controle nos períodos de seis horas, 24 horas e sete dias. Esses dados concordam com estudos sobre a candidose vulvovaginal, que demonstraram influência dos níveis de hormônios ovarianos na infecção por *C. albicans*.

Os mecanismos pelos quais esses hormônios agem na candidose vulvovaginal ainda não estão totalmente estabelecidos, mas vários estudos demonstraram que o estrogênio apresenta efeitos indiretos no tecido do hospedeiro, favorecendo invasão de *C. albicans* (SOBEL et al.¹²⁴, 1985; KALO & KLEIN & WITKIN⁶⁴, 1989; DENNERSTEIN & ELLIS³¹, 2001), e efeitos diretos sobre o microrganismo, modulando seus mecanismos de patogenicidade (WHITE & LARSEN¹³⁷, 1997; MADANI et al.⁸⁰, 2000).

Sobel et al.¹²⁴ (1985) verificaram que ratas ovariectomizadas são resistentes ao desenvolvimento de candidose experimental por apresentarem epitélio vaginal composto por células colunares não queratinizadas. Entretanto, esses animais desenvolveram candidose vaginal após o tratamento com estrogênio. Esse hormônio induz o espessamento e queratinização do epitélio, favorecendo adesão de *C. albicans*.

Como, neste trabalho, as características histológicas do dorso da língua das ratas controles e ovariectomizadas foram semelhantes, possivelmente o menor desenvolvimento de candidose nos

animais ovariectomizados esteja relacionado com os efeitos diretos do estrógeno sobre *C. albicans*.

Kinsman & Collard⁶⁸ (1986) realizaram coletas do fluido vaginal de ratas não infectadas por *Candida* para estudarem os efeitos *in vitro* dos hormônios ovarianos na germinação de leveduras. Uma cepa de *C. albicans* foi adicionada ao enxágüe vaginal, após o mesmo ter sido centrifugado e filtrado para eliminação das células epiteliais. Depois do período de incubação de três horas, o percentual de formação de tubos germinativos foi de 11,5 para o grupo controle, 8,9 para o grupo ovariectomizado, 16,5 para o grupo ovariectomizado tratado com estrógeno e 13,1 para o grupo ovariectomizado tratado com progesterona. Os autores concluíram que fatores não relacionados com as características celulares do epitélio vaginal são importantes para a produção de tubos germinativos.

Vários estudos *in vitro* demonstraram que *C. albicans* responde ao estrógeno exógeno com alterações na taxa de crescimento e morfogênese, aumentando sua patogenicidade (WHITE & LARSEN¹³⁷, 1997). Buckman & Miller¹⁸ (1998) e Madani et al.⁸⁰ (2000) sugeriram que a resposta de *C. albicans* a esse hormônio é mediada pela proteína de ligação ao estrógeno (EBP), presente no citoplasma desse microrganismo.

Neste trabalho, *C. albicans* foi recuperada da cavidade bucal dos animais do grupo controle até 67 dias após a inoculação e do grupo ovariectomizado por 22 dias. Além disso, a média de ufc/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal foi menor no grupo ovariectomizado em relação ao controle, em todos os períodos de observação.

Sobel et al.¹²⁴ (1985) também estudaram a recuperação de *C. albicans* no fluido vaginal de ratas após vários períodos da inoculação (10^8 células viáveis/mL) e verificaram que, após 96 horas, todos os animais ovariectomizados apresentavam culturas negativas para

o gênero *Candida*, sugerindo que a presença de estrógeno é fundamental para a colonização vaginal por esse microrganismo.

Neste trabalho, a realização de três inoculações de *C. albicans*, contendo 10^8 células/mL, conseguiu produzir colonização por *C. albicans* na cavidade bucal de ratas ovariectomizadas por 22 dias, porém em menores quantidades do que o grupo controle, sugerindo que os hormônios ovarianos atuaram de maneira significativa na candidose bucal.

7 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados, concluiu-se que :

- a) a candidose experimental foi menos freqüente no grupo ovariectomizado em relação ao controle;
- b) a média do logaritmo do número das ufc/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal foi menor no grupo ovariectomizado do que no controle, em todos os períodos de observação.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 ABDALLA, F. M. F. **Receptores Muscarínicos em miométrio de ratas adultas e sua modulação pelo estrógeno**. 1999. 111f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.
- 2 AITKEN, J. M.; ARMSTRONG, E.; ANDERSON, J. B. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of oestrogen and/or progestogen replacement therapy in its prevention. **J Endocrinol**, v.55, n.1, p.79-87, Oct. 1972.
- 3 AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**, v.78, n.922, p.455-9, Aug. 2002. Disponível em: www.postgradmedj.com.
- 4 ALBERT, D. J. et al. Serum estradiol concentration required to maintain body weight, attractiveness, proceptivity, and receptivity in the ovariectomized female rat. **Physiol Behav**, v.49, n.2, p.225-31, Feb. 1991.
- 5 ALLEN, C. M. Animal models of oral candidiasis: a review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.78, n.2, p.216-21, Aug. 1994.
- 6 ALLEN, C. M.; PAULSON, R.; DUNCAN, R. Clinical, histologic and scanning electron microscopic study of the development of chronic candidiasis of the rat tongue. **J Oral Pathol Med**, v.18, n.6, p.352-9, July 1989.

