



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



**Vinicius Tatsuyuji Sakima**

**Colonização de *Candida* spp. no palato de ratos induzida por dispositivo  
acrílico intrabucal**

**Araraquara**

**2020**



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



**Vinicius Tatsuyuji Sakima**

**Colonização de *Candida* spp. no palato de ratos induzida por dispositivo  
acrílico intrabucal**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Prótese.

**Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**

**Araquara**

**2020**

S158c Sakima, Vinicius Tatsuyuji  
Colonização de Candida spp. no palato de ratos induzida por dispositivo acrílico intrabucal / Vinicius Tatsuyuji Sakima. -- Araraquara, 2020  
83 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara  
Orientador: Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Ratos. 2. Estomatite sob prótese. 3. Candida albicans. 4. Candida glabrata. 5. Candida tropicalis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Vinicius Tatsuyuji Sakima**

**Colonização de *Candida* spp. no palato de ratos induzida por dispositivo  
acrílico intrabucal**

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral.**

Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 18 de dezembro de 2020.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Vinicius Tatsuyuji Sakima**

NASCIMENTO: 27/01/1990 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Tatsunobo Sakima e Edna Shisue Simabukulo Sakima

2010 - 2014

Graduação em Odontologia.

Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, FOB-USP, Brasil.

2015 - 2017

Mestrado em Reabilitação Oral.

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Brasil.

2017 - 2020

Doutorado em andamento em Reabilitação Oral.

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Brasil.

2019 – 2020

Especialização em andamento em Prótese Dentária.

Faculdade de Odontologia de APCD – FAOA, Brasil.

## Dedicatória

Dedico este trabalho:

À minha noiva **Marcela Borsatto Queiroz**, com muito amor, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos bons e ruins.

Aos meus pais **Tatsunobo Sakima** e **Edna Shisue Simabukulo Sakima**, com muito carinho, que sempre me apoiaram e me incentivaram para que eu pudesse estar aqui hoje.

Aos meus avós **Fernando Simabukulo** e **ShigueWaki Simabukulo**, com muito amor, que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus irmãos **Sarah Ayumi Sakima** e **Victor Tatsuyuri Sakima**, que estão sempre comigo em todos os momentos me ajudando e me aconselhando.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, pela minha orientação, oportunidade e ajuda ao longo de toda a minha trajetória na pós-graduação.

Agradeço especialmente ao professor **Paulo Sergio Cerri** e à pesquisadora **Paula Aboud Barbugli**, pela contribuição com a minha pesquisa.

À **minha família**, Marcela Borsatto Queiroz, Tatsunobo Sakima, Edna Shisue Simabukulo Sakima, Fernando Simabukulo, ShigueWaki Simabukulo, Sarah Ayumi Sakima e Victor Tatsuyuri Sakima.

Aos **meus amigos da pós-graduação**, Jefferson, Elkin, Yuliana, Thaís, Amanda, Letícia e a **todos os colegas do Laboratório de Microbiologia** do quarto andar.

Agradeço à **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)- UNESP**, pela oportunidade de realizar meu doutorado.

Agradeço à **CAPES**: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À **FAPESP**- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº2018/02513-9) pelo apoio financeiro essencial para realização desta pesquisa.

Sakima VT. Colonização de *Candida* spp. no palato de ratos induzida por dispositivo acrílico intrabucal [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a candidíase bucal em palato de ratos induzida por dispositivo acrílico intrabucal (DAI-B) e *Candida* spp. Os DAI-Bs adaptáveis à mucosa palatina foram confeccionados a partir da moldagem individual da maxila de cada rato, sendo retidos por cimentação nos molares superiores. Um total de 84 ratos Wistar machos e fêmeas foram divididos em 9 grupos (n=5) com a utilização ou não dos DAI-B's (Controle negativo, CN, n=2) e com a presença ou não (Controle Dispositivo, CD) de inoculação simples ou mista de *C. albicans* (Ca), *C. glabrata* (Cg) e/ou *C. tropicalis* (Ct). Após 35 dias de uso do DAI-B, o palato dos animais foi fotografado (análise macroscópica), os microrganismos da mucosa do palato e dos DAI-B foram cultivados para contagem de colônias (UFC/mL) e o sangue foi coletado por punção da artéria renal (para análise de leucócitos, neutrófilos e linfócitos). A mucosa foi removida para avaliação histopatológica e então os animais foram eutanasiados. Os dados de UFC/mL e contagem de células presentes no sangue foram submetidas a uma análise estatística inferencial. As imagens histopatológicas e macroscópicas foram analisadas descritivamente. Os valores recuperados da cavidade oral dos animais machos do grupo para CD, Ca, Cg, Ct, CaCg, CaCt, CgCt e CaCgCt em meio Sabouroud dextrose Agar (SDA) foram  $2,02 \pm 0,78$ ;  $3,75 \pm 0,71$ ;  $4,14 \pm 0,2$ ;  $2,93 \pm 0,36$ ;  $3,37 \pm 0,81$ ;  $2,71 \pm 0,46$ ;  $2,52 \pm 0,8$ ;  $4,0 \pm 0,78$  Log<sub>10</sub>(UFC/mL), e para as fêmeas foram  $1,7 \pm 0,65$ ;  $3,31 \pm 0,7$ ;  $3,08 \pm 0,53$ ;  $3,17 \pm 0,41$ ;  $3,40 \pm 0,97$ ;  $3,36 \pm 0,78$ ;  $3,16 \pm 0,85$ ;  $4,33 \pm 0,75$  Log<sub>10</sub>(UFC/mL), respectivamente. Já os valores recuperados nos dispositivos dos animais machos em meio SDA foram  $1,93 \pm 0,67$ ;  $4,189 \pm 0,71$ ;  $4,3 \pm 0,45$ ;  $3,15 \pm 0,45$ ;  $3,59 \pm 0,42$ ;  $3,34 \pm 0,42$ ;  $3,38 \pm 0,9$ ;  $4,34 \pm 0,76$  Log<sub>10</sub>(UFC/mL), e para as fêmeas foram  $1,64 \pm 0,88$ ;  $4,29 \pm 0,65$ ;  $3,34 \pm 0,93$ ;  $3,98 \pm 0,42$ ;  $3,78 \pm 0,52$ ;  $3,96 \pm 0,31$ ;  $3,76 \pm 0,85$ ;  $4,2 \pm 0,52$  Log<sub>10</sub>(UFC/mL) para os grupos CD, Ca, Cg, Ct, CaCg, CaCt, CgCt e CaCgCt, respectivamente. A microbiota total teve um aumento de  $0,78$  Log<sub>10</sub>(UFC/mL) para os machos e  $0,9$  Log<sub>10</sub>(UFC/mL) para as fêmeas após a utilização do dispositivo. A microbiota fúngica na cavidade do palato teve um valor maior nos animais do grupo Ca, Cg, CaCg, CaCgCt. No dispositivo, o grupo CD apresentou-se menor em relação aos demais grupos. A microbiota recuperada foi semelhante entre os sexos. Na análise macroscópica os animais apresentaram sangramento na região de sulco gengival. Não foi observada a presença de células inflamatórias nem fúngica na análise histopatológica. Na análise de sangue, os animais apresentaram valores similares de leucócitos, neutrófilos e linfócitos entre os grupos, porém diferentes entre os sexos. A estomatite protética não foi induzida nos animais.

**Palavras-chave:** Ratos. Estomatite sob prótese. *Candida albicans*. *Candida glabrata*. *Candida tropicalis*.

SakimaVT. Colonization of *Candida* spp. in the palate of rats induced by an intraoral acrylic device [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate oral candidiasis in rats induced by an acrylic intra-oral device (AI-OD) and *Candida* spp. The AI-OD's adaptable to the palatal mucosa were made from the individual impression of the maxilla of each rat and retained by cementation in the superior molars. A total of 84 male and female Wistar rats were divided into 9 groups (n=5) with or without (Negative control, CN n=2) and the use of AI-OD's and with the presence or not (Device control, CD) of single or mixed inoculation of *C. albicans* (Ca), *C. glabrata* (Cg) and *C. tropicalis* (Ct). After 35 days of using the AI-OD, the animal's palates were photographed (macroscopic analysis), the microorganisms of the palate mucosa and the AI-OD were cultured for colony counting (CFU/mL) and the blood was collected by cardiac puncture (for analysis of leukocytes, neutrophils and lymphocytes). The mucosa was removed for histopathological evaluation and then the animals were euthanized. UFC/mL data and blood cell count were subjected to inferential statistical analysis. Histopathological and macroscopic images were analyzed descriptively. The values recovered from the oral cavity of the male animals of the group for C, Ca, Cg, Ct, CaCg, CaCt, CgCt and CaCgCt in SDA medium were 2,02 ±0,78; 3,75 ±0,71; 4,14 ±0,2; 2,93 ±0,36; 3,37 ±0,81; 2,71 ±0,46; 2,52 ±0,8; 4,0 ±0,78 Log<sub>10</sub>(CFU/mL), and for females it was 1,7 ±0,65; 3,31 ±0,7; 3,08 ±0,53; 3,17 ±0,41; 3,40 ±0,97; 3,36 ±0,78; 3,16 ±0,85; 4,33 ±0,75 Log<sub>10</sub>(CFU/mL), respectively. The values recovered in the devices of the male animals in SDA medium were 1,93 ±0,67; 4,189 ±0,71; 4,3 ±0,45; 3,15 ±0,45; 3,59 ±0,42; 3,34 ±0,42; 3,38 ±0,9; 4,34 ±0,76 Log<sub>10</sub>(CFU/mL), and for females it was 1,64 ±0,88; 4,29 ±0,65; 3,34 ±0,93; 3,98 ±0,42; 3,78 ±0,52; 3,96 ±0,31 3,76 ±0,85; 4,2 ±0,52 Log<sub>10</sub>(CFU/mL) for C, Ca, Cg, Ct, CaCg, CaCt, CgCt and CaCgCt groups, respectively. The total microbiota increased by 0.78 Log<sub>10</sub>(UFC / mL) for males and 0.9 Log<sub>10</sub>(UFC / mL) for females after using the device. The fungal microbiota in the palate cavity had a higher value in the animals of the group Ca, Cg, CaCg, CaCgCt. In the device, the CD group showed a lower level compared to the other groups. The recovered microbiota was similar between genders. In macroscopic analysis, the animals showed bleeding in the gingival sulcus region. The presence of inflammatory or fungal cells was not observed in the histopathological analysis. In the blood analysis, the animals showed similar values of leukocytes, neutrophils and lymphocytes between groups, but different between genders. Prosthetic stomatitis was not induced in animals.

**Keywords:** Rats. Stomatitis, denture. *Candida albicans*. *Candida glabrata*. *Candida tropicalis*.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	09
2 PROPOSIÇÃO .....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 <i>Candida</i> spp.....	15
3.2 Uso de Dispositivo Intrabucal em Modelo Animal .....	17
3.3 Inoculação de <i>Candida</i> spp. Através de um Dispositivo em Modelo Animal .....	22
4 MATERIAL E MÉTODO .....	29
4.1 Material .....	29
4.2 Método .....	33
4.2.1 Animal.....	33
4.2.2 Verificação de <i>Candida</i> spp. na cavidade bucal dos animais ...	33
4.2.3 Manipulação dos animais e mensuração da massa corpórea ...	34
4.2.4 Confeção dos dispositivos intrabucais .....	34
4.2.5 Cultivo de <i>Candida</i> spp. e grupos experimentais .....	36
4.2.6 Colocação dos dispositivos intrabucais e Inoculação de <i>Candida</i> spp. ....	41
4.2.7 Remoção dos dispositivos, coleta de sangue, eutanásia e retirada da mucosa do palato .....	42
4.2.8 Preparo das lâminas histológicas .....	43
4.2.9 Avaliação histopatológica.....	43
4.3 Análise Estatística .....	44
5 RESULTADO .....	45
5.1 Perda de Animais.....	45
5.2 Microbiota Inicial .....	45
5.3 Controle de Peso dos Animais .....	46
5.4 Inóculos e Padronização dos Inóculos Mistos.....	47
5.5 Quantificação de <i>Candida</i> spp. nos Dispositivos In Vitro.....	48
5.6 Recuperação dos Microrganismos .....	50
5.7 Análise do Hemograma .....	56
5.8 Análise Macroscópica .....	58
5.9 Análise Histopatológico .....	61
6 DISCUSSÃO .....	64
7 CONCLUSÃO .....	68
REFERÊNCIAS .....	69
ANEXO.....	74
APÊNDICES .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

A candidíase bucal relacionada à utilização de próteses removíveis, parciais ou totais, é denominada estomatite protética e considerada a lesão mais comum entre os usuários dessas próteses<sup>1</sup>, com maior prevalência em mulheres<sup>2,3</sup>. Clinicamente, a estomatite protética é uma lesão eritematosa da mucosa do palato sob a área da prótese, que varia de pontos hiperêmicos (tipo I), áreas eritematosas (tipo II) até hiperplasia do palato (tipo III)<sup>4</sup>. A etiologia da estomatite protética é multifatorial, associada a trauma causado por má adaptação da prótese<sup>4</sup>, redução do fluxo salivar (xerostomia)<sup>4</sup>, higienização bucal precária, uso da prótese durante o sono, além de condições sistêmicas, como diabetes<sup>5</sup>, uso prolongado de antibióticos, medicamentos e condições sistêmicas imunossupressoras<sup>6</sup>. Apesar desses fatores, a infecção por *Candida* spp., especialmente *C. albicans*, é considerada o principal fator etiológico<sup>5</sup>. Esses microrganismos têm elevada afinidade ao acrílico da prótese, onde se aderem e se desenvolvem na forma do biofilme<sup>7,8</sup>.

Biofilmes são comunidades de microrganismos altamente organizadas que podem colonizar uma superfície biótica ou abiótica. Eles são envolvidos em uma matriz polimérica extracelular produzida pelos próprios microrganismos, a qual favorece relações simbióticas e permite a sobrevivência em ambientes hostis<sup>9</sup>. Sua formação se inicia com a aderência dos microrganismos livres a uma superfície. Esses colonizadores primários facilitam a aderência de outras células por proporcionar diversos sítios de adesão e por iniciar a síntese da matriz que mantém o biofilme coeso. As infecções microbianas de uma forma geral estão fortemente associadas a biofilmes, o que confere às células que os compõem interações benéficas mútuas, maior proteção contra as defesas do hospedeiro, além de propriedades fenotípicas distintas das células livres (planctônicas) e maior tolerância aos agentes antimicrobianos<sup>10</sup>.

Dentre as espécies de *Candida*spp. isoladas de estomatite protética, *C. albicans* é a espécie mais prevalente<sup>5</sup> que vive como comensal em diversas regiões do organismo na maioria dos indivíduos saudáveis. Essa espécie tem a capacidade de se desenvolver em diversas formas morfológicas, que variam desde células leveduriformes (blastóporos) comensais até células filamentosas, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas)<sup>11</sup>. Este polimorfismo celular está

relacionado à patogenicidade das células de *C. albicans*, pois, uma vez caracterizadas na forma filamentosa, a invasão do epitélio ocorre por endocitose ou penetração ativa do fungo, ocasionando o aparecimento das infecções<sup>12</sup>. A endocitose é um processo mediado pelas células epiteliais e não necessita de que as hifas estejam vivas, uma vez que células não viáveis também sofrem esse processo. Já a penetração ativa é um processo realizado pela hifa, a qual necessita estar viável para penetrar entre as junções celulares ou entre as camadas epiteliais<sup>12</sup>. Além disso, enzimas secretadas pelo microrganismo estão relacionadas à sua patogenicidade, como proteinases e fosfolipases que hidrolisam ligações peptídicas e fosfolipídeos das células do hospedeiro<sup>13</sup>.

Além de *C. albicans*, outras espécies do gênero *Candida* têm sido encontradas em pacientes com estomatite protética, como *C. glabrata* e *C. tropicalis*, as quais são consideradas as espécies mais prevalentes após *C. albicans*<sup>14-16</sup>. Essas espécies têm sido frequentemente isoladas em casos de candidemia<sup>17-19</sup> e apresentam resistência intrínseca ou menor susceptibilidade aos agentes antifúngicos<sup>20</sup>. Apesar de clinicamente essas espécies serem encontradas juntamente com *C. albicans* em biofilmes mistos na superfície da prótese, a dinâmica entre as diferentes espécies de *Candida* em biofilme misto é pouco estudada<sup>21-23</sup>. Porém, existem evidências de comensalismo em biofilmes mistos de microrganismos associado à *Candida albicans* para facilitar a adesão a um epitélio. As hifas de *Candida albicans* se aderem às paredes epiteliais, e os microrganismos se ligam através dela, via proteínas expressas nas paredes celulares (Adesinas), facilitando a aderência dos microrganismos planctônicos presentes e protegidos pela matriz extracelular de polissacarídeos<sup>22,24</sup>. A *Candida glabrata* por apresentar uma morfologia única, expressa adesinas específicas para estabelecer uma colonização<sup>25</sup>. Estudos prévios in vitro demonstraram relação de antagonismo tanto entre *C. albicans* e *C. dubliensis*<sup>26</sup> como entre *C. albicans* e *C. krusei*<sup>27</sup>, uma vez que espécies cultivadas isoladamente, apresentaram uma maior concentração quando associadas (biofilme misto). As interações competitivas de espécies de fungos são importantes na formação do biofilme<sup>27</sup>. Quando biofilmes mistos de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. albicans* foram expostos a antifúngicos, foi observada a perda da dominância da espécie *albicans*, e as espécies *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentaram menor susceptibilidade ao antifúngico quando comparados aos seus respectivos biofilmes simples<sup>28</sup>.