- 7 ALLEN, C. M. et al. Chronic candidiasis of the rat tongue: a possible model for human Median Rhomboid Glossitis. **J Dent Res**, v.61, n.11, p.1287-91, Nov. 1982.
- 8 ALLEN, C. M. et al. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongues. **Infect Immun**, v.47, n.2, p.480-3, Feb. 1985.
- 9 ALLEN, C. M. et al. Comparison of a lesion-inducing isolate and a non-lesional isolate of *Candida albicans* in an immunosuppressed rat model of oral candidiasis. **J Oral Pathol Med**, v.23, n.3, p.133-9, Mar. 1994.
- 10 ALMEIDA, N. Q. **Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de *Candida* sobre a patogenicidade para camundongos.** 1991. 111f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 1991.
- 11 ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap.73, p.877-917.
- 12 ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch Oral Biol**, v.25, n.1, p.1-10, 1980.
- 13 ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MOLLER, N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v.30, n.5, p.286-91, Oct. 2002.

- 14 BENDOVA, O. The *killer* phenomenon in yeasts. **Folia Microbiol**, v.31, n.5, p.422-33, 1986.
- 15 BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. In: INTERNATIONAL CONGRESS GENETIC, 11, 1963, v.1, p.202-3 apud MAGLIANI, W. et al. Yeast *killer* systems. **Clin Microbiol Rev**, v.10, n.3, p.369-400, July 1997.
- 16 BRADY, J. M.; GRAY, W. A.; LARA-GARCIA, W. Localization of bacteria on the rat tongue with scanning and transmission electron microscopy. **J Dent Res**, v.54, n.4, p.777-82, Jul-Aug. 1975.

BRAWNER, D. L.; ANDERSON, G. L.; YUEN, K. Y. Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. **J Clin Microbiol**, v.30, n.1, p.149-53, Jan. 1992.

- 18 BUCKMAN, J.; MILLER, S. M. Binding and reactivity of *Candida albicans* estrogen binding protein with steroid and other substrates. **Biochemistry**, v.37, n.40, p.14326-36, Oct. 1998.
- 19 BUCKMAN, J.; MILLER, S. M. Transient kinetics and intermediates formed during the electron transfer reaction catalyzed by *Candida albicans* estrogen binding protein. **Biochemistry**, v.39, n.34, p.10521-31, Aug. 2000. Disponível em: <http://pubs.acs.org/isubscribe/journals>.
- 20 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. diagnosis of oral candidosis. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.37-43, Feb. 1990.

- 21 BURFORD-MASON, A. P.; WEBER, J. C. P.; WILLOUGHBY, J. M. T. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in healthy subjects. **J Med Vet Mycol**, v.26, n.1, p.49-56, Feb. 1988.
- 22 BYDLOWSKI, S. P. Fisiologia da gônada feminina. In: DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicado às ciências da saúde**. 4.ed. São Paulo: Robe, 1999. Cap.80, p.1112-28.
- 23 BYKOV, V. L. Velocity of *Candida albicans* invasion into host tissues. **Mycoses**, v.34, n.7/8, p.293-6, July/Aug. 1991.
- 24 CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, v.9, n.7, p.327-35, July 2001. Disponível em: <http://tim.trends.com>.
- 25 CAMPISI, G. et al. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.93, n.3, p.281-6, Mar. 2002. Disponível em: <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>.
- 26 CANDIDO, R. C. et al. Diferenciação de cepas de *Candida albicans* pelo sistema *killer*. **Rev Bras Med Tropical**, v.28, n.4, p.321-4, out/dez. 1995.
- 27 CANNON, R. D. et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res**, v.74, n.5, p.1152-61, May 1995.

- 28 CAPOLUONGO, E. et al. Heterogeneity of oral isolates of *Candida albicans* in HIV-positive patients: correlation between candidal carriage, karyotype and disease stage. **J Med Microbiol**, v.49,n.11, p.985-91, Nov. 2000.
- 29 CASTRO, C. H. M. Modelos animais em osteoporose. In: SZEJNFELD, V. L. **Osteoporose diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000. p.46-53.
- 30 COTTER, G.; KAVANAGH, K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **Br J Biomed Sci**, v.57, n.3, p.241-9, 2000.
- 31 DENNERSTEIN, G. J.; ELLIS, D. H. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v.41, n.3, p.326-8, Aug. 2001.
- 32 DESLAURIES et al. Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.11, n.1, p.45-5, Mar. 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>.
- 33 DEWITT, G. V.; COBB, C. M.; KILLOG, W. L. The acute periodontal abcess: microbial penetration of the soft tissue wall. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.15, n.1, p.38-51, 1985.
- 34 DOUGLAS, L. J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Crit Rev Microbiol**, v.15, n.1, p.27-43, 1987.

- 35 ESSMANN, M.; LARSEN, B. Protective effect of the selective estrogen receptor modulator LY117018 on rat vaginal *Candida albicans* colonization. **Gynecol Obstet Invest**, v.49, n.1, p.57-61, 2000.
- 36 FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral Candidosis. **Clin Dermatol**, v.18, n.5, p.553-62, Sept./Oct. 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>.
- 37 FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **Int J Gynecol Obstet**, v.71, Suppl.1, p.21-7, Dec. 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>.
- 38 FIDEL JUNIOR, P. L.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. **Infect Immun**, v.68, n.2, p.651-7, Feb. 2000. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/reprint/68/2/651.pdf>.
- 39 FIDEL JUNIOR, P. L.; LYNCH, M. E.; SOBEL, J. D. *Candida*-specific Th1-type responsiveness in mice with experimental vaginal candidiasis. **Infect Immun**, v.61, n.10, p.4202-7, Oct. 1993.
- 40 FISHER, A. V.; RINDON-SCHIOTT, C.; PHILIPSEN, H. P. Short-term oral candidosis in rats, with special reference to the site of infection. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v.90, n.1, p.49-57, Feb. 1982.
- 41 FISHER, A. V.; RINDON-SCHIOTT, C.; PHILIPSEN, H. P. Long-term oral candidosis in rats. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v.90, n.3, p.221-7, June 1982.

- 42 FREIRE-GARABAL, M. et al. Effects of amphetamine on development of oral candidiasis in rats. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.6, n.4, p.530-3, July 1999. Disponível em: <http://cdli.asm.org/cgi/reprint/6/4/530.pdf>.
- 43 GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v.13, n.1, p.122-43, Jan. 2000. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/13/1/122>.
- 44 GONZÁLEZ, S. et al. Yeasts in juvenile periodontitis. preliminary observations by scanning electron microscopy. **J Periodontol**, v.58, n.2, p.119-24, Feb. 1987.
- 45 HASENCLEVER, H. F.; MITCHELL, W. O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two groups in *Candida albicans*. **J Bacteriol**, v.82, p.570-3, 1961.
- 46 HASENCLEVER, H. F.; MITCHELL, W. O. Antigenic studies of *Candida*. III. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* group A, group B and *Candida stellatoidea*. **J Bacteriol**, v.82, p.578-81, 1961.
- 47 HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends Microbiol**, v.9, n.12, p.591-6, Dec. 2001. Disponível em: <http://tim.trends.com>.
- 48 HAZEN, K. C. et al. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. **Infect Immun**, v.59, n.3, p.907-12, Mar. 1991.

- 49 HERTZ, D. J. et al. Psychological and physical symptom-formation in menopause. **Psychoter psychoson**, v.19, n.1, p.47-52, 1971.
- 50 HOEGL, L.; OLLERT, M.; KORTING, H. C. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. **J Mol Med**, v.74, n.3, p.135-42, Mar. 1996.
- 51 HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v.147, n.8, p.1997-2005, Aug. 2001. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/reprint/147/8/1997.pdf>.
- 52 IWATA, K. Fungal toxins and their role in the etiopathology of fungal infection. In: ____. **Recent advances in medical and veterinary micology**. Tokyo: Iwata, 1975. p.15-33 apud JORGE, A. O. C. **Efeitos da sialoadenectomia na presença de *Candida albicans* e candidose na cavidade bucal de ratos**. 1991. 235f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1991.
- 53 JONES, J. H.; ADAMS, D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. **Br J Dermatol**, v.83, n.6, p.670-3, Dec. 1970.
- 54 JONES, J. H.; RUSSEL, C. The histology of chronic candidal infection of the rat's tongue. **J Pathol**, v.113, n.2, p.97-100, June 1974.

- 55 JORGE, A. O. C. **Efeitos da sialoadenectomia na presença de *Candida albicans* e candidose na cavidade bucal de ratos.** 1991. 235f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1991.
- 56 JORGE, A. O. C. Presença de *Candida* spp e anticorpos anti-*Candida albicans* na cavidade bucal de pacientes com periodontite crônica do adulto. **Rev Odontol UNESP**, v.26, n.1, p.203-18, 1997.
- 57 JORGE, A. O. C., SALES, N. C. B.; MARTINS, C. A. P. Presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de *Rattus norvegicus*. **Rev Biociênc**, v.3, n.2, p.131-6, jul.-dez. 1997.
- 58 JORGE, A. O. C. et al. Oral candidiasis established in the sialoadenectomized rat. **J Oral Pathol Med**, v.22, n.2, p.54-6, Feb. 1993.
- 59 JORGE, A. O. C. et al. Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. **J Oral Pathol Med**, v.22, n.3, p.138-40, Mar. 1993.
- 60 JORGE, A. O. C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.11, n.4, p.279-85, out./dez. 1997.
- 61 JORGE, A. O. C. et al. Sensibilidade às toxinas *killer* de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com candidose e de indivíduos normais. **Rev Odontol UNESP**, v.29, n.1/2, p.71-80, 2000.