Embora as infecções mistas de *Candida* spp. ocorram com frequência, o mecanismo de co-adesão e colonização interespecie não é muito bem compreendido<sup>29</sup>. Portanto, a interação entre as espécies de *Candida* no biofilme misto necessita ser melhor esclarecida para o desenvolvimento de terapias efetivas. Também é importante a avaliação *in vivo* desse biofilme misto de *Candida* spp. para se verificar o papel das espécies não-*albicans* na patogênese da candidíase.

Estudos em animais são fundamentais para a compreensão de patologias e avaliação de métodos terapêuticos e profiláticos previamente à realização de pesquisas com humanos, pois permitem condições padronizadas para a realização de um experimento, além de avaliações histopatológicas do tecido, o que não é possível em humanos. Assim, modelos animais de candidíase bucal têm sido utilizados. Estudos anteriores empregaram modelo murino de candidíase bucal, no qual camundongos fêmeas são imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans*, o que resulta em lesões brancas pseudomembranosas no dorso lingual<sup>30</sup>.

Para o estudo da estomatite protética, a utilização de camundongos imunossuprimidos não reflete com precisão a característica eritematosa do palato encontrada clinicamente nesse tipo de candidíase bucal, e nem a condição sistêmica dos usuários de próteses que não são imunocomprometidos. Por isso, desde 1978<sup>31</sup>, alguns estudos têm utilizado dispositivos acrílicos no palato de ratos para indução de candidíase bucal semelhante à estomatite protética verificada em humanos usuários de próteses removíveis. Apesar dos ratos das espécies Wistar e Sprague-Dawley terem sido utilizados para estudo de candidíase bucal induzida por meio de antibioticoterapia, imunossupressão, dieta rica em carboidratos, sialoadenectomia (remoção cirúrgica das glândulas salivares) e uso de animais gnotobiontes (*germ-free*), a maioria dos estudos que utilizam o modelo de candidíase com dispositivo acrílico empregam ratos machos da espécie Wistar<sup>32-34</sup>. Esses estudos demonstram que a colocação do dispositivo acrílico nos animais inoculados com *C. albicans* promove reação inflamatória no palato dos animais<sup>31,33</sup>. A construção de dispositivos individuais para cada animal permite a obtenção de características histológicas com menor variabilidade entre os animais<sup>35</sup>. Porém quando dispositivos dentossuportado e mucossuportado foram comparados, a inoculação com *C. albicans* não promoveu infecção, e alterações epiteliais (aumento da camada celular, diminuição da camada de queratina) foram observadas para ambos os dispositivos<sup>35</sup>.

Somente a colocação do dispositivo em contato íntimo com a mucosa do palato não promoveu alterações inflamatórias nem reabsorção óssea, somente um espessamento das cristas epiteliais<sup>36</sup>. Por outro lado, quando forças oclusais foram aplicadas sobre o dispositivo, alterações histológicas epiteliais e reação inflamatória e reabsorção óssea do palato foram observadas<sup>37,38</sup>.

Diversas formas de retenção e fabricação de dispositivo e dieta dos animais podem influenciar na perda de peso dos animais, uma vez que os animais podem não se adaptar com um dispositivo na cavidade oral, ocasionando uma dificuldade em sua alimentação. Dispositivos retidos por cimentação associados a uma dieta pastosa têm sido propostos para evitar o desconforto do animal<sup>39,40</sup>.

A inoculação de *C. albicans* e a colocação do dispositivo são fundamentais para indução da estomatite protética. Diversos estudos têm relatado alterações epiteliais, hiperplasia do tecido<sup>41</sup>, áreas eritematosas<sup>33,42</sup>, aumento de células mitóticas<sup>43</sup> e aumento da permeabilidade seletiva do epitélio a proteínas de baixo peso molecular<sup>44</sup>. Entretanto, animais somente inoculados ou somente com dispositivos não demonstraram alterações histológicas na mucosa palatina<sup>42</sup>.

Por outro lado, a inoculação de *C. glabrata*<sup>43</sup>, *C. tropicalis*<sup>44</sup> ou *C. Krusei*<sup>45</sup> não promoveu alterações histológicas em animais com dispositivos, somente a colonização do tecido palatino. É possível então que a infecção por espécies não-*albicans* de *Candida* em modelo animal possa ser desencadeada com a presença de *C. albicans*. Entretanto, foi observado que a *Candida glabrata* por si só, não foi possível causar a mesma patologia (dano ao tecido ou inflamação do palato) semelhante à espécie *albicans* e também não aumentou a patogenicidade quando associado à *albicans* em um biofilme misto in vivo<sup>43</sup>.

Todos os estudos que utilizam dispositivos acrílicos para indução de candidíase bucal empregam ratos machos<sup>33,43,46-50</sup>, ao contrário do modelo murino que emprega camundongos fêmeas<sup>51-53</sup>. Como a estomatite protética apresenta maior prevalência no sexo feminino em humanos<sup>2,3</sup>, a comparação dos sexos na validação de um modelo animal é importante para melhor reprodutibilidade desse modelo e sua associação clínica.

Além disso, alguns estudos demonstraram invasão de hifas de *C. albicans* no tecido palatino dos ratos com o uso do dispositivo acrílico<sup>33,41,42,48</sup>, enquanto outros autores afirmam que a estomatite protética não acarreta em invasão fúngica<sup>43,50,54</sup>.

Portanto, essa controvérsia a respeito da invasão fúngica nesse modelo de estomatite protética precisa ser melhor esclarecida.

## 2 PROPOSIÇÃO

Com base nas informações apresentadas, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar o desenvolvimento de candidíase oral em ratos, induzido por dispositivo acrílico inoculado com *Candida* spp. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito de biofilmes simples e mistos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* na indução de candidíase oral in vivo por meio do uso de dispositivo intra-bucal acrílico;
- Comparar a indução de candidíase oral em ratos machos e fêmeas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Candida* spp.

Pathak et al.<sup>23</sup> (2012) estudaram in vitro a interação entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* isolados clínicos, em biofilmes de 24h, formados em corpo de prova de resina acrílica. Para isso, cada espécie foi cultivada em meio Sabouraud dextrose broth (SDB) glicosado, cultivado por 24 horas a 37°C e ajustadas em  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Em seguida, 1 mL de cada suspensão foi misturada mantendo uma concentração final  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Os corpos de provas, então, foram colocados sobre as suspensões fúngicas e incubados por 24 horas para formação do biofilme. A formação de biofilme foi quantificada pela densidade óptica (DO, 570 nm) em ensaios colorimétricos (cristal violeta). A capacidade de formação de biofilme simples de *C. glabrata* apresentou-se maior, enquanto que, *C. albicans* foi o mais baixo. Em biofilmes mistos, observou-se que *C. albicans* teve um impacto positivo na formação de biofilmes em substâncias acrílicas associado à *C. glabrata*. Já *C. krusei* teve um impacto negativo em combinação, quando associada com outra espécie. E quando as quatro espécies foram associadas, a atividade de formação de biofilmes foi severamente prejudicada.

Tati et al.<sup>22</sup> (2016) avaliaram a interação da *Candida glabrata* (Cg) em associação com a *Candida albicans* (Ca) durante o desenvolvimento do biofilme. Sob condições de fluxo dinâmico, a *C. glabrata* sozinha foi incapaz de formar biofilmes dentro da câmara de fluxo, enquanto *C. albicans* formou biofilmes abundantes. No entanto, quando ambas as espécies foram cultivadas juntas, células Cg foram encontradas associadas as hifas de Ca. Em uma análise por Microscopia eletrônica de varredura (MEV), na qual ambas espécies foram incubadas na mesma proporção por 60 minutos, células de Cg não aderiram às células de levedura Ca. No entanto, as células de Cg mostraram forte adesão ao longo do comprimento das hifas germinadas de Ca, mas não aderiram a outras células de Cg. Em um estudo in vivo, onde foi induzido candidíase orofaríngea em camundongos imunossuprimidos, a infecção por Cg sozinha não resultou em nenhum aparecimento clínico de doença ou perda de peso em animais e baixa recuperação de UFC no tecido ( $4 - 7 \times 10^2$  UFC/g). Quando biofilme misto foi utilizado para inoculação da infecção, foi observado um aumento da análise UFC de Cg ( $3 \times 10^3$  UFC/g), mostrando que os

níveis de infecção oral por Cg foram significativamente aumentados por uma infecção oral estabelecida por Ca e a taxa de perda de peso aumentou com a infecção de duas espécies. Durante a análise histológica, línguas de camundongos com infecção mista mostraram formação de placa fúngica robusta, extensa penetração de hifas de Ca no epitélio superficial e invasão em algumas regiões do epitélio subjacente e lâmina própria. Uma inspeção mais detalhada dessas regiões mostrou hifas generalizadas de Ca e, em algumas áreas, as células de levedura foram observadas tanto aderentes a hifas quanto como células soltas que eram provavelmente Cg. Imagens fluorescentes dessas regiões confirmaram que a maioria da invasão de tecido foi com hifas de Ca (vermelho); no entanto células de Cg (verde) também foram observadas dentro desses tecidos, tanto associadas a hifas ou separadas. Em contraste, a infecção por Cg em uma única espécie resultou apenas em placas superficiais muito pequenas que foram localizadas na superfície da mucosa sem qualquer invasão. Assim, a infecção do epitélio oral por Ca e a presença de suas hifas foram permissivas à infecção e invasão tecidual por Cg.

Vipulanandan et al.<sup>28</sup> (2017) desenvolveram uma abordagem quantitativa baseada em transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). Deste modo, foi determinada a composição precisa de biofilmes de espécies mistas de *Candida* spp. formados por isolados clínicos e cepas de laboratório na presença e na ausência de concentrações de três antifúngicos comumente usados: fluconazol, caspofungina e anfotericina B. Foi verificado in vitro que biofilmes monoespécies de *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentaram aumento de população após exposição ao fluconazol, enquanto que *C. albicans* e *C. dubliniensis* mostraram diminuição de suas populações. A exposição à caspofungina aumentou a população dessas espécies, enquanto que a anfotericina B a reduziu. Já quando biofilmes mistos foram avaliados, fluconazol promoveu aumento da população de *C. glabrata*, caspofungina aumentou a população de *C. tropicalis*, e anfotericina B mostrou-se o antifúngico mais efetivo. Esses resultados demonstraram que fluconazol e caspofungina não foram efetivos em biofilme misto, e que somente anfotericina B promoveu redução significativa da população de biofilme misto. Além disso, foi observado que, em biofilmes mistos, *C. albicans* é a espécie dominante, e após a exposição aos antifúngicos essa espécie perde a dominância no biofilme. Apesar da anfotericina B ter sido o antifúngico mais efetivo, também foi constatado que *C. glabrata* e *C. tropicalis* em biofilmes mistos apresentaram menor susceptibilidade a

esse antifúngico quando comparados aos seus respectivos biofilmes simples. Como conclusão, os dados sugerem que o tratamento antifúngico favorece o crescimento de espécies específicas de *Candida* não albicans em biofilmes de espécies mistas.

### **3.2 Uso de Dispositivo Intraoral em Modelo Animal**

Jennings e MacDonald<sup>35</sup> (1990) estudaram um método quantitativo para avaliar as alterações histológicas de ratos que utilizaram um dispositivo intraoral. Para isso, 9 animais foram divididos em dois grupos: controle (n=3) e experimental(n=6). Todos os animais tiveram seu palato moldado a partir de uma moldagem com polisulfeto. Em seguida os dispositivos foram confeccionados por resina acrílica termo-polimerizável (polimetilmetacrilato) e bandas de aço inoxidável retidos nos incisivos superiores. Após 28 dias de uso do dispositivo, os animais foram eutanasiados. Os autores observaram uma grande quantidade de debris entre o dispositivo e o palato. Durante a análise histológica, os autores observaram que a camada epitelial que estava sob o dispositivo apresentou-se mais espessa em relação aos animais que não utilizaram o dispositivo. A construção dos dispositivos individuais para cada animal permitiu a obtenção de características histológicas com menor variabilidade entre eles. Os autores concluíram que os dispositivos construídos podem ser satisfatoriamente usados por ratos durante pelo menos 28 dias, embora o acúmulo de detritos sob eles possa ter sido um problema.

Nakashima et al.<sup>36</sup> (1994) avaliaram alterações histopatológicas no tecido do palato sob base de prótese reembasada sem pressão oclusal em ratos. A base do dispositivo foi projetada para fazer contato com a mucosa palatina do animal sem pressão mecânica e não transmitir força oclusal à mucosa. Os objetivos foram: contato sem pressão da base da prótese com a mucosa palatina e baixo estímulo fisiológico no tecido palatino pela língua e/ou dieta. Para isso, 90 ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: animais com dispositivo e sem dispositivo. O dispositivo foi confeccionado a partir de resina acrílica termopolimerizável para ser suportado apenas na região posterior (sem envolvimento dos incisivos). A cada 3 dias era realizada uma manutenção de limpeza dos dispositivos com o auxílio de um ultrassom. Após um período de 4, 7 e 10 dias e 2, 4, 8, 12, 20 e 28 semanas de uso do dispositivo, os autores observaram que a cobertura da mucosa palatina com uma base do dispositivo sem pressão mecânica e com a boa manutenção (limpeza) do

dispositivo não causou alteração inflamatória e reabsorção óssea nos tecidos de suporte do dispositivo, exceto por uma ligeira reação proliferativa transitória nas cristas epiteliais.

Hara et al.<sup>37</sup> (1996) estudaram as alterações histopatológicas nos tecidos de suporte da prótese em relação à pressão oclusal exercida (assentamento) através de dispositivo experimental. 171 ratos machos Wistar com aproximadamente 15 semanas de vida foram divididos em 3 grupos experimentais e 1 controle. Foram confeccionados dispositivos para serem alojados na região de molares para cada animal, divididos entre os grupos experimentais com pressão de 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$  e 13  $\mu\text{m}$ . As alterações histopatológicas e a intensidade da pressão causadas pela pressão oclusal do dispositivo foram avaliadas. No grupo de 100 e 50  $\mu\text{m}$  de pressão oclusal, foi observado alterações do epitélio e da lâmina própria, infiltrado inflamatório e reabsorção óssea. Nos animais do grupo 13  $\mu\text{m}$  de pressão oclusal, não apresentou-se reação inflamatória nem reabsorção óssea. A partir desses resultados, os autores observaram uma alta correlação entre as alterações histopatológicas sob a base da prótese e a intensidade da pressão oclusal, sugerindo a possibilidade da existência do limiar de reabsorção óssea induzido pela pressão oclusal.

Mori et al.<sup>38</sup> (1997) elaboraram um modelo in vivo em ratos para avaliar os efeitos e alterações histopatológicas que a pressão exercida pela base de prótese removíveis em acrílico podem causar sobre a mucosa do palato. Um total de 161 ratos machos da espécie wistar foram divididos em três grupos experimentais e um grupo controle. Os animais do grupo experimental receberam um dispositivo acrílico intraoral que exercia uma pressão de 1,5, 3,4 ou 4,9KPa sobre a região do palato. Os dispositivos apresentavam em seu interior uma estrutura metálica para fixação bilateral nos molares superiores dos animais e um fio ortodôntico no qual exercia a pressão sobre o palato. Os animais no grupo controle não utilizaram os dispositivos. A constante pressão sobre o palato foi mensurada no momento da instalação do dispositivo, 3 dias após a instalação e a cada semana (1, 2, 4, 8, 12 e 20 semanas). Após cada período de observação, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados para avaliação histológica. Em todos os grupos não foi observado evidências de processos inflamatórios. Os animais que receberam 1,5 KPa de pressão não apresentaram sinais de reabsorção óssea nos diferentes dias de avaliação. Os animais do grupo 3,4 ou 4,9 apresentaram a presença de osteoclastos após alguns

dias, e ao longo das semanas a presença de osteoblastos. Os autores sugeriram a possibilidade de existir um limiar para a reabsorção óssea induzida por pressão contínua sobre a mucosa do palato.

Barclay et al.<sup>55</sup> (1997) investigaram os efeitos de materiais reembasadores em mucosa de palato de ratos a partir de um dispositivo intraoral com recobrimento total do palato. Foram confeccionados dispositivos para 30 animais machos Wistar com retenção nos incisivos, e esses dispositivos foram aliviados na região de contato para serem inseridos os materiais reembasadores (Coe-Soft e Kooliner). A dieta dos animais foi alterada para uma dieta especial em pó com todos os nutrientes necessários, com o intuito de evitar a formação de debris na parte interna do dispositivo. Após 14 dias de uso do dispositivo com o material reembasador, os autores observaram que o material '*hard*' acarretou em maior comprimento da membrana basal em relação ao reembasamento com material '*soft*', e ambos resultaram em maior espessura da camada de queratina em relação ao controle (dispositivos não reembasados).

Saramanayake e Saramanayake<sup>34</sup> (2001) descreveram uma revisão de literatura sobre modelos experimental de candidíase oral em animais, com os seguintes modelos: macacos (*Macaca irus*), ratos (Wistar e Sprague-Dawley), camundongos e hamsters. Ratos, por sua vez, apresentam vantagens em relação ao seu custo de manutenção e fácil manipulação da cavidade oral, quando comparados com outros modelos animais, o que permite facilmente a inoculação e a coleta de amostras. Infecções por *Candida albicans* em ratos podem ser induzidas experimentalmente dentro de algumas semanas sem traumatizar o epitélio da mucosa, com evidências de que esse modelo é satisfatório e consistentemente reproduzível. No entanto, na grande maioria dos estudos levantados, foi preciso administrar antibióticos (por exemplo, tetraciclina) ou imunossupressores para iniciar as lesões. Os achados clínicos e histológicos desse modelo, clínica e microscopicamente são semelhantes ao de humanos. É possível encontrar pequenas lesões brancas de candidíase que podem ser visualizadas na mucosa lingual queratinizada e na mucosa da bochecha. Segundo alguns estudos, é provável que os ratos apresentem *C. albicans* na cavidade oral, embora em menor grau do que os humanos. No entanto, não foi observado estimativas quantitativas de colonização por candidíase da mucosa oral em ratos. Portanto, uma desvantagem do modelo de rato pode ser que o animal possa apresentar *C. albicans* como um

comensal transitório de baixo nível e, portanto, seria difícil compreender a contribuição da resposta imune inata ao processo da doença. Entretanto, pode-se argumentar que tal prevalência natural de *C. albicans* oral imita o ecossistema humano, uma vez que 30 a 50% dos humanos carregam leveduras orais. Os pesquisadores que utilizam este modelo para estudos futuros devem, portanto, ter em mente a importância crítica de descartar a colonização oral natural por *C. albicans* antes da inoculação artificial.

Lee et al.<sup>49</sup> (2011) validaram um dispositivo acrílico removível para roedores composto por duas partes unidas por ímãs: uma fixa e a outra removível. Para a confecção deste dispositivo, primeiramente, os animais foram moldados com silicóna de adição de consistência leve aplicado diretamente sobre o palato abrangendo toda vestibular dos molares superiores, e em seguida, vazado em gesso tipo III. A parte fixa do dispositivo foi confeccionada em resina acrílica autopolimerizável na região posterior do palato sem recobrir as superfícies oclusais dos dentes molares superiores. Então, dois ímãs foram incorporados na parte fixa do dispositivo. Na parte móvel, uma tira de aço inoxidável foi embutida para que se estendesse aos ímãs da parte fixa, formando uma única estrutura. Fios de ligadura ortodônticos foram colocados nos espaços interproximais direito e esquerdo entre o primeiro e o segundo molares nos dois lados, fornecendo estabilidade para a parte fixa. Em seguida, a porção fixa foi cimentada com resina acrílica sobre os dentes molares superiores. A parte móvel foi instalada pelo encaixe da parte fixa. Os animais foram monitorados durante 4 semanas utilizando o dispositivo; todos os animais não apresentaram perda durante esse período, sendo que, ao longo do tempo, alguns animais ganharam peso. Para diminuir o acúmulo de debris na região interna do dispositivo, uma dieta em gel foi utilizada. Os animais utilizaram o dispositivo por mais 8 semanas sem comprometer o peso corporal dos animais.

Meister et al.<sup>40</sup> (2015) desenvolveram um método para construir um dispositivo acrílico intraoral, permitindo que um material de reembasamento fosse adicionado à superfície interna da placa palatina. Quinze ratos (Wistar) fêmeas adultas com 60 dias de vida, pesando entre 150 e 250 g, foram utilizadas para este estudo e alocadas em três grupos: Animais com dispositivos (resina acrílica termopolimerizável); Animais com dispositivos (resina acrílica termopolimerizável) e material reembasador; Animais sem uso do dispositivo. Os dispositivos recobriam todo o palato e eram fixadas na região molar com resina fotopolimerizável e

mantidos por 14 dias. Os animais receberam dieta pastosa e água *ad libitum*. Antes e após o período experimental, os ratos eram pesados individualmente no tempo 0 e após 14 dias de uso da placa palatina. Os autores não observaram diferenças estatísticas em relação ao peso dos animais entre os grupos experimentais do estudo. O dispositivo com a cobertura dos dentes molares e o método de cimentação com resina composta não adesiva proporcionaram boa estabilidade, não perturbando os hábitos alimentares e nutrição dos animais. Os autores observaram as diferenças na morfologia do tecido entre os animais que usaram o dispositivo palatina e os animais que não usaram esse dispositivo. Foi concluído que o uso desse dispositivo poderia esclarecer como as próteses trazem alterações na mucosa palatina dos usuários.

Hotta et al.<sup>39</sup> (2017) avaliaram dois tipos de dispositivo intrabucal e avaliaram a biocompatibilidade de materiais reembasadores (Trusoft) para base de prótese, modificados por um fármaco na mínima concentração inibitória para *Candida albicans*. Um total de 115 ratos foi dividido entre os grupos: sem dispositivo, somente o dispositivo, com dispositivo e reembasador, com dispositivo e reembasador modificado com nistatina (0,032g/mL), com dispositivo e reembasador modificado com diacetato de clorexidina (0,064g/mL), com dispositivo e reembasador modificado com cetoconazol (0,0128g/mL). Além disso, três dispositivos foram avaliados, com e sem fixação nos incisivos a partir de um fio ortodôntico e/ou a cimentação dos dispositivos com fixação dos incisivos que também foi avaliada. Dois tipos de moldagem (Moldagem padrão e individual) e três tipos de alimentação (pastosa, em pó, líquida) também foram avaliados. Para avaliar a biocompatibilidade, a análise histológica foi avaliada de forma quantitativa e qualitativa, utilizando os seguintes parâmetros: comprimento do epitélio, tecido conjuntivo e tecido ósseo dos palatos de cada animal. Após 7 ou 14 dias de uso, foi observado que a dieta em pasta permitiu as melhores condições de sobrevivência dos animais. Quando diferentes formas de retenção e fabricação do dispositivo dos animais foram avaliadas, verificou-se que somente os dispositivos individuais retidos por cimentação associado a dieta pastosa foram os únicos fatores que não acarretaram em perdas de peso. A análise quantitativa mostrou que os animais dos grupos Clorexidina e Nistatina não apresentaram alterações significativas nos parâmetros avaliados em comparação ao grupo controle. Já nos animais do grupo cetoconazol, houve uma redução significativa da espessura da camada queratinizada.

### 3.3 Inoculação de *Candida spp.* Através de um Dispositivo em Modelo Animal

Olsen e Bondevik<sup>31</sup> (1978), avaliaram um modelo experimental de candidose oral em ratos a partir de uma placa de acrílico retida por fio ortodôntico ao redor dos incisivos. Trinta e oito ratos Wistar foram utilizados em duas séries de experimentos com um período de observação de 2 semanas. Em cada uma das séries havia um controle e três grupos experimentais. Os animais do grupo controle não receberam a placa, enquanto os ratos dos grupos experimentais usavam placas não inoculadas ou inoculadas (30mg), ou somente a mucosa do palato inoculado por *Candida albicans* (30mg). Todos os dispositivos foram removidos ao final da primeira semana para avaliar o palato dos animais e reinstalados logo em seguida. Previamente à instalação e após a retirada do dispositivo, foi realizado um esfregaço do palato e do dispositivo para avaliar microscopicamente os microrganismos de *Candida albicans*. Após a primeira semana, um inflamado simples generalizado se desenvolveu no palato da maioria dos animais dos grupos experimentais. Porém, a inflamação foi mais grave e persistente em ratos com placas inoculadas. Sinais histológicos de inflamação e formação de hifas também foram mais evidentes nesse grupo. Foi observado alteração morfológica de blastóporo para hifa, mas não apresentaram invasão no epitélio. Os animais apresentaram uma perda inicial do peso corporal após a instalação das placas, porém, após 10 ou 12 dia, seu peso corporal foi restabelecido. Os autores concluíram que rato da espécie Wistar é adequado para estudos experimentais sobre estomatite dentária.

Shakir et al.<sup>56</sup> (1981) induziram estomatite protética em um modelo animal (ratos wistar); a candidose foi induzida pela inoculação de cepas *Candida albicans* 3091 (sorotipo A) e 3118C (sorotipo B) a partir de um dispositivo acrílico intraoral. 77 ratos Wistar foram divididos em grupos com ou sem inóculo de *Candida albicans*, em diferentes períodos de uso do dispositivo (1, 2, 4 e 6 semanas). Após 1 semana de uso do dispositivo, foi observado que o epitélio palatino mostrou infiltração celular inflamatória aguda e colonização da superfície por blastosporos. Duas semanas após a inoculação, a inflamação aumentou, microabscessos foram observados e hifas fúngicas penetraram na camada de queratina. Após 4 semanas, essas alterações foram intensificadas e o epitélio ficou hiperplásico. Seis semanas após a inoculação, algumas áreas do epitélio eram atróficas e outras hiperplásicas, com

penetração de hifas por fungos. As alterações histológicas no epitélio estavam associadas com presença da placa acrílica palatina. Quando o dispositivo foi removido, 4 semanas após a inoculação, as alterações epiteliais normalizaram após 2 semanas. Porém, os microrganismos na superfície da mucosa persistiram.

Shakir et al.<sup>41</sup> (1983) avaliaram a efetividade de duas cepas diferentes de *Candida albicans* (3091, sorotipo A; 3118C, sorotipo B), duas cepas diferentes de *Candida tropicalis* (3111 e MS1) e *Torulopsis Glabrata* (3240) na indução de estomatite protética em ratos Wistar a partir de um dispositivo intraoral. Para isso, 35 animais foram divididos em 5 grupos (n=7), sendo que cada um recebeu aproximadamente 30 mg de inóculos de umas das cepas com uma concentração de aproximadamente de  $3 \times 10^{20}$  células/mg. Dois animais de cada grupo ficaram sem o dispositivo, somente receberam o inóculo. Foi realizada uma coleta dos microrganismos da cavidade oral antes e após a utilização do dispositivo para contagem de UFC/mL. Após duas semanas de uso, os animais foram eutanasiados e a mucosa foi submetida a análise histológica. Não foi observado alterações histológicas nos animais que não utilizaram os dispositivos. Os animais dos grupos *C. tropicalis* e com *Torulopsis glabrata* também não apresentaram alterações histológicas. Já os animais do grupo *Candida albicans* (sorotipo A) apresentaram hiperplasia epitelial com infiltrado leucocitário, microabscessos e invasão de hifas fúngicas. Apenas dois animais do grupo *Candida albicans* (sorotipo B) apresentaram sinais similares dos animais do grupo *Candida albicans* (sorotipo A). Os animais do grupo *Candida albicans* (sorotipo A e B) apresentaram hifas na camada epitelial. Já os animais do grupo *Candida tropicalis* e *Torulopsis glabrata* apresentaram microrganismos somente nos animais que utilizaram o dispositivo, sem infiltração do epitélio. Os autores concluíram uma maior patogenia de *Candida albicans*, sendo a cepa do sorotipo A, o mais patógeno.

Shakir et al.<sup>57</sup> (1986) avaliaram o efeito do uso de dispositivos acrílicos sobre a atividade mitótica do epitélio palatal de ratos Wistar, com e sem a inoculação de *C. albicans* induzido por um dispositivo. 35 animais foram divididos em três grupos: Controle (n=5): Animais sem dispositivo; Animais com dispositivos contendo inóculos com *C. albicans*; Animais com dispositivos sem a inoculação. Cinco animais de cada grupo experimental foram eutanasiados 1, 2 e 4 semanas após a instalação dos dispositivos. A mucosa do palato foi removida e a região entre as rugosidades palatinas foram avaliadas histologicamente (análise histopatológica e contagem de

células). Após uma semana de uso dos dispositivos, a espessura do epitélio palatino reduziu em ambos os grupos experimentais, sem diferenças significativas entre eles. Com quatro semanas de uso, a espessura do epitélio queratinizado dos animais que receberam inóculos de *Candida albicans* estava maior em relação aos animais do grupo controle. Durante a contagem de células, foi observada uma atividade mitótica reduzida nos dois grupos que receberam dispositivos, após 1 semana de uso, sem diferença significativa. Após 2 semanas, a atividade mitótica aumentou significativamente para os dois grupos experimentais. No final da quarta semana, somente o grupo inoculado com *Candida albicans* teve seu padrão de atividade mitótica aumentada.

Martin et al.<sup>58</sup> (1987) avaliaram o efeito da *Candida albicans* sobre a permeabilidade da mucosa do palato de ratos. Para isso, os animais receberam dispositivos acrílicos intraoral, com recobrimento de todo o palato e fixados sobre os incisivos superiores utilizando resina acrílica autopolimerizável. Previamente à instalação dos dispositivos, animais do grupo experimental receberam aproximadamente 30 mg de inóculo de *Candida albicans* sobre o palato e base interna do dispositivo. Os animais dos grupos experimentais foram divididos em: Animais que receberam o dispositivo com inóculo uma única vez; Animais que receberam o dispositivo com inóculo por duas semanas até o final do experimento; Animais que receberam os dispositivos inoculados por até 2 semanas e removidos após 2, 4 e 8 semanas. Após esse período, os animais foram perfundidos com uma dose de cloreto de lantânio e então, eutanasiados. A mucosa do palato foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Animais foram adicionados para avaliar as proteínas transudadas do epitélio do palato por eletroforese em gel. Esses animais receberam os mesmos tratamentos descritos anteriormente. Foi observado que os animais do grupo controle apresentaram um depósito de lantânio no interior da camada granulosa, enquanto que os animais que receberam o dispositivo com *Candida albicans* apresentaram o lantânio por todo o epitélio até a camada córnea. Já os animais que receberam os dispositivos por duas semanas e removidos em até 4 ou 8 semanas, apresentaram lantânio apenas entre as células da camada granulosa, concluindo que a barreira de permeabilidade do tecido havia se reparado após a remoção do dispositivo. Na análise em eletroforese, foi observado que o tecido do palato saudável permitiu a passagem de baixas quantidades de proteínas

de baixo peso molecular, enquanto que o tecido dos animais infectados por *Candida albicans* permitiu somente a passagem de proteínas com alto peso molecular.

Nett et al.<sup>33</sup> (2010) desenvolveram e validaram um modelo de estomatite protética em ratos a partir de um dispositivo intraoral; os autores avaliaram o processo de formação do biofilme de *Candida albicans*. Neste estudo, ratos (Sprague-Dawley, SPF, Specificpathogenfree) foram imunossuprimidos com uma dose única de cortisona na concentração de 200 mg/Kg. Os animais receberam uma dieta líquida e submetidos a uma avaliação duas vezes por dia para verificar os sinais inflamatórios e purulentos. Os dispositivos foram confeccionados a partir de um fio ortodôntico colocado sobre o palato e entre dentes molares superiores para obter uma melhor retenção da resina acrílica. Também foi aplicado um gel adesivo de cloreto de benzalcônio sobre os dentes molares para criar retenções na superfície do esmalte dentário. Em seguida, foi utilizada uma espátula metálica (aproximadamente 1mm de espessura) para criar uma área entre o dispositivo e o palato (para inoculação de *Candida albicans*). Resina acrílica autopolimerizável foi manipulada e adicionada sobre o palato recobrando toda vestibular dos molares superiores. Após a polimerização da resina acrílica, a espátula foi removida e uma área de aproximadamente 1mm de espessura e 3mm de largura foi criada. Nesse espaço, foi inoculada uma suspensão fúngica de *Candida albicans* na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Após 6, 24, 48 ou 72hrs de uso do dispositivo, os animais foram eutanasiados, a língua e o palato foram removidos para serem avaliados por ensaio histopatológico, MEV e microscopia de varredura a laser. Além disso, foi realizada a coleta dos microrganismos da cavidade oral e dos dispositivos e plaqueados em meio de cultura específica para determinar a concentração de microrganismos viáveis (UFC/mL). Também foi avaliada a resistência fúngica de triazol e equinocandina administrados por via tópica e sistêmica. Ambos os antifúngicos foram aplicados sobre o a região aliviada do dispositivo por 48 horas, assim como os inóculos. Durante a contagem de células de *Candida albicans*, os autores observaram que com 6h de uso do dispositivo, o valor correspondia a  $2 \log_{10}$  UFC no dispositivo; após 48h esse valor aumentou para  $6 \log_{10}$  UFC no dispositivo. Esses valores corroboraram com os ensaios de MEV e microscopia confocal a laser. Na análise histopatológica, foram observados sinais de inflamação com a presença de invasão de hifas na região do epitélio tecidual. Não foi observada uma redução da carga viável de *Candida albicans* após a aplicação dos antifúngicos.