- 62 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In:____. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 22, p.367-88.
- 63 KALO, A.; SEGAL, E. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosa: effect of sex hormones on adherence of yeasts in vitro. **Can J Microbiol**, v.34, n.3, p.224-8, Mar. 1988.
- 64 KALO-KLEIN, A.; WITKIN, S. S. *Candida albicans*: cellular immune system interactions during different stages of the menstrual cycle. **Am J Obstet Gynecol**, v.161, n.5, p.1132-6, Nov. 1989.
- 65 KAMAI, Y. et al. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.11, p.3195-7, Nov. 2001.
- 66 KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **Infect Immun**, v.21, n.1, p.64-8, July. 1978.
- 67 KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. N. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infect Immun**, v.28, n.2, p.464-8, May 1980.
- 68 KINSMAN, O. S.; COLLARD, A. E. Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. **Infect Immun**, v.53, n.3, p.498-504, Sept. 1986.
- 69 KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infect**, v.50, n.4, p. 243-60, Apr. 2002.

- 70 KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **J Oral Rehabil**, v.29, n.3, p.300-4, Mar. 2002.
- 71 LACASSE, M. et al. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. **J Oral Pathol Med**, v.19, n.3, p.136-41, Mar. 1990.
- 72 LACAZ, C. S. (coord) **Candidíases**. São Paulo: EPU, 1980. 190p.
- 73 LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.
- 74 LANCHARES, J. L.; HERNÁNDEZ, M. L. Recurrent vaginal candidiasis changes in etiopathogenical patterns. **Int J Obstet Gynaecol**, v.71, Supl.1, p.29-35, Dec. 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>.
- 75 LANE, T.; GARCIA, J. R. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.34, n.5/6, p.217-20, May/June 1991.
- 76 LEIMOLA-VIRTANEN, R. et al. Estrogen response in buccal mucosa - a cytological and immunohistological assay. **Maturitas**, v.27, n.1, p.41-5, May 1997. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>.
- 77 LEVINE, R. L. et al. Medroxyprogesterone attenuates estrogen-mediated inhibition of neointima formation after balloon injury of the rat carotid artery **Circulation**, v.94, n.9, p.2221-7, Nov. 1996.

- 78 LIU, H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v.4, n.6, p.728-35, Dec. 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>.
- 79 MAGLIANI, W. et al. Yeast *killer* systems. **Clin Microbiol Rev**, v.10, n.3, p.369-400, July 1997.
- 80 MADANI, N. D. et al. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.3, p.922-6, Feb. 1994.
- 81 MANFREDI, M. et al. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. **Oral Microbiol Immunol**, v.17, n.3, p.181-5, Jun. 2002. Disponível em: <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>.
- 82 MARTIN, M. V.; LAMB, D. J. Frequency of *Candida albicans* serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. **J Clin Pathol**, v.35, n.8, p.888-91, Aug. 1982.
- 83 MARTIN, M. V.; CRAIG, G. T.; LAMB, D. J. An investigation of the role of true hypha production in the pathogenesis of experimental oral candidosis. **Sabouraudia**, v.22, n.6, p.471-6, 1984.
- 84 MARTINS, T. As gônadas como órgãos endócrinos reguladores dos caracteres sexuaes. In: ____. **Glandulas sexuaes e hypophyse anterior**. São Paulo 1936. Cap. 2, p.27-78.

- 85 McCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.25, n.2, p.136-44, Apr. 1996.
- 86 McINTYRE, G. T. Oral Candidosis. **Dent Update**, v.28, n.3, p.132-9, Apr. 2001.
- 87 McMULLAN-VOGEL, C. G. et al. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, v.14, n.3, p.183-9, Jun. 1999.
- 88 MOALIC, E. et al. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. **Caries Res**, v.35, n.2, p.149-55, Mar./Apr. 2001.
- 89 MOURAD, S.; FRIEDMAN, L. Pathogenicity of *Candida*. **J Bacteriol**, v.81, p.550-1, 1961.
- 90 MURRAY, P. A. et al. Microbiologic evaluation of AIDS virus associated periodontitis. **J Dent Res**, v.66, sp.iss., p.226, 1987. (Abstract 959).
- 91 NEQUIN, L. G; ALVAREZ, J.; SCHWARTZ, N. B. Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day na 5 day estrous cycles in the rat. **Biol Reprod**, v.20, n.3, p.659-70, Apr. 1979.