Toboutiel al.<sup>48</sup> (2016) avaliaram a expressão das aspartil proteases secretadas 2, 5 e 9 (SAPs) a partir de um modelo in vivo com estomatite protética. SAPs são enzimas hidrolíticas extracelulares secretadas pela *Candida albicans*. Essas enzimas estão fortemente associadas aos fatores de virulência desse microrganismo. Para isso, 35 ratos machos (Wistar) foram divididos nos seguintes grupos: Controle (n=5), animais sem dispositivos; Placa (n=15), animais que utilizaram dispositivo, sem a contaminação por *Candida albicans*; e Placa/Candida (n=15), animais que receberam os dispositivos com biofilme. Os animais utilizaram os dispositivos durante 2, 4 e 6 dias. Os dispositivos foram confeccionados em resina acrílica termopolimerizável a partir de uma moldagem individual. Além disso, o dispositivo era retido por fios ortodônticos na região dos incisivos. A formação do biofilme no dispositivo foi preparada previamente à instalação do dispositivo em meio TrypticaseSoyBroth (TSB) a 30°C sob agitação orbital a 180 RPM em *overnight*. Em seguida, esse inóculo foi centrifugado, ressuspenso em meio RPMI 1640 e ajustado na concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL. Os dispositivos foram incubados 90 minutos a 37°C sob agitação a 75 RPM, e em seguida, foram lavados com PBS para remover as células não aderidas e cimentadas nos animais. Após a utilização dos dispositivos, os dispositivos foram removidos, o palato e a língua foram avaliados clinicamente, segundo a classificação de Newton. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue de cada animal para avaliar o hemograma. E por fim, os animais foram eutanasiados, a mucosa do palato e a língua foram removidas para avaliação histopatológica. O dispositivo foi utilizado para avaliar a expressão das SAPs. Os autores observaram que os animais pertencentes ao grupo Placa/Candida apresentaram alterações nas porcentagens de neutrófilo e linfócito comparado com os animais dos outros grupos. Os animais do grupo Placa/Candida após utilizarem o dispositivo por 4 dias, apresentaram uma porcentagem de neutrófilo aumentada em relação aos demais grupos; sinais de inflamação grau I na escala de Newton durante a análise macroscópica; e maiores expressões relativas de SAPs 2, 5 e 9. Na análise histopatológica, os animais apresentaram um epitélio hiperplásico, com hiperortoqueratinização com projeções papilares exofíticas após 4 e 6 dias de uso do dispositivo.

Yano et al.<sup>43</sup> (2019) avaliaram as propriedades de colonização e dano tecidual da *Candida glabrata* quando isolada ou associado à *Candida albicans* em um biofilme formado na superfície interna de um dispositivo intraoral in vivo. Para isso,

dispositivos com partes fixa e removível (através de ímãs) foram confeccionados pelo mesmo método de Lee et al. (2011), seguindo as mesmas condições climáticas e dieta. As cepas utilizadas foram: *Candida albicans* DAY185, derivado prototrófico de SC5314 e *Candida glabrata* LF574.92. Ambas cepas foram cultivadas em caldo extrato-peptona-dextrose (YPD) por 18 horas a 30°C sob agitação magnética a 200 RPM até alcançar a fase estacionária. Após, o inóculo foi lavado em PBS e contados em hemocítmetro. Para inoculação, os ratos foram anestesiados por inalação de isoflurano e inoculados pela aplicação de um gel oral contendo inóculos de *Candida albicans* ou *Candida glabrata* ou as duas espécies juntas na superfície interna do dispositivo. A inoculação foi realizada num total de três vezes separadas por intervalos de três dias, e os ratos foram monitorados semanalmente durante um período de quatro semanas. Os autores observaram uma colonização consistente da *Candida glabrata* utilizando esse dispositivo associado ao gel. A carga fúngica demonstrou uma colonização consistente com *Candida glabrata* isolada no palato e na prótese, semelhante à de *C. albicans*. A inoculação com as duas espécies de *Candida* resultou em um aumento acentuado da carga fúngica de *Candida glabrata*, mas não estatisticamente significativo (10 a 100 vezes em dentaduras e palatos às 2 a 3 semanas após a inoculação). Os níveis de *Candida albicans* não foram afetados pela inoculação com *Candida glabrata*. A *Candida glabrata* não apresentou efeitos potencializadores na virulência de *Candida albicans*.

Sultan et al.<sup>42</sup> (2019) utilizaram um modelo de ratos com estomatite protética induzida por um dispositivo para avaliar uma formulação bioadesiva (tópica oral) antimicrobiana à base de peptídeo K11R-K17R. Para isso, os autores moldaram apenas um animal com polissiloxano de vinil para obter um modelo de trabalho em gesso. Em seguida, esse modelo foi scaneado para se obter um modelo digital. O dispositivo foi desenhado em software para impressão 3D sobre o modelo digitalizado. O dispositivo apresentava uma área entre o palato e a base para acomodação da formulação bioadesiva, um orifício no centro para facilitar a inoculação com *Candida albicans* (SC5314) e perfurações laterais para acomodar material para cimentação na região dos dentes molares. Assim foi possível fazer um dispositivo universal para todos os animais do estudo. Um total de 132 animais foram imunossuprimidos com uma dose única de cortisona (200 mg/kg) no dia da inoculação. Além disso, ampicilina (0,5g/litro) foi adicionado na água de beber dos animais. Foi realizado o condicionamento ácido e adesivo nos molares para

cimentação do dispositivo com resina composta. Previamente a cimentação, os dispositivos foram incubados em uma suspensão fúngica de *Candida albicans* com  $1 \times 10^5$  células/ml durante 120 minutos. Em seguida, uma suspensão de  $1 \times 10^8$  –  $1 \times 10^9$  células/mL de *Candida albicans* foi inoculada através do orifício. Após 96 horas, os animais foram sacrificados, o palato foi avaliado macroscopicamente e histologicamente, e o biofilme do dispositivo foi coletado para análise de contagem de células (UFC). Os autores observaram edema, eritema e inflamação na mucosa do palato, além de placas brancas e densas, indicativas de candidíase oral. Na análise histológica foi observada a presença de fungos na mucosa do palato e da língua na superfície mais externa do epitélio, além de microabscessos e neutrófilos em toda extensão infectada. A recuperação no dispositivo variou entre 3,5 a 5  $\log_{10}$  UFC/mL e no palato entre 2 a 4  $\log_{10}$  células/grama.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Material

Ácido morfolinepropanesulfônico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Ácido periódico de Schiff (PAS, Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Agitador de tubos, Modelo: AP 56 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil) ;

Agulha (25mm x 7mm, BD plastipac, Nova Jersey, Nova York);

Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);

Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);

Álcool 70% (Ciclo farma, Serrana, SP, Brasil);

Álcool Anidro 99,3° (Ciclo farma, Serrana, SP, Brasil);

Autoclave vertical, Modelo: AV 60 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil);

Balança de precisão (GEHAKA – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil);

Balança Digital para animais, modelo: LS5(BONITHER Equipamentos para Ensino e Pesquisa (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil);

Brain-Heart Infusion(BD, Difco, New Jersey,USA)

Broca de carboneto de tungstênio (maxicut nº 1509, American burrs, SC, Brasil

Broca esférica carbide nº 6 (HärtePrecisiongrip, São-paulo, Brasil)

Broca ponta exa-cerapol (EDENTA, Au, Suíça)

Cabo de bisturi reto (TRINKS Instrumentos odontológicos, São Paulo, SP, Brasil);

Câmera Digital (T6i, Canon, Tóquio, Japão).

Cassete Histológico (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil);

Centrífuga de tubos Falcons Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);

Cera 7 Lysanda, ProdutosOdontológicos, São-Paulo, Brasil

CHROMAgar*Candida*(BD, Difco, New Jersey,USA)

Cloreto de Cálcio Dihidratado P.A. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Cloridrato de Ketamina, (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Embu-Guaçu, SP, Brasil);

Cloridrato de Xilazina, (Produtos Veterinários J. A. Ltda., Patrocínio Paulista, SP, Brasil);

Cultura de *Candida albicans* proveniente da “Stanford GenomeTechnologyCenter” (SC) (Stanford University, USA); SC5314

Cultura de *Candida glabrata* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA Número (ATCC number): 2001;

Cultura de *Candida tropicalis* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA Número (ATCC number): 4563;

Dessecador com Tampa e Luva, Modelo: 76335L (Labor QuimiVidrolabor®, Poá, SP, Brasil)

Espectrofotômetro, Modelo: Biospectro SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil);

Estufa bacteriológica, Modelo: MA0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);

Fosfato de sódio monohidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Freezer -80°C (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA);

Gesso tipo III Herodent, Vigodent S.A., Bonsucesso, Rio de Janeiro

Gesso tipo IV Herodent, Vigodent S.A., Bonsucesso, Rio de Janeiro

Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil)

Hematoxilina de Carazzi (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil)

Inclusora em parafina (Modelo EG1150H, LeicaGeosystems, Heerbrugg, Suíça)

Incubadora de bancada shaker, Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Isolamento CEL-LAC (SS WHITE Duflex, São-Cristovão, Rio de Janeiro, Brasil)

Lâmina para microscopia 26x76mm (PERFECTA Lab, São Paulo, SP, Brasil);

Lâminas para bisturi (FREEBACK );

Lamínulas para microscopia, 24X60mm (PERFECTA Lab, São Paulo, SP, Brasil);

Meio de cultura YeastNitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);

Micro-ondas, Modelo: JetDeFrost 27L (Brastemp, São Paulo, SP, Brasil.);

Micropipeta de 100-1000 µL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);

Micropipeta de 20-200 µL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);

Microscópio óptico, Modelo: BX51 (Olympus, Tóquio, Japão);

Micrótomo, Modelo RM2125 (LeicaGeosystems, Heerbrugg, Suíça);

Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);  
Mufla número 6 (OGP, Produtos Odontológicos Ltda., Bragança Paulista, Brasil)  
Panela de pressão NIGRO (Nigro Alumínio Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil)  
Parafina histológica (56<sup>o</sup>-58<sup>o</sup>C) (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);  
Paraformaldeído em pó 95% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);  
Peça-reta micromotor (KAVO, São-Paulo, SP, Brasil)  
Permout (Fisher Chemical™ Permout™, Pittsburgh, PA, EUA)  
Permout (Fisher Chemical™ Permout™, Pittsburgh, PA, EUA);  
Pinça clínica (DUFLEX Equipamentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);  
Pincel de pelo sintético (Preven, Guarapirama, Paraná, Brasil)  
Placa de 24 poços (KASVI, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil)  
Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);  
PoliéterImpregum, 3M, Sumaré, São-Paulo, Brasil  
Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 µL (AxygenScientific, Union City, CA, EUA);  
Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 µL (AxygenScientific, Union City, CA, EUA);  
Resina acrílica autopolimerizável(Clássico, Meliá Paulista, São-Paulo, Brasil)  
Resina acrílica Termopolimerizável (Clássico, Meliá Paulista, São-Paulo, Brasil)  
Roswell Park Memorial Institute 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)  
Sabouraud Dextrose Agar (SDA, AcumediaManufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA);  
Seringa de plástico descartável (BD plastipac, Nova York, EUA)  
Seringa para insulina, marca BD Ultra-Fine II (CBS MEDICO Cientifica S/A, São Paulo, SP, Brasil);  
Swab estéril (Absorve, Cral, Cotia, São Paulo, Brasil)  
Termopolimerizaora (Solab Equipamentos para laboratórios Ltda., Piracicaba, SP, Brasil)  
Tesoura Cirúrgica (Quinelato, Rio Claro, São-Paulo, Brasil)  
Tesoura cirúrgica de ponta fina reta (CBS MEDICO Cientifica S/A, São Paulo, SP, Brasil);  
Tubo a vácuo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (Labor Import, Osasco, São-Paulo, Brasil)

Tubos tipo Falcon de 15 mL, estéril (TPP, Techno PlasticProducts, Trasadingen, Suíça);

Xilol PA 1000mL (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

## 4.2 Método

### 4.2.1 Animal

Para essa pesquisa, foi utilizado um total de 95 animais, porém 11 animais morreram durante o período experimental, os quais foram substituídos. Então, 84 animais, sendo 42 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos e 42 fêmeas, com idade média de 90 dias, pesando aproximadamente 250-300 g e 350-450g, respectivamente. Os animais foram provenientes da Sessão de Biotério da Administração Geral - UNESP Botucatu com 45 dias de vida e alojados no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP até completarem 90 dias de vida. Esses animais foram mantidos em caixas de polipropileno com 2 a 4 animais cada, em ambiente com ciclo de 12/12 h de luz/escuro e temperatura entre 22 e 24°C durante a realização de todos os experimentos. Os animais receberam ração em *pellet* e água *ad libitum* durante todo período experimental. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CEUA número 25/2018, ANEXO A).

Com o objetivo de evitar perda de peso dos animais e favorecer o desenvolvimento e crescimento das *Candida* spp. no meio bucal, foi adicionada uma dieta rica em carboidrato<sup>59</sup>, dois dias previamente à instalação do dispositivo acrílico intra-bucal e fornecido até o dia da eutanásia dos animais. Essa dieta consistiu de uma mistura cozida em panela de pressão a 80°C durante 30min de: 30% de amido, 40% de açúcar, 30% de farinha de milho (fubá). Essa dieta rica em carboidratos foi oferecida no mesmo dia em que os animais foram colocados em gaiolas metálicas individuais para se adaptarem ao ambiente isolado previamente à colocação do dispositivo acrílico.

### 4.2.2 Verificação de *Candida* spp. na cavidade bucal dos animais

Foi realizado um esfregaço durante 1 minuto da cavidade bucal de cada animal através de um *swab* estéril umedecido em 1mL de salina tamponada em fosfato (PBS, NaCl 0,136 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM; KCl 2 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; pH 7,4). Em seguida, o *swab* imerso em PBS foi agitado durante 2 minutos em vórtex e submetido a diluições seriadas, cujas alíquotas de 25 µL foram semeadas em duplicatas em placas de Brain-Heart Infusion (BHI), para quantificação de microbiota

total, CHROMAger *Candida* (CHRO), para identificação presuntiva de *Candida* spp., e de Sabouraud Dextrose Agar com cloranfenicol 0,05 mg/mL (SDA), para quantificação de fungos. Para os meios SDA e CHRO, foram plaqueadas alíquotas na diluição  $10^1$ , já para o meio BHI, as amostras foram plaqueadas na diluição  $10^3$  e  $10^4$ . Essas diluições foram ajustadas nessas concentrações para facilitar a contagem de UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em estufa para crescimento de colônias.

#### **4.2.3 Manipulação dos animais e mensuração da massa corpórea**

Para a realização dos procedimentos intra-bucais, os ratos foram submetidos à anestesia geral com aplicação intramuscular de cloridrato de quetamina a 75 mg/kg, associado a cloridrato de xilazina a 8 mg/kg, sedativo e relaxante muscular de uso animal, respectivamente. A massa corpórea (g) dos animais foi mensurada em balança digital previamente à anestesia. Os animais foram colocados em uma maca estabilizadora na posição supina após serem anestesiados, tendo sua cavidade bucal mantida aberta por meio de alças presas aos incisivos superiores e inferiores<sup>39</sup>, facilitando a visão do operador. A mensuração da massa corpórea de cada animal foi realizada nos dias da moldagem do palato (dia 0), da colocação do dispositivo acrílico intra-bucal (dia 7<sup>o</sup>), uma vez por semana, durante o uso do dispositivo (dia 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 35<sup>o</sup>) e no dia da eutanásia (dia 42<sup>o</sup>).

#### **4.2.4 Confeção dos dispositivos intrabucais**

Foram confeccionados dispositivos intrabucais retidos por cimentação nos molares<sup>39,40,55</sup> cobrindo os dentes posteriores e o palato duro. Primeiramente, foram confeccionadas moldeiras individuais de resina acrílica autopolimerizável a partir de uma moldagem da maxila de um crânio seco (FIGURA 1A) de um rato de 90 dias<sup>39</sup>.