- 92 NEVILLE, B. W. et al. Doenças fúngicas e protozoárias. In:____. **Patologia oral & maxilofacial**. Trad. L. C. Moreira et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.6, p.158-75.
- 93 O'GRADY, J. F.; READE, P. C. Role of thermal trauma in experimental oral mucosal *Candida* infections in rats. **J Oral Pathol Med**, v.22, n.3, p.132-7, Mar. 1993.
- 94 OLLERT, M. W. et al. Mechanism of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. **Infect Immun**, v.61, n.11, p.4560-8, Nov. 1993.
- 95 OLSEN, I. Oral adhesion of yeasts. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.45-53, Feb. 1990.
- 96 PENDRAK, M. L.; KLOTZ, S. A. Adherence of *Candida albicans* to host cells. **FEMS Microbiol Lett**, v.129, n.2/3, p.103-14, June 1995.
- 97 PHILIPSEN, H. P.; CLEATON-JONES, P.; FISHER, A. V. Correlative light microscopic and scanning electron microscopic study of completely and incompletely orthokeratinized rat oral epithelium. **Scand J Dent Res**, v.90, n.4, p.255-62, Aug. 1982.
- 98 PISANTY, S.; RAFAELY, B.; POLISHUK. The effect of steroid hormones on buccal mucosa of menopausal women. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.40, n.3, p.346-53, Sep. 1975.
- 99 POLONELLI, L. et al. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J Clin Microbiol**, v.17, n.5, p.774-80, May 1983.

- 100 POWEL, B. L. et al. Estrogen receptor in *Candida albicans*. a possible explanation for hormonal influences in vaginal candidiasis. In: INTERSCIENCE CONFERENCE on ANTIMICROBIAL AGENTS and CHEMOTHERAPY, 23, 1983, v.751, p.222 apud FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **Int J Gynecol Obstet**, v.71, Suppl.1, p.21-7, Dec. 2000.
- 101 RAITIO, M.; PIENIHAKKINEN, K.; SCHEININ, A. Multifactorial modeling for prediction of caries increment in adolescents. **Acta Odontol Scand**, v.54, n.2, p.118-21, Apr. 1996.
- 102 REED, M. F. et al. In vivo effects of *Candida albicans* products on rat oral epithelium. **J Oral Pathol Med**, v.19, n.7, p.326-9, Aug. 1990.
- 103 REICHART, P. A.; SAMARANAYAKE, L. P.; PHILIPSEN, H. P. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. **Oral Dis**, v.6, n.2, p.85-91, Mar. 2000.
- 104 RESENDE, J. C.; RESENDE, M. A.; SALIBA, J. L. Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. **Mycoses**, v.45, n.8, p.306-12, Oct. 2002.
- 105 RICHMAN, U. J.; ARBARBANEL, A. B. Effects of estradiol, testosterone, diethylstilberol and several of their derivations upon the human mucous membrane. **J Am Dent Assoc**, v.30, p.913-19, 1943.

- 106 RICO, H. et al. E. Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitometric study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.90, n.1, p.97-101, May 2000.
- 107 RUSSEL, C.; JONES, J. H. Effects of oral inoculation of *Candida albicans* in the tetracycline-treated. **J Med Microbiol**, v.6, n.3, p.275-9, Aug. 1973.
- 108 RUSSELL, J. I. et al. Caries prevalence and microbiological and salivary caries activity tests in Scottish adolescents. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.18, n.3, p.120-5, June 1990.
- 109 SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. **Oral Candidosis**. London: Wright, 1990. 265p.
- 110 SAMARANAYAKE, Y. U.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p.398-429, Apr. 2001.
- 111 SANDVÉN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.27-36, Feb. 1990.
- 112 SANT'ANA, P. D. et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97,n.2, p.253-7, Mar. 2002.
- 113 SANTONI, G. et al. *Candida albicans* expresses a fibronectin receptor antigenically related to $\alpha 5\beta 1$ integrin. **Microbiology**, v.140, Pt.11, p.2971-9, Nov. 1994.

- 114 SANTOS, E. B. **Efeitos da xerostomia e do tratamento com 4NQO no desenvolvimento de candidose na língua de rato.** 1999. 182f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1999.
- 115 SCHALLER, M. et al. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Mol Microbiol**, v.34, n.1, p.169-80, Oct. 1999.
- 116 SCHALLER, M. et al. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. **J Med Microbiol**, v.50, n.8, p.743-7, Aug. 2001. Disponível em: <http://gateway1.ovid.com:80/ovidweb.cgi>.
- 117 SEGAL, E.; LEHRMAN, O.; DAYAN, D. Adherence in vitro of various *Candida* species to acrylic surfaces. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.66, n.6, p.670-3, Dec. 1988.
- 118 SEGAL, E.; SOROKA, A.; SCHECHTER, A. Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells in vitro and candidal vaginitis. **Saboraudia**, v.22, n.3, p.191-200, 1984.
- 119 SHAKIR, B. S.; SMITH, C. J.; MARTIN, M. V. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the *Wistar* rat. **J Oral Pathol**, v.15, n.7, p.375-80, Aug. 1986.
- 120 SHERMAN, R. G. et al. Oral candidosis. **Quintessence Int**, v.33, n.7, p.521-32, Jul./Aug. 2002.

- 121 SHIMIZU, H. et al. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. **J Endocrinol**, v.154, n.2, p.285-92, Aug. 1997.
- 122 SKOWRONSKI, R.; FELDMAN, D. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Candida albicans*. **Endocrinology**, v.124, n.4, p. 1965-72, Apr. 1989.
- 123 SOBEL, J. D.; CHAIM, W.; LEAMAN, D. Recurrent vulvovaginal candidiasis associated with long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women. **Obstet Gynecol**, v.88, n.4, p.704-6, Oct. 1996.
- 124 SOBEL, J. D.; MULLER, G.; McCORMICK, J. F. Experimental chronic vaginal candidosis in rats. **Saboraudia**, v.23, n.3, p.199-206, Jun. 1985.
- 125 STAIB, F. Serum proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. **Saboraudia**, v.4, n.3, p.187-93, 1965 apud HOEGL, L.; OLLERT, M.; KORTING, H. C. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. **J Mol Med**, v.74, n.3, p.135-42, Mar. 1996.
- 126 STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.3-10, Feb. 1990.
- 127 SULLIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v.141, Pt.7, p.1507-21, 1995.

- 128 TAKAKURA, N. et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. **Microbiol Immunol**, v.47, n.5, p.321-6, 2003.
- 129 TEICHERT, M. C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.93, n.2, p.155-60, Feb. 2002.
- 130 THEAKER, E. D.; DRUCKER, D. B.; GIBBS, A. C. C. The possible influence of the menstrual cycle on the adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in vitro. **Arch Oral Biol**, v.38, n.4, p.353-5, Apr. 1993.
- 131 TOTTI, M. A. G. **Recuperação de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* da cavidade bucal de ratos normais e sialoadenectomizados.** 1994. 119f. Dissertação (Mestrado em Biologia e Patologia Bucodental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1994.
- 132 TOTTI, M. A. G. **Candidose experimental e recuperação de *Candida albicans* na cavidade bucal de camundongos normais e xerostômicos.** 1998. 174f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de concentração Biologia e Patologia Bucodental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1998.
- 133 TOTTI, M. A. G. et al. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats. **J Oral Pathol Med**, v.25, n.6, p.308-10, July 1996.

- 134 WASAN, K. M.; CONKLIN, J. S. Evaluation of renal toxicity and antifungal activity of free and liposomal amphotericin B following a single intravenous dose to diabetic rats with systemic candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, n.8, p.1806-10, Aug. 1996. Disponivel em: <http://aac.asm.org/cgi/reprint/40/8/1806.pdf>
- 135 WATANABE, G.; TAYA, K.; SASAMOTO, S. Dynamics of ovarian inhibin secretion during the oestrous cycle of the rat. **J Endocrinol**, v.126, n.1, p.151-7, July 1990.
- 136 WEBB, B. C. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. **Aust Dent J**, v.43, n.1, p.45-50, Aug. 1998.
- 137 WHITE, S.; LARSEN, B. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. **Cell Mol Life Sci**, v.53, n.9, p.744-9, Sept. 1997.
- 138 WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. A. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. **Oral Dis**, v.6, n.1, p.3-11, Jan. 2000.
- 139 WILSON, K.; ADAIKAN, P. G. As drogas e o sistema reprodutivo. In: PAGE, C. P. et al. **Farmacologia integrada**. Trad. I. C. Gubert. São Paulo: Manole, 1999. Cap.13, p.287-304.
- 140 WINNER, H. I. An experimental approach to the study of infections by yeast-like organisms. **Proc R Soc Med**, v.51, n.7, p.496-99, 1958.

- 141 WU, S. et al. Estrogen receptors and the activity of nitric oxide synthase in the artery of female rats receiving hormone replacement therapy. **Horm Res**, v.53, n.3, p.144-7, 2000.
- 142 YONEDA, N. et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. **Horm Metab Res**, v.30, n.5, p.236-5, May 1998.
- 143 YÜCEL, F. et al. SEM examination of the dorsal lingual papillae of pregnant rats. **Ann Anat**, v.184, n.3, p.2515, May 2002.
- 144 ZHANG, X. et al. Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. **J Infect Dis**, v.181, n.4, p.1441-6, Apr. 2000. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v181n4/991274/991274.web.pdf>.
- 145 ZISKIN, D. E.; BLACKBERG, S. N. The effect of castration and hypophysectomy on the gingivae and oral mucos membranes of rhesus monkeys. **J Dent Res**, v.19, n.4, p.381-90, Aug. 1940.

Anexo A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 028/2001-PA/CEP, sobre "Efeitos dos hormônios ovarianos na presença de *Candida albicans* e candidose na cavidade bucal de ratas", sob a responsabilidade de *[nome]*, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de dezembro de 2001.