Em seguida, foram realizadas as moldagens das maxilas de cada animal sob anestesia, utilizando-se poliéter. Previamente à moldagem, o adesivo fornecido com o material de moldagem foi aplicado na superfície interna da moldeira individual. O material de moldagem propriamente dito juntamente com o catalisador foram proporcionados em comprimentos iguais, espatulados por 30 segundos e colocados na moldeira individual com adesivo. A moldeira carregada foi então posicionada no

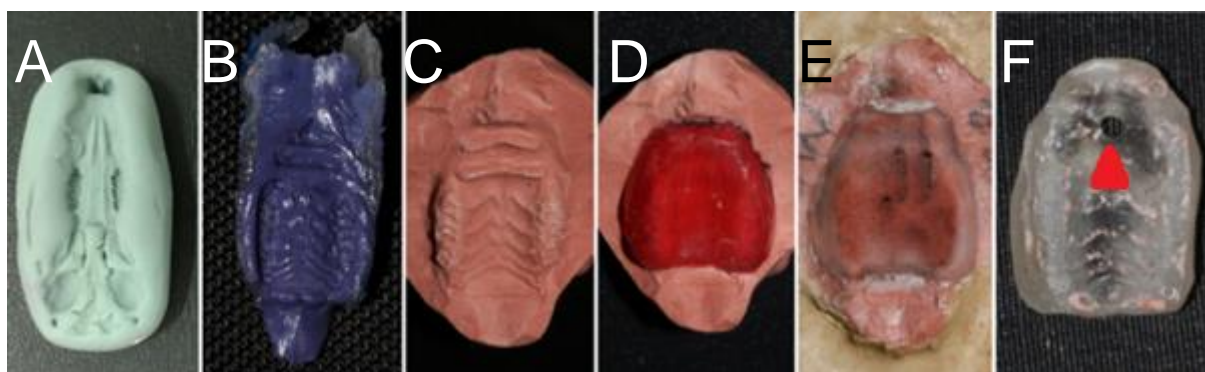
arco dentário superior do animal e mantida em posição até a polimerização do poliéter (aproximadamente 2 minutos, FIGURA 1B). Para a obtenção dos modelos de trabalho (FIGURA 1C), os moldes individuais devidamente identificados foram vazados com gesso especial tipo IV na proporção 0,22 mL água com 0,24 g de pó, espatulados manualmente. Após o vazamento, aguardou-se aproximadamente 40 minutos até a completa cristalização do gesso. E por fim, o modelo foi separado do molde.

Para a obtenção dos dispositivos acrílicos, foi realizado sobre os modelos de gesso o enceramento individual (FIGURA 1D) da região palatina com cera 7 encobrindo os dentes molares até sua face vestibular<sup>39,40</sup>. A extensão do enceramento na região anterior recobriu até a primeira rugosidade palatina e na região posterior até o último molar superior. A espessura da face na região oclusal e vestibular variou em aproximadamente 0,5 mm e, na face palatina, variou aproximadamente 1mm de espessura, mensurada com uma sonda periodontal milimetrada.

Os modelos de gesso com os enceramentos dos dispositivos intra-buciais foram incluídos convencionalmente com gesso tipo III na proporção 0,28 g de pó para 0,30 mL de água, que foram espatulados manualmente e vazados em mufla número 6. Primeiramente, foi vazado o gesso sobre a mufla e até 6 dispositivos foram posicionados, simultaneamente; esperou-se a cristalização do gesso e realizado o isolamento com Cel-lac de toda superfície. Um silicone de condensação densa foi posicionado sobre os modelos para facilitar a desoclusão da mufla após a etapa de polimerização. Em seguida, foi posicionada a contramufla e preenchida com gesso tipo III até o seu limite, e então, a mufla foi fechada e levada para prensa manual até a cristalização do gesso. Após isso, realizou-se a eliminação da cera e limpeza dos modelos incluídos com água fervente a 90°C. Foi realizado o isolamento do gesso novamente com Cel-lac para inserção da resina acrílica termopolimerizável para base de prótese. Para isso, a resina foi proporcionada (2 medidas de pó: 1 medida de líquido, com proporcionador do fabricante) e misturada manualmente segundo as recomendações do fabricante. Aguardou-se a resina alcançar sua fase plástica para ser inserida na região palatina dos modelos de trabalho. Em seguida, foi realizada a prensagem da resina acrílica nas muflas a 1,25 toneladas durante 30 minutos para serem polimerizadas de acordo com o ciclo curto recomendado pelo fabricante (90 minutos a 73°C e 30 minutos a 100°C) em uma

termopolimerizadora<sup>57</sup>(FIGURA 1E). Após a acrilização, foram realizados o acabamento e polimento dos dispositivos intra-buciais com uma peça-reta micromotor e as brocas de carboneto de tungstênio maxicut nº 1509 e ponta exacerapol. A superfície interna do dispositivo foi mantida de acordo com a superfície do modelo, sem polimento desta superfície. Além disso, foi realizado um orifício com uma broca esférica na região da segunda rugosidade do palato, comunicando com a superfície externa do dispositivo<sup>42</sup>(FIGURA 1F). Os dispositivos foram individualmente aliviados na região dos molares com uma peça-reta micromotor e uma broca esférica carbide nº 6 de aproximadamente 0,1mm de espessura. Em seguida, os dispositivos foram mantidos em água destilada à temperatura de 37°C por 48 horas, de acordo com as especificações da *International Organization for Standardization* (ISO 1567, 1998) para resinas acrílicas para base de prótese. Esse procedimento é recomendado para redução da quantidade de monômero residual, bem como para simular condições clínicas<sup>38</sup>. Então, os dispositivos foram imersos individualmente em 200 mL de água destilada estéril e esterilizados por micro-ondas por 3 minutos a 650 Watts<sup>60</sup>.

**Figura 1** - Etapas de confecção do dispositivo acrílico intrabucal



A: Molde de um crânio seco; B: Molde individual da maxila do animal; C: Modelo de trabalho; D: Enceramento do dispositivo sobre o modelo; E: Dispositivo após acrilização; F: Dispositivo acrílico intraoral. Seta: Orifício do dispositivo.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

#### 4.2.5 Cultivo de *Candida* spp. e grupos experimentais

Para a formação de biofilme nos dispositivos e inoculação de *Candida* spp. na cavidade bucal dos animais, foram utilizadas uma cepa laboratorial de *C. albicans*(SC5314, Ca), uma cepa padrão de *C. glabrata* (ATCC 2001, Cg) e uma

cepa padrão de *C. tropicalis* (ATCC 4563, Ct). Cada cepa foi descongelada, plaqueada em SDA por esgotamento e incubada a 37°C por 48 horas.

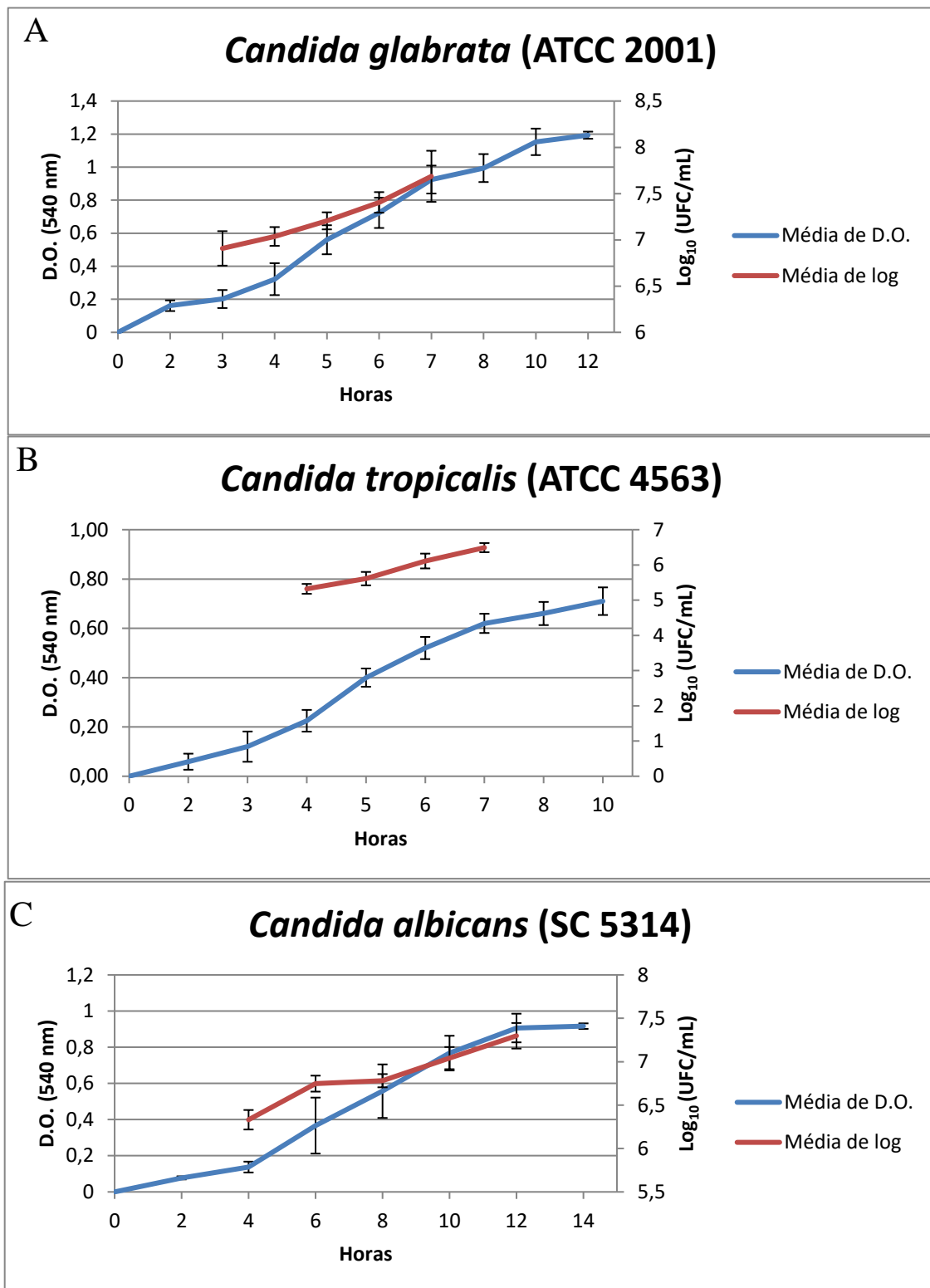
Após esse período, com uma alça estéril de inoculação de 10 µL, foram coletadas de 5 a 7 colônias que foram transportadas para um tubo Falcon de 15 mL contendo 10 mL de meio de cultura YeastNitrogenBroth (YNB) com 100 mM de glicose, que foi incubado a 30°C em *overnight* (16h), resultando em um pré-inóculo. Para preparar o inóculo, 600 µL desse pré-inóculo foi diluído em outro tubo contendo 11,4 mL de YNB (1:10), que foi incubado em estufa a 30°C para o crescimento dos microrganismos até a fase *mid-log* da curva de crescimento (Figura 2). Foram realizadas duas leituras em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm: uma antes e outra após a incubação, no qual foram obtidos dois valores de densidade ótica ( $DO_{inicial}$  e  $DO_{final}$ ). O valor da diferença entre as leituras ( $\Delta DO = DO_{final} - DO_{inicial}$ ) foi utilizado para padronizar a suspensão do inóculo em um valor médio  $\pm$  desvio-padrão (DP) de  $\Delta DO$  de ( $\Delta DO$ : Ca:  $0,536 \pm 0,0624$ ; Cg:  $0,756 \pm 0,038$ ; Ct:  $0,429 \pm 0,0565$ ) correspondente a uma concentração de  $1,38 \times 10^7 \pm 4,95 \times 10^6$ ,  $1,69 \times 10^7 \pm 2,72 \times 10^6$ ,  $3,55 \times 10^6 \pm 8,85 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para Ca, Cg e Ct, respectivamente.

Para a formação do inóculo misto, os inóculos simples foram ajustados na mesma concentração de acordo com o valor de DO de cada espécie de *Candida*, seguindo a curva de crescimento estabelecida previamente. Os inóculos de Ca e Cg foram ajustados sempre na mesma concentração de Ct, uma vez que Ct apresentou valores de DO e UFC/mL inferiores às outras duas espécies. De acordo com a curva de crescimento estabelecida previamente, o inóculo de Ct, em sua fase de *mid-log*, apresentava aproximadamente 1/4 do inóculo de Cg e 2/5 do inóculo de Ca. E o inóculo de Ca representava 1/2 aproximadamente do inóculo de CG. Após, a parte representativa de cada inóculo foi misturada para formar um inóculo misto em um volume final de 10 mL para ser utilizado para inocular cada animal ou formar biofilme no dispositivo, sendo que cada espécie apresentava valores próximos de concentração.

Para formar biofilme nos dispositivos, 10 mL dos inóculos ajustados e padronizados foram lavados duas vezes em PBS, centrifugados (6.000 xg por 10 minutos a 4°C) e ressuspensos em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) com glutamina e fenol vermelho, sem bicarbonato e tamponado em ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS), pH 7,0, e suplementado com glicose

2%. Em seguida, 1mL de cada inóculo (simples ou misto, de acordo como grupo experimental descrito abaixo) foi transferido para poços de uma placa de 24 poços, nos quais os dispositivos estéreis foram incubados por 48 horas a 37°C para formação de biofilme. Sendo que, após 24horas, foi adicionado 1 mL do meio RPMI em cada poço para manter os dispositivos submersos. Os dispositivos do grupo controle ficaram incubados somente em meio RPMI sem *Candida* spp. Após este período, os dispositivos foram lavados duas vezes com PBS.

Figura 2 - Curvas de crescimento de cepas



A: *C. glabrata* ATCC2001; B: *C. tropicalis* ATCC4563; C: *C. albicans* SC5314. As culturas planctônicas foram realizadas em meio YNB suplementado com 100 mM de glicose e incubada a 37°C. A densidade óptica (DO a 540 nm) e a população [ $\log_{10}$ (UFC/mL)] foram determinadas ao longo do tempo.

Fonte: Elaboração própria.

Os animais de cada sexo foram aleatoriamente divididos (Quadro 1) nos seguintes grupos de estudo (n = 5 para cada sexo em cada grupo, com exceção do Controle Negativo que apresenta apenas 2 animais de cada sexo): **Controle Negativo (CN)**: sem dispositivo intrabucal e sem inoculação fúngica; **Controle Dispositivo (CD)**: com dispositivo intrabucal estéril e sem inoculação fúngica; **Grupo *C. albicans* (Ca)**: com dispositivo intrabucal com biofilme e inoculação de *C. albicans*; **Grupo *C. glabrata* (Cg)**: com dispositivo intrabucal com biofilme e inoculação de *C. glabrata*; **Grupo *C. tropicalis* (Ct)**: com dispositivo intrabucal com biofilme e inoculação de *C. tropicalis*; **Grupo *C. albicans* e *C. glabrata* (CaCg)**: com dispositivo intrabucal com biofilme e inoculação de *C. albicans* e *C. glabrata*; **Grupo *C. albicans* e *C. tropicalis* (CaCt)**: com dispositivo intra-bucal com biofilme e inoculação de *C. albicans* e *C. tropicalis*; **Grupo *C. glabrata* e *C. tropicalis* (CgCt)**: com dispositivo intra-bucal com biofilme e inoculação de *C. glabratae C. tropicalis*; **Grupo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (CaCgCt)**: com dispositivo intrabucal com biofilme e inoculação de *C. albicans*, *C. glabratae C. tropicalis*.

**Quadro 1** - Divisão dos animais machos e fêmeas em seus respectivos grupos

<b>Grupos</b>	<b>Machos (n)</b>	<b>Fêmeas(n)</b>
<b>CN</b> (Controle Negativo)	2	2
<b>CD</b> (Controle Dispositivo)	5	5
<b>Ca</b> ( <i>Candida albicans</i> )	5	5
<b>Cg</b> ( <i>Candida glabrata</i> )	5	5
<b>Ct</b> ( <i>Candida tropicalis</i> )	5	5
<b>CaCg</b> ( <i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> )	5	5
<b>CaCt</b> ( <i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i> )	5	5
<b>CgCt</b> ( <i>C. glabrata</i> + <i>C. tropicalis</i> )	5	5
<b>CaCgCt</b> ( <i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> + <i>C. tropicalis</i> )	5	5
<b>TOTAL (N)</b>	42	42
	84	

Fonte: Elaboração própria.

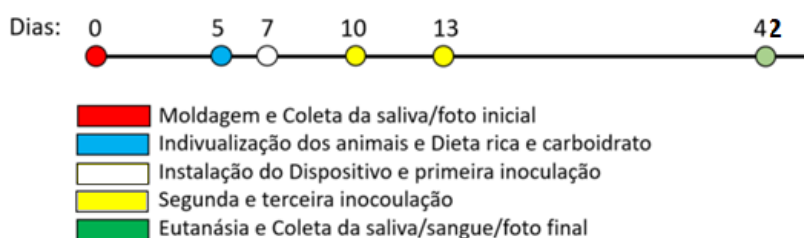
#### 4.2.6 Colocação dos dispositivos intrabucais e Inoculação de *Candida* spp.