Prof. Adj. Paulo Villela Santos Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Anexo B - Constituição dos meios de cultura utilizados neste trabalho

Meio de cultura quimicamente definido, utilizado para prova de assimilação de carboidratos:

Sulfato de Amônia (Reagen).....	5,0g
Fosfato de potássio básico (Merck).....	1,0g
Sulfato de Magnésio (Reagen).....	0,5g
Ágar (Difco).....	20,0g
Água destilada.....	1000mL

O meio foi distribuído em volume de 20mL em tubos de ensaio e esterilizado por autoclavação (121°C por 15 minutos).

Ágar Sabouraud dextrose modificado, utilizado para repique dos isolados de *Candida* e das cepas produtoras de toxinas *killer*.

Peptona (Difco).....	10,0g
Glicose (Difco).....	20,0g
Ágar (Difco).....	20,0g
Água destilada.....	1000mL

O meio foi ajustado ao pH $7,0 \pm 0,2$ a 25°C, esterilizado por autoclavação (121°C por 15 minutos) e distribuído em placas de petri esterilizadas.

Meio de cultura utilizado para verificação do fator *killer*:

Peptona (Difco).....	10,0g
Dextrose (Difco).....	20,0g
Ágar (Difco).....	20,0g
Azul de Metileno.....	30,0g
Tampão ácido cítrico-fosfato.....	1000mL

O meio foi ajustado ao pH $4,5 \pm 0,2$ a 25°C, distribuído em volume de 20ml em tubos de ensaio e esterilizado por autoclavagem (121°C por 15 minutos).

Apêndice A - Valores de peso corporal das ratas pertencentes aos grupos controle e ovariectomizado

Tabela 4 - Pesos corporais (g) das ratas do grupo controle no dia da ovariectomia (peso inicial) e nos dias sete, 14 e 28 após essa cirurgia

Rata	Peso inicial	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
1	260	269	275	288	284
2	246	254	251	262	265
3	234	235	239	251	257
4	236	241	252	254	258
5	250	251	258	267	274
6	222	237	234	249	254
7	241	247	248	254	258
8	259	260	272	286	291
9	219	235	228	241	250
10	243	253	256	277	281
11	210	217	229	238	243
12	276	276	283	291	301
13	259	266	267	282	288
14	274	284	292	297	305
15	253	260	260	272	276
16	231	230	235	245	255
17	235	252	256	267	265
18	229	244	244	257	270
19	241	246	250	258	265
20	244	259	255	273	281
Média ± DP	243,10 ± 17,25	250,80 ± 16,21	254,20 ± 17,36	265,45 ± 17,38	271,05 ± 17,10

Tabela 5 - Pesos corporais (g) das ratas do grupo ovariectomizado no dia da ovariectomia (peso inicial) e nos dias sete, 14 e 28 após essa cirurgia

Ratas	Peso inicial	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
1	265	263	292	302	321
2	242	249	276	289	312
3	225	229	253	265	274
4	244	248	265	275	289
5	238	242	254	264	278
6	271	277	312	318	333
7	237	242	269	275	291
8	253	242	272	284	298
9	287	296	323	332	355
10	266	256	275	287	308
11	275	272	279	294	309
12	277	263	279	309	321
13	256	255	269	289	309
14	251	248	273	288	302
15	277	276	297	314	330
16	235	239	260	282	296
17	284	291	304	321	337
18	268	270	289	312	332
19	297	286	308	329	351
20	266	268	291	307	325
Média ± DP	260,70 ± 19,65	260,60 ± 18,66	282,00 ± 19,48	296,80 ± 20,31	313,55 ± 22,47

Apêndice B - Níveis plasmáticos de estradiol e progesterona das ratas dos grupos controle e ovariectomizado

Tabela 6 - Concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) das ratas dos grupos controle e ovariectomizado

Ratas	Controle	Ovariectomizado
1	47,26	18,53
2	59,25	17,46
3	53,93	20,30
4	35,16	19,13
5	71,42	18,64
6	61,42	16,58
7	85,21	21,51
8	43,48	18,93
Média ± DP	57,14 ± 16,00	18,88 ± 1,53

Tabela 7 - Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) das ratas dos grupos controle e ovariectomizado

Ratas	Controle	Ovariectomizado
1	12,92	3,90
2	18,02	4,50
3	14,16	4,40
4	9,49	4,40
5	20,90	3,14
6	17,79	2,70
7	22,13	5,20
8	10,80	3,50
Média ± DP	15,78 ± 4,64	3,96 ± 0,81

Apêndice C - Dados obtidos na análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por *Candida*

Tabela 8- Escores médios obtidos na análise semi-quantitativa da colonização do epitélio por *Candida*, realizada nos grupos controle e ovariectomizado, em relação aos períodos de sacrifício de 6 horas, 24 horas e 7 dias após a inoculação de *C. albicans*

Ratas	6 horas		24 horas		7 dias	
	Controle	Ovariectomizado	Controle	Ovariectomizado	Controle	Ovariectomizado
1	2,45	0,54	2,07	1,11	0,05	0,00
2	1,13	0,80	1,29	1,38	0,01	0,00
3	0,52	0,34	1,54	1,73	0,16	0,01
4	1,18	0,80	0,57	0,52	0,16	0,05
5	0,73	0,20	0,98	0,36	0,14	0,14
6	1,00	0,59	1,59	0,16	0,05	0,25
7	1,46	0,45	0,77	0,54	0,00	0,00
8	0,14	0,36	1,39	0,23	0,17	0,00
9	0,23	0,00	0,39	1,02	0,00	0,00
10	0,14	0,07	0,16	0,32	0,00	0,053
Mediana	0,86	0,40	1,13	0,52	0,05	0,00

Apêndice D - Dados obtidos na recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal de ratas controles e ovariectomizadas

Tabela 9- Logaritmo do número das ufc/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal de ratas controles após a inoculação desse microrganismo, nos diversos períodos de observação

Ratas n=10	Tempo após inoculação de <i>C. albicans</i> (dias)									
	1	2	5	7	22	37	52	67	82	97
1	4,72	3,87	4,43	1,84	3,00	1,30	1,30	0	0	-
2	4,65	4,82	4,47	3,53	3,47	1,47	2,20	2,23	0	0
3	5,19	4,87	4,39	1,54	1,39	1,00	2,07	0	0	-
4	4,70	4,28	4,88	2,17	3,64	0	2,43	0	0	-
5	4,49	4,24	4,48	1,54	1,39	0	0	-	-	-
6	5,21	3,88	5,03	3,43	1,77	1,84	0	0	-	-
7	4,48	4,81	3,69	3,68	2,00	1,30	0	0	-	-
8	4,42	3,94	4,11	1,90	1,87	1,95	0	0	-	-
9	4,49	4,15	4,39	2,11	2,33	1,39	0	0	-	-
10	4,43	3,96	3,78	1,87	3,79	1,17	0	0	-	-
Média ± DP	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,4	4,3 ± 0,4	2,3 ± 0,8	2,4 ± 0,9	1,1 ± 0,6	0,8 ± 1,0	0,2 ± 0,7	0	0

Tabela 10- Logaritmo do número das ufc/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal de ratas ovariectomizadas após a inoculação desse microrganismo, nos diversos períodos de observação

Ratas n =10	Tempo após inoculação de <i>C. albicans</i> (dias)						
	1	2	5	7	22	37	52
1	2,32	2,00	3,67	2,00	1,00	0	0
2	1,00	3,62	2,38	1,17	0	0	-
3	1,65	3,69	2,39	2,00	0	0	-
4	2,31	4,18	3,85	1,87	1,00	0	0
5	3,70	4,28	3,95	2,23	1,00	0	0
6	1,84	3,86	2,24	1,30	0	0	-
7	1,00	2,20	3,69	1,47	1,00	0	0
8	1,00	4,06	3,61	1,74	0	0	-
9	1,00	3,89	2,43	2,38	1,00	0	0
10	4,02	4,34	3,48	2,07	0	0	-
Média ± DP	1,99 ± 1,12	3,61 ± 0,83	3,32 ± 0,68	1,82 ± 0,39	0,50 ± 0,52	0	0

JUNQUEIRA, J. C. **Experimental candidosis and recovery of *C. albicans* in the oral cavity of ovariectomized rats.** 2003. 143f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2003.

ABSTRACT

*The purpose of this work was to observe the development of candidosis and the recovery of *C. albicans* from the oral cavity of control and ovariectomized rats. Hundred twenty-four rats originally negative for the *Candida* spp. in the oral cavity were divided into two groups: control and ovariectomized. In each group, four rats were used for tongue dorsum morphologic analysis by optical microscope and scanning electron microscope; and 58 rats received inoculations of *C. albicans* for the study of candidosis and recovery of yeasts. The development of candidosis on the tongue dorsum was observed in optical microscope and scanning electron microscope in the periods of six hours, 24 hours, seven days and 15 days after the last inoculation. The recovery of *C. albicans* was performed through oral samples collected at one, two, five, seven days and progressively at each 15 days until negative cultures for the yeasts were obtained. The results were statistically analyzed by the t-student and Mann-Whitney tests. The tongue dorsum of the control and ovariectomized rats, not infected by *Candida*, presented normal aspect. Among the infected rats, the ovariectomized group showed less quantity of candidosis lesions in relation to control. The recovery of *C. albicans* from the oral cavity of ovariectomized animals was lower in relation to control in all periods of observation. It could be concluded that candidosis and recovery of *C. albicans* in the oral cavity of rats were less frequent in the ovariectomized group in relation to control.*

Key-words: Candida albicans; candidiasis; rats; ovariectomy

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

São José dos Campos, 09 de fevereiro de 2004


Juliana Campos Junqueira