Previamente à colocação dos dispositivos, as suspensões fúngicas foram lavadas duas vezes em PBS e centrifugadas (6.000 xg por 10 minutos a 4°C) e o *pellet* foi utilizado para aplicação no palato dos animais, uma vez que a utilização do *pellet* foi mais efetiva que a suspensão fúngica para indução de candidíase bucal por meio de dispositivo<sup>50</sup>. Para a colocação dos dispositivos e inoculação fúngica, os animais foram anestesiados, como descrito anteriormente e mantidos na maca com a cavidade bucal aberta. O palato de cada animal foi fotografado com uma câmera digital para análise macroscópica. As fotografias foram realizadas sempre pelo mesmo operador e as mesmas configurações (ISO: 400, Abertura: F/32, Velocidade Obturador 1/125 segundos) foram utilizadas.

Para a fixação dos dispositivos, resina acrílica autopolimerizável foi inserida nas áreas de alívio da região dos molares por meio de um pincel de pêlo sintético que era molhado no monômero e em seguida aplicado no polímero, para então ser colocado na área de alívio. Então, o dispositivo foi levado à cavidade bucal dos animais anestesiados e mantido em pressão manual até a polimerização da resina<sup>39,55</sup>. Após a instalação, foi realizada a primeira inoculação através do orifício do dispositivo com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Deste modo, o dispositivo não foi removido da cavidade do palato até a eutanásia dos animais. Após 3 e 6 dias, foram realizadas mais duas inoculações, conforme ilustrado na Figura 3

Os animais permaneceram com o dispositivo intrabucal em posição na cavidade bucal durante 35 dias<sup>43</sup> para indução da estomatite protética nos animais. Os ratos foram monitorados diariamente para verificar qualquer alteração na alimentação, no comportamento e na pelagem. Os animais foram pesados conforme descrito anteriormente.

**Figura 3** - Linha do tempo durante todo período experimental (dias)



Fonte: Elaboração própria.

#### 4.2.7 Remoção dos dispositivos, coleta de sangue, eutanásia e retirada da mucosa do palato

Após 4 semanas de uso dos dispositivos após a última inoculação, os animais foram anestesiados e os dispositivos foram removidos cuidadosamente. Os dispositivos foram imersos em tubos contendo 1 mL de solução salina 0,9% estéril. Um swab oral umedecido em PBS foi esfregado na cavidade bucal dos animais por 60 segundos e mantido em um microtubo de centrifugação com 1 mL de PBS. Tanto os dispositivos como os swabs orais foram então agitados em vortex por 120 segundos e submetidos a diluições seriadas decimais, cujas alíquotas foram plaqueadas em duplicatas em placas de BHI, CHRO e SDA, que foram incubadas a 37°C por 48 h. Após esse período, as colônias de *Candida* spp. em meio CHROMAgar *Candida* foram presuntivamente identificadas (verde: *C. albicans*; rosa: *C. glabrata*; azul: *C. tropicalis*) e contadas para determinação dos valores de UFC/mL de cada espécie. As colônias em BHI (microbiota total) e SDA (fungos) também foram quantificadas.

O palato de cada animal foi fotografado, conforme descrito previamente, após a remoção dos dispositivos intrabucais. A partir dessas fotos, foi realizada uma análise macroscópica segundo a classificação de Newton para avaliar o grau de inflamação da mucosa palatina de cada animal<sup>4</sup>. Essas lesões foram caracterizadas por áreas eritematosas da mucosa palatina em diferentes graus de severidade (petéquias, áreas difusas ou hiperplasia papilar, correspondentes aos graus I, II e III de Newton<sup>4</sup>, respectivamente, observados clinicamente em estomatite protética em humanos).

Após a remoção dos dispositivos e fotografia do palato, também foi realizada a coleta de sangue pela artéria renal, através de uma seringa de plástico descartável de 10 mL. Para isso, foi realizado um acesso cirúrgico do peritônio com uma tesoura desde o processo xifóide até a região inferior do abdômen. Em seguida, as vísceras do intestino foram manipuladas para se ter o acesso à artéria renal. Então, a agulha foi inserida paralelamente à artéria com o bisel voltado para cima, e o êmbolo foi puxado cuidadosamente para evitar que a parede arterial colabasse e/ou as hemácias se estourassem pela pressão interna da seringa. Foi possível coletar aproximadamente de 2 a 4 mL de sangue por animal. O sangue coletado foi transferido para um tubo a vácuo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-

acético (EDTA) de 10 mL e enviado para a Laboratórios São Lucas (Araraquara, SP, Brasil) para contagem de hemácias, leucócitos, neutrófilos e linfócitos<sup>48</sup>.

Em seguida, foi realizada a remoção das mucosas do palato com o auxílio de uma lâmina de bisturi e um descoladormolt para romper o periósteo do tecido. Após a remoção do tecido, foi realizado um corte do sentido longitudinal do palato, dividindo-o em duas partes adjacentes. O tecido então, foi posicionado sobre um papel filtro, para evitar a contração do tecido durante o processo de fixação, e transferido para cassetes histológicos. Em seguida, essa amostra foi imersa em paraformaldeído 4% para realização da análise histológica. A outra metade da mucosa palatina foi colocada em tubo criogênico e imersa em nitrogênio líquido.

#### **4.2.8 Preparo das lâminas histológicas**

Após fixação em paraformaldeído 4% durante 48 horas, as amostras foram lavadas em água corrente durante 4 horas para remoção do excesso de paraformaldeído. Após essa lavagem, as amostras foram submersas em álcool 70% durante 24h. As amostras foram então levadas em álcool 90% por 1 hora, álcool absoluto por 2 horas, e colocados em uma nova solução de álcool absoluto para serem incubadas *overnight*. Então, as amostras foram imersas em álcool por 1h, álcool-xilol (1:1) por 1h e xilol por 3h, sendo que o xilol foi renovado a cada 1 hora. Para o processo de parafinização, as amostras foram incubadas em parafina em três etapas a 58°C, sendo a primeira por 1h, a segunda em *overnight* e a terceira por mais 1h. Então as amostras foram levadas na inclusora para serem incluídas em blocos de parafina. Durante esta etapa, as amostras da mucosa do palato foram incluídas com a face do corte no sentido sagital, no qual foi possível avaliar toda extensão longitudinal da mucosa do palato. Foram realizados 3 cortes da língua de 5µm de espessura de cada bloco em um micrótomo (Modelo RM2125, LeicaGeosystems, Heerbrugg, Suíça); os cortes foram levados em lâminas histológicas e incubados em estufa a 58°C por 40min.

#### **4.2.9 Avaliação histopatológica**

As lâminas foram desparafinizadas em banho de xilol, álcool-xilol, álcool absoluto e água destilada, por um período de 10min em cada solução. Após a

desparafinização, as lâminas foram coradas pela técnica de ácido periódico de Schiff contracoradas em solução de hematoxilina de Carazzi. Para isso, as amostras foram lavadas com ácido periódico 1% por 6 minutos, e novamente imersas em água destilada por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em reativo de Schiff (PAS) por 60min e, após isso, imersas em água sulfurosa três vezes por 2min. Então, as lâminas foram colocadas em água corrente por 25min, e, contracoradas em solução de hematoxilina de Carazzi por 5min. Novamente, as lâminas foram colocadas em água corrente para serem então desidratadas e diafanizadas. Nesta etapa, as lâminas foram mantidas por 5 minutos em álcool 95%, álcool-xilol (1:1) e xilol. Após a última etapa do xilol, as lâminas foram montadas com Permount e lamínula. Após 24 horas, as lâminas estavam prontas para serem visualizadas em microscópio óptico. Na avaliação histopatológica da mucosa dos animais, foram avaliados os seguintes aspectos: presença de invasão fúngica no epitélio, desorganização das camadas epiteliais, infiltrado inflamatório e outras alterações distintas de um tecido saudável (sem infecção e/ou sem dispositivo).

### 4.3 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.). As variáveis de contagem de colônias (UFC/mL) e massa corporal dos animais (g) foram submetidas a uma estatística descritiva (medidas de resumo de tendência central e variabilidade). A normalidade e a homogeneidade de variâncias foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Uma análise inferencial paramétrica foi realizada pela análise de variâncias (ANOVA) a dois ou três fatores (sexo, grupos de estudo e fonte de recuperação como variáveis independentes) seguida pelo teste *posteriori* de Tukey. No caso dos dados de microbiota total do palato, ANOVA mista foi utilizada. A massa corporal dos animais foi submetida a ANOVA, a um fator de medidas repetidas, seguida pelo teste *posteriori* de Bonferroni. Em caso de heterocedasticidade, a ANOVA foi corrigida por Welch seguida pelo teste *posteriori* de Games-Howell. O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Além disso, as fotografias do palato dos animais e as imagens histológicas de PAS foram analisadas descritivamente.

## 5 RESULTADO

### 5.1 Perda de Animais

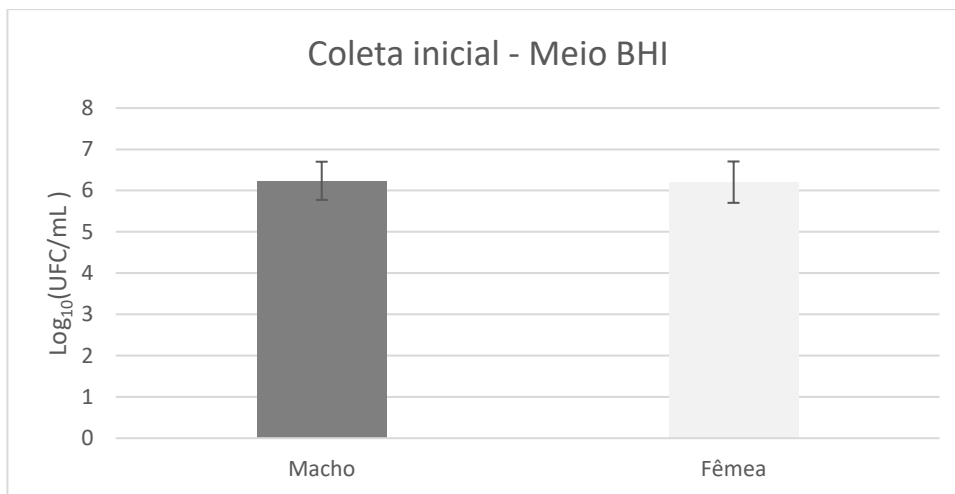
Durante todo o período experimental, houve a perda de 11 animais (10,47%), sendo 7 machos e 4 fêmeas:

- 1 animal morreu durante o procedimento de moldagem, provavelmente pelo excesso de material extravasado durante a moldagem.
- 8 animais não se recuperaram da anestesia (intramuscular)
- 2 animais adoeceram na gaiola após 3 semanas da instalação do dispositivo e foram sacrificados
- Foram acrescentados animais para substituir os perdidos.

### 5.2 Microbiota Inicial

Inicialmente, foi realizada uma coleta de amostra microbiológica bucal a partir de um *swab* estéril antes de iniciar os experimentos. Esse *swab* foi plaqueado em meio de cultura CHROe SDA para avaliar se os animais apresentavam *Candida* spp. na cavidade bucal. 19 animais apresentaram crescimento de 1 a 5 colônias recuperadas da cavidade oral na fase inicial em meio CHRO e/ou SDA. As amostras também foram plaqueados em meio de cultura BHI para avaliar a quantidade total de microrganismos presentes na cavidade bucal (Figura 4). Foi observado um valor médio de  $6,237 \pm 0,462 \log_{10}(\text{UFC/mL})$  para os machos e de  $6,205 \pm 0,501 \log_{10}(\text{UFC/mL})$  para as fêmeas.

**Figura 4** - Valores médios de  $\log_{10}$ (UFC/mL) da microbiota inicial total de todos os animais machos e fêmeas

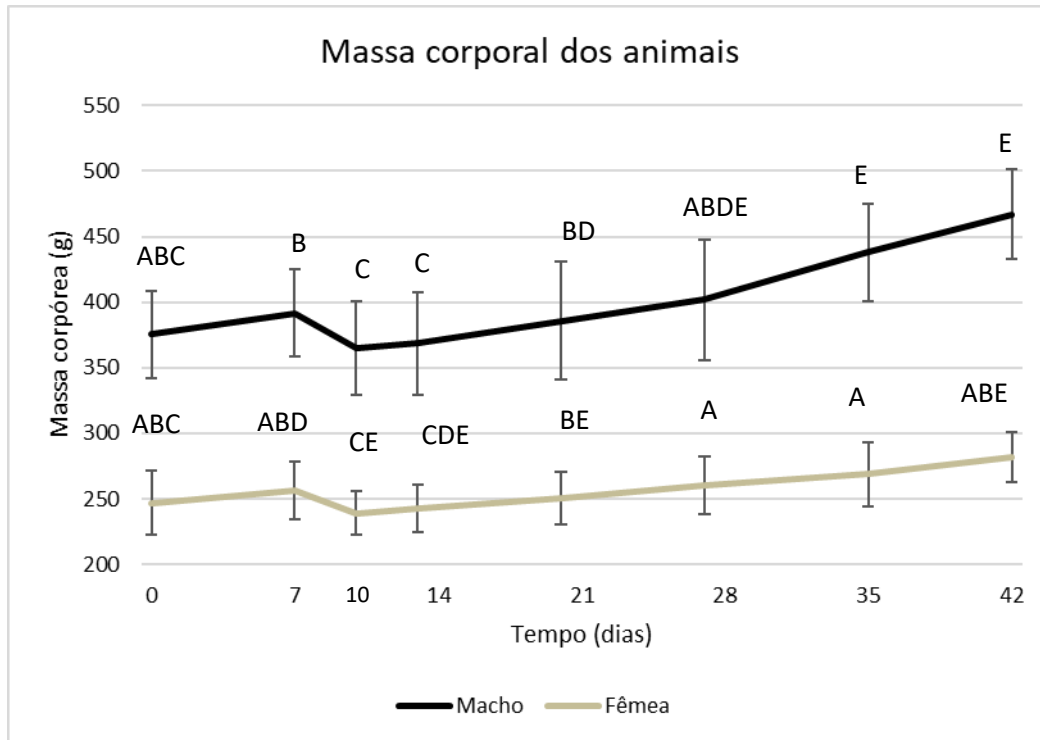


Barras de erro: desvio-padrão (n=42).

Fonte: Elaboração própria.

### 5.3 Controle de Peso dos Animais

Após a instalação dos dispositivos intrabucais nos animais, foi observado que os animais apresentaram uma perda de massa corporal (g) significativa ( $p < 0,001$  ; APÊNDICE A) nos primeiros dias de uso (dias 10<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup>, comparado com o dia 7<sup>o</sup> da colocação do dispositivo), o que pode ser considerada uma fase de adaptação. No entanto, a massa corporal dos animais com essa perda foi semelhante ( $p > 0,005$ ) ao dia da moldagem, antes do uso do dispositivo. Após esse período, os animais apresentaram um aumento gradual e significativo ( $p > 0,008$  e  $p > 0,018$ , para machos e fêmeas, respectivamente) de sua massa corporal durante todo o período de avaliação (Figura 5). Isso sugere que os animais conseguiram se alimentar durante o uso do dispositivo intrabucal. Também foi observada presença de farelo da ração sólida abaixo das gaiolas individuais durante o período de quatro semanas de uso do dispositivo, o que indica que os animais conseguiram roer e se alimentar da ração sólida com a utilização do dispositivo. Essa atividade é importante para o desgaste dentário do roedor devido à constante erupção dos incisivos<sup>61</sup>.

**Figura 5 - Avaliação da massa corporal dos animais machos e fêmeas**

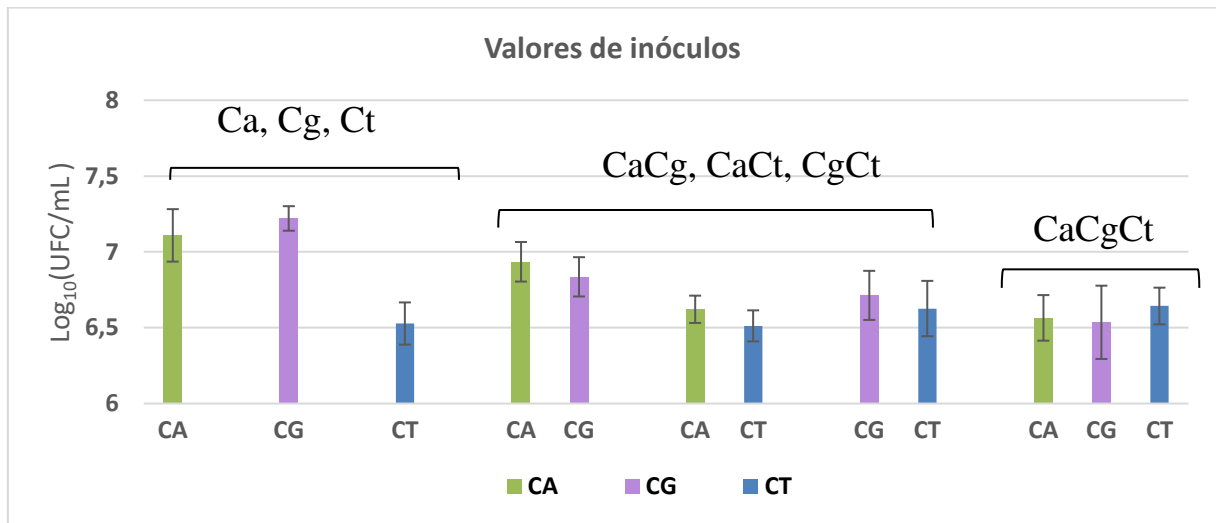
No dia da moldagem (dia 0), instalação e primeira inoculação (dia 7), 2<sup>o</sup> inoculação (dia 10), 3<sup>o</sup> inoculação (dia 13), 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> semanas após as inoculações (dia 21, 28 e 35 respectivamente) e no dia da eutanásia (42). Letras maiúsculas indicam diferença entre os períodos.

Fonte: Elaboração própria.

#### 5.4 Inóculos e Padronização dos Inóculos Mistos

O valor médio do inóculo simples de Cg foi maior em relação aos inóculos de Ca e Ct (Figura 6). Os inóculos mistos foram ajustados e padronizados de acordo com a espécie Ct ou Ca, uma vez que essas espécies apresentaram menores valores de UFC/mL.

**Figura 6** - Valores médios de  $\log_{10}$ (UFC/mL) de *Candida* spp. obtidos para formação do biofilme no dispositivo e para as 3 inoculações no palato com espécies simples e mistas

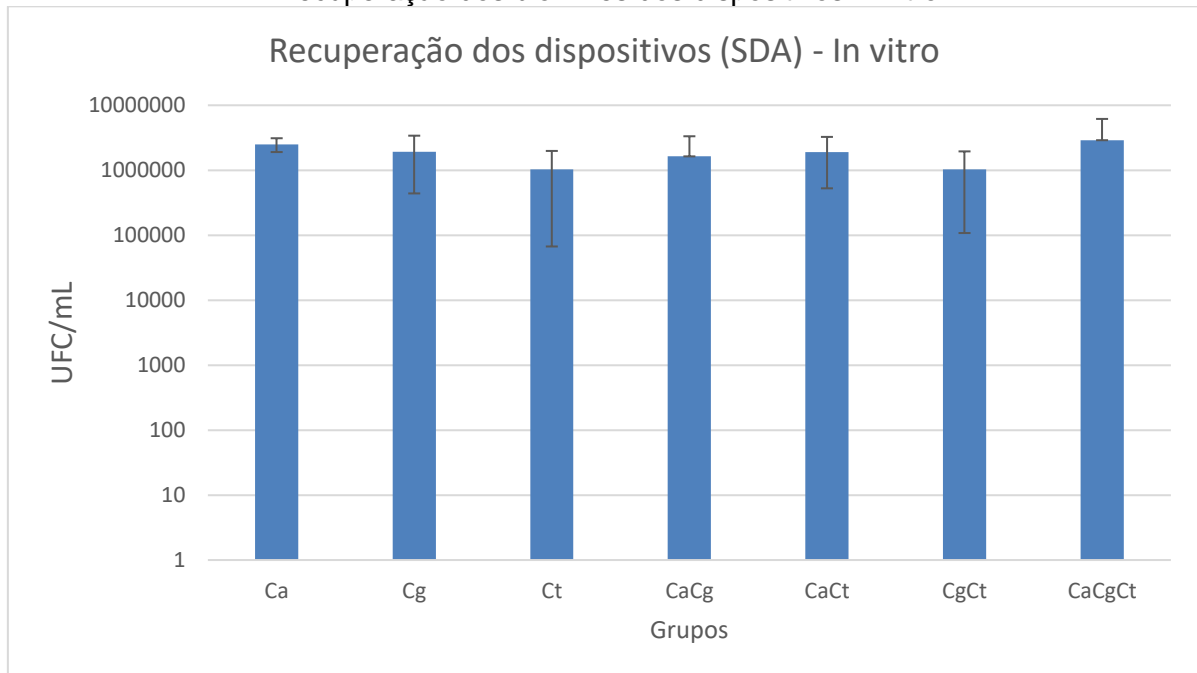


Fonte: Elaboração própria.

### 5.5 Quantificação de *Candida* spp. nos Dispositivos In Vitro

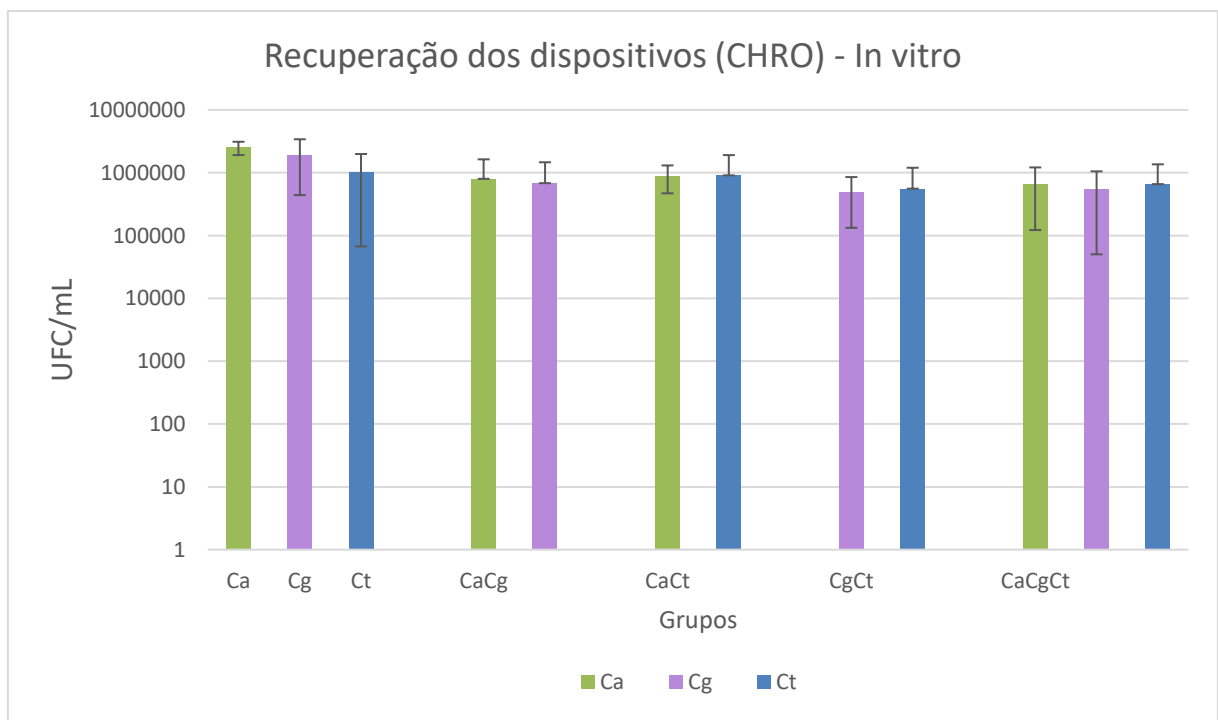
Foram observados valores médios entre  $1,02 \times 10^7 \pm 9,57 \times 10^6$  UFC/mL (Ct) e  $2,5 \times 10^7 \pm 6,01 \times 10^6$  UFC/mL (Ca) (FALAR DE CG TBM), após a recuperação dos microrganismos do biofilme formado nos dispositivos adicionais (Figura 7). As espécies identificadas presuntivamente nas placas de CHRO indicaram que a recuperação das espécies mistas correspondeu às espécies inoculadas e apresentou valores próximos (Figura 8). Os valores para as espécies simples, corroboram com o valor dos inóculos utilizados para formação do biofilme e etapa de inoculação, sendo que Ca e Cg apresentaram valores médios mais elevados.

**Figura 7** - Valores médios de UFC/mL de *Candida* spp. em SDA obtidos após a recuperação dos biofilmes dos dispositivos in vitro



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 8** - Valores médios de UFC/mL das espécies de *Candida* spp. observadas em CHROMAgarCandida dos biofilmes recuperados dos dispositivos in vitro

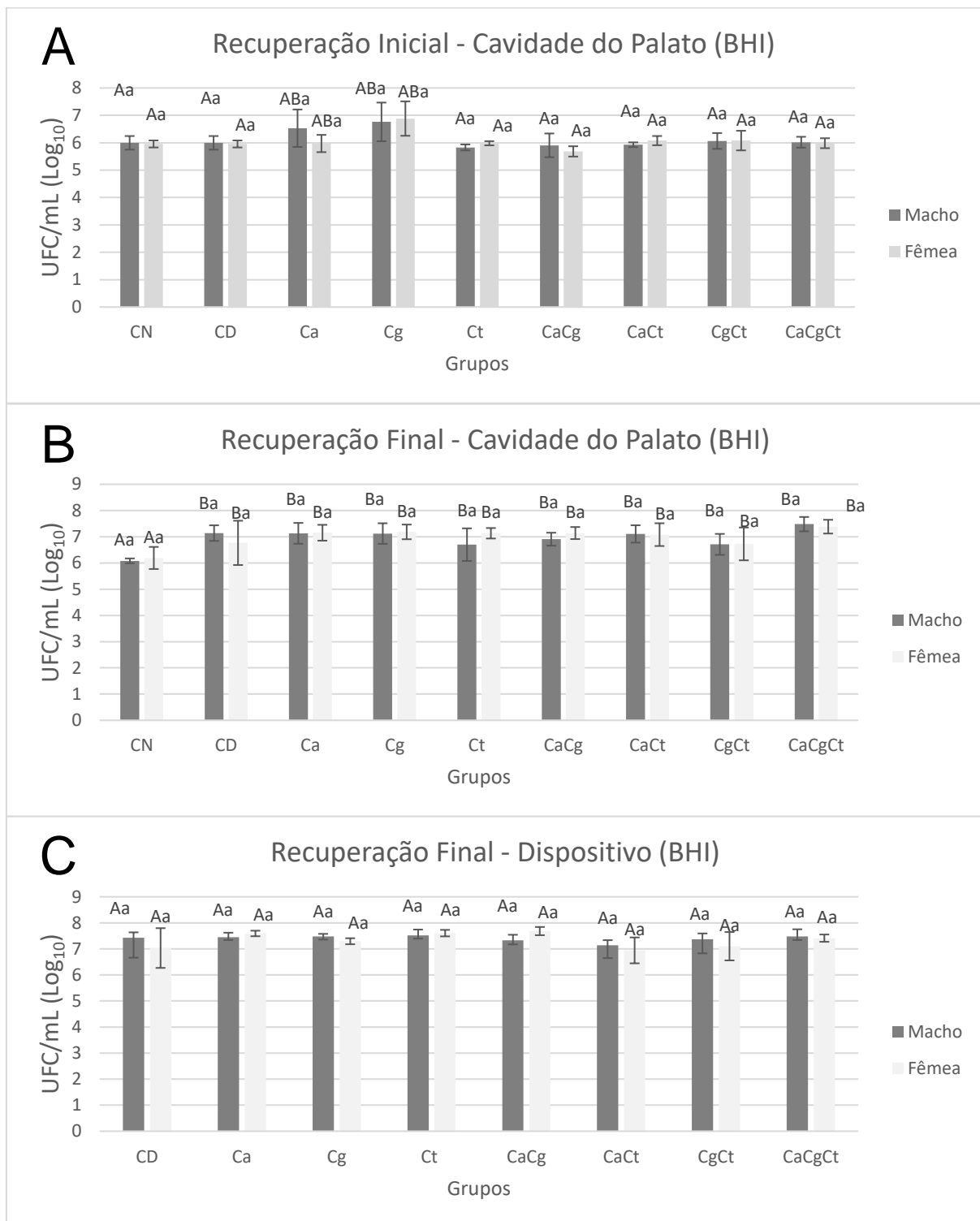


Fonte: Elaboração própria.

## 5.6 Recuperação dos Microrganismos

Após a utilização dos dispositivos, as amostras do palato dos animais e dos dispositivos foram plaqueados em meio BHI (Figura 9), SDA (Figura 10) e em CHRO (Figura 11 e 12).

Para a microbiota total do palato (BHI), a ANOVA mista (APÊNDICE B) demonstrou ausência de interação ( $p = 0,473$ ) entre os períodos de coleta, sexo dos animais e grupos de estudo e também entre período e sexo ( $p = 0,467$ ). A interação entre período e grupo foi significativa ( $p = 0,001$ ) e o período de recuperação apresentou efeito significativo ( $p < 0,001$ ) nos valores recuperados. Foi observado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) da microbiota total presente na cavidade bucal dos animais após o uso do dispositivo comparado com a microbiota inicial (Figura 9 A e B). As diferenças entre a quantidade da microbiota encontrada após e antes do uso do dispositivo em cada grupo para ambos os sexos dos animais estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que o grupo que apresentou maior aumento da microbiota total foi o inoculado com as três espécies fúngicas ( $1,43 \log_{10}$ ), enquanto que o grupo que apresentou menor aumento da microbiota foi o Cg ( $0,33 \log_{10}$ ). Ainda, foi observada ausência de interação entre os fatores sexo e grupo ( $p = 0,523$ ) e somente o fator grupo foi significativo ( $p < 0,001$ ). O grupo Cg apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,03$ ) com os demais grupos, exceto com Ca ( $p = 0,366$ ) e CaCgCt ( $p = 0,458$ ). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si ( $p \geq 0,239$ ).

**Figura 9** - Valores médios de  $\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$  de microbiota total (BHI)

A: Recuperação inicial (previamente aos experimentos); B: Recuperação final (Cavidade do Palato, previamente à eutanásia); C: Recuperação final (Dispositivo, previamente à eutanásia). Barras de erro: desvio-padrão (n = 5 para cada sexo).

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 1** - Valores médios de  $\log_{10}$ (UFC/mL) da microbiota total recuperada do palato dos animais de ambos os sexos em todos os grupos avaliados após o período de uso do dispositivo

Grupos	Ca	Cg	Ct	CaCg	CaCt	CtCg	CaCgCt	CD
Inicial	6,25	6,82	5,91	5,80	6,00	6,07	6,00	5,98
Final	7,14	7,15	6,92	7,02	7,09	6,72	7,43	6,95
Diferença	0,89	0,33	1,01	1,23	1,09	0,64	1,43	0,97

Fonte: Elaboração própria.

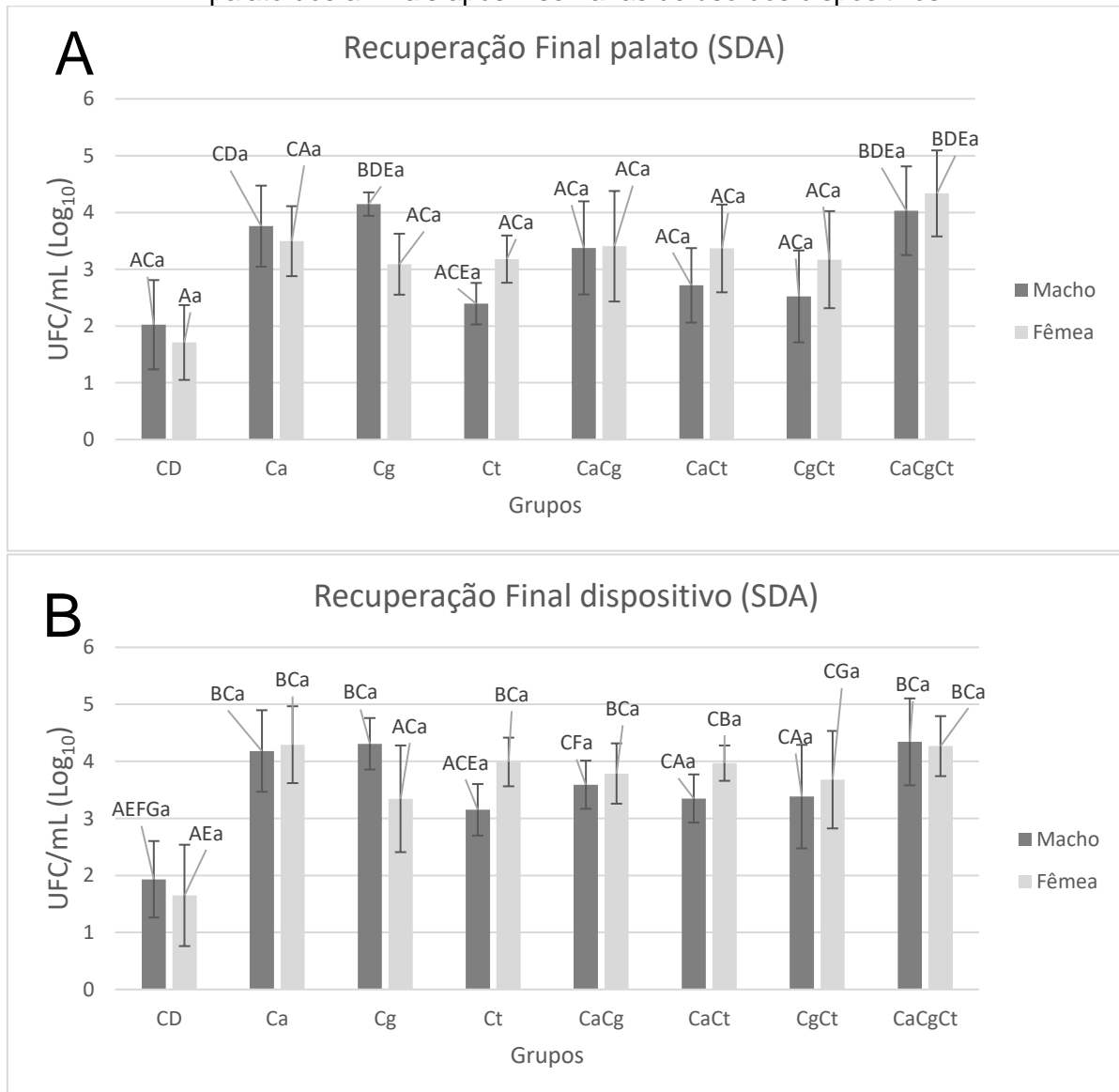
Para a quantificação de fungos em meio SDA (APÊNDICE C) da cavidade do palato e do dispositivo, a ANOVA a dois fatores não demonstrou interação ( $p \geq 0,537$ ) entre sexo dos animais e interação entre sexo e espécies ( $p \geq 0,104$ ) (figura 10). Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na recuperação final dos dispositivos e da cavidade do palato entre machos e fêmeas.

Na recuperação final da cavidade do palato, os grupos Ca, Cg, CaCg e CaCgCt apresentaram valores maiores em relação ao grupo CD ( $p < 0,001$ ), sendo a espécie tripla (CaCgCt) os maiores valores médios obtidos  $4,18 \pm 0,016 \log_{10}$ (UFC/mL). Em relação à recuperação final dos dispositivos, o grupo CD ( $p < 0,001$ ) apresentou valor menor em relação aos demais grupos, o maior valor de UFC também foi para o grupo CaCgCt com  $4,3 \pm 0,166 \log_{10}$ (UFC/mL).

Os animais do grupo CD apresentaram crescimento de colônias para SDA (figura 10) após a coleta final, tanto para cavidade oral quanto para os dispositivos, mesmo sem serem inoculados. Na recuperação da cavidade do palato, o grupo CD apresentou menor valor ( $p \leq 0,001$ ) em relação aos grupos de espécies simples e mista.

Os valores médios dos animais machos e fêmeas recuperados da cavidade do palato e do dispositivo em meio CHRO pode ser observado nas figuras 11 e 12.

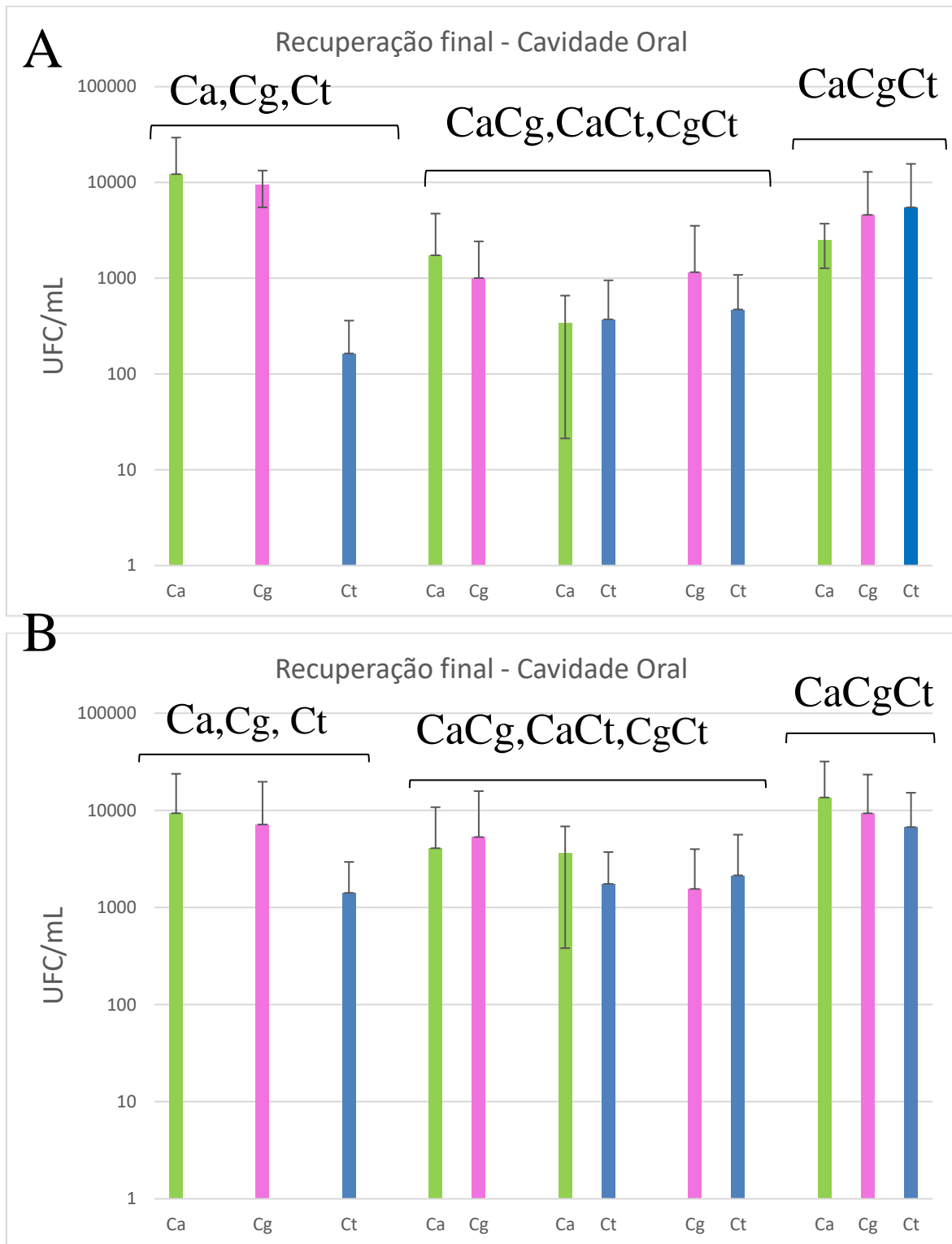
**Figura 10** - Valores médios de  $\text{Log}_{10}(\text{UFC/mL})$  de fungos (SDA) recuperados na mucosa do palato dos animais após 4 semanas de uso dos dispositivos



A: recuperação Final do Palato em meio SDA; B: Recuperação Final do dispositivo em meio SDA. Barras de erro: desvio-padrão (n = 5 para cada sexo). Letras maiúsculas representam diferença significativa entre os grupos, letras minúsculas representam diferença significativa entre sexos.

Fonte: Elaboração própria.

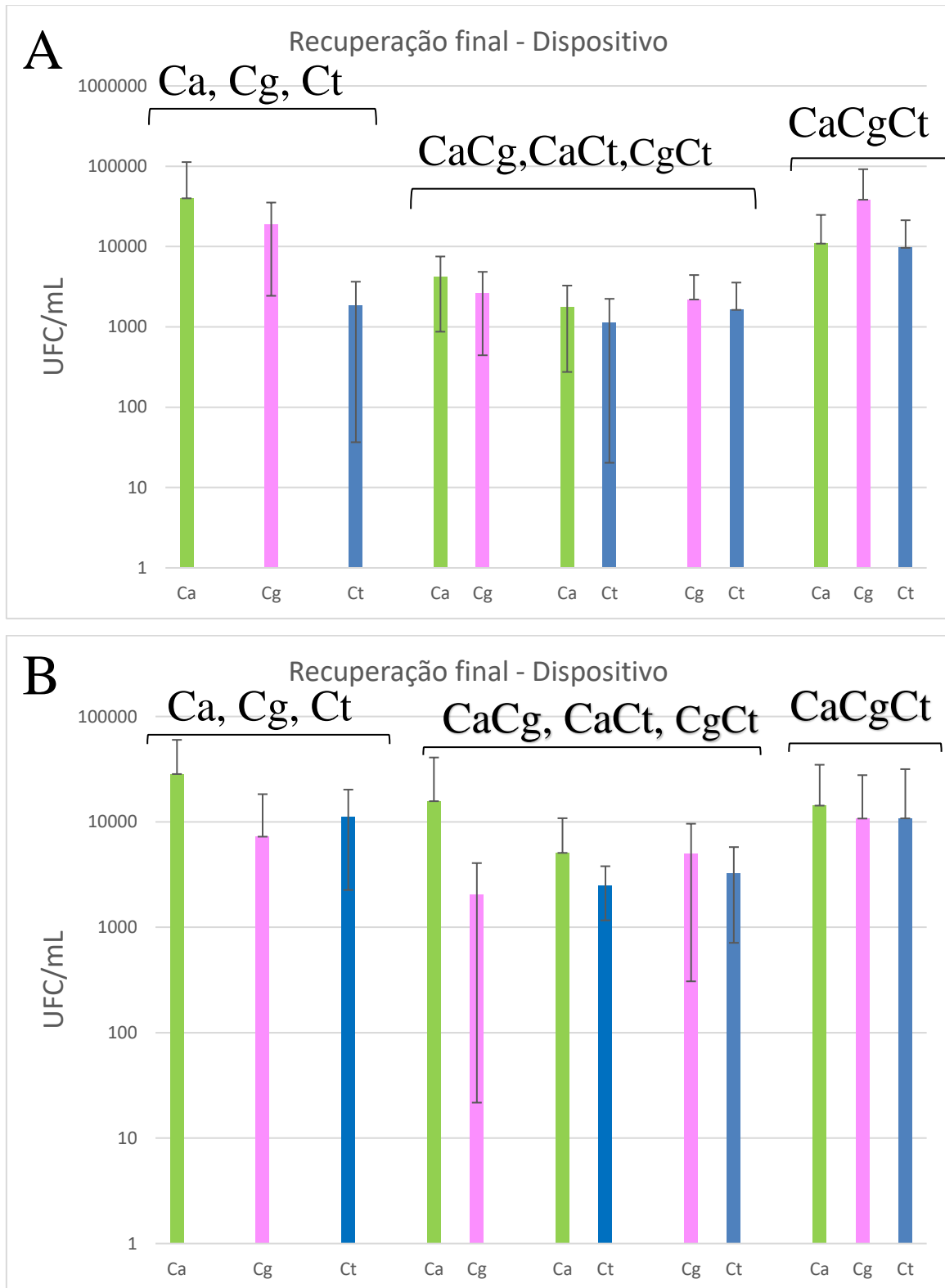
**Figura 11:** Valores médios de UFC/mL de espécies de *Candida* spp. identificadas presuntivamente em CHROMAgar*Candida* recuperados na cavidade oral dos animais machos e fêmeas



A: Animais machos; B: Animais Fêmeas. Barras de erro: desvio-padrão (n = 5 para cada sexo).

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 12:** Valores médios de UFC/mL de espécies presuntivas de *Candida* spp. em CHROMAgar*Candida* recuperados nos dispositivos dos animais machos e fêmeas



A: Animais machos; B: Animais Fêmeas. Barras de erro: desvio-padrão (n = 5 para cada sexo).

Fonte: Elaboração própria.

Os valores de fungos recuperados da cavidade bucal variaram entre 36,67% a 57,1% e para os dispositivos variaram entre 48,27% a 61,1% em relação aos valores de inóculos para os animais machos. Para os animais fêmeas, os valores recuperados variaram entre 42,75% a 61,5% na cavidade oral e 46,29% a 60,5% nos dispositivos (Tabela 2). O grupo que apresentou maior recuperação foi CaCgCt e o que apresentou menor recuperação foi CgCt.

**Tabela 2:** Valores de inóculos e porcentagem (%) de recuperação fúngica em relação ao valor inoculado na mucosa palatino e no dispositivo dos animais machos e fêmeas para todos os grupos avaliados

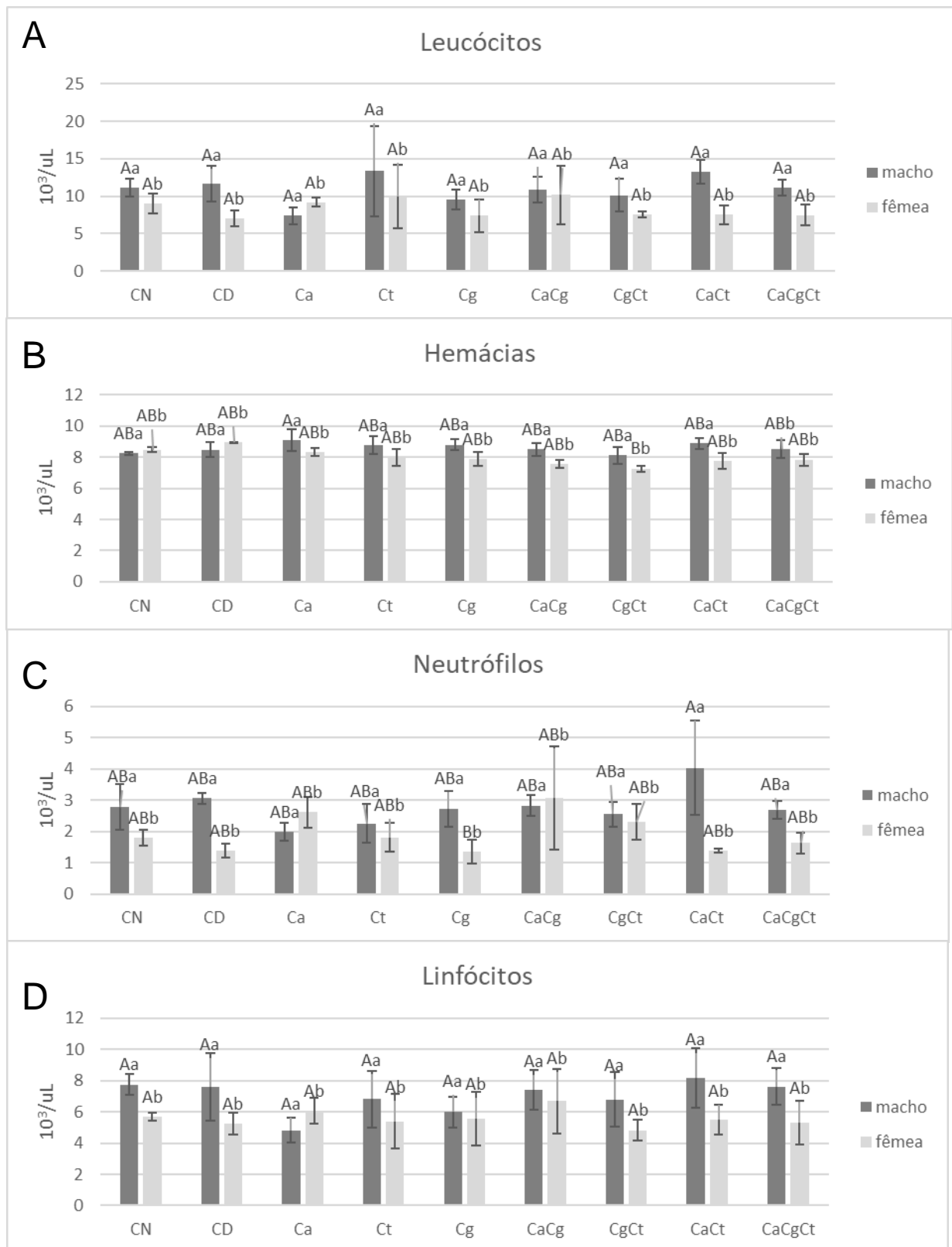
GRUPOS	Inóculo (log <sub>10</sub> (UFC/mL))	MACHOS		FÊMEAS	
		Mucosa Palato	Dispositivos	Mucosa Palato	Dispositivos
		Recuperado (%)	Recuperado (%)	Recuperado (%)	Recuperado (%)
Ca	7,106 ±0,153	46,63	58,8	46,63	60,4
Cg	7,218 ±0,046	57,45	59,68	42,75	46,29
Ct	6,526 ±0,08	36,67	48,27	48,66	61,09
CaCg	7,084 ±0,19	47,64	50,68	48,05	53,45
CaCt	6,81 ±0,125	39,87	49,16	49,42	58,27
CgCt	6,97 ±0,138	36,14	48,47	45,41	52,73
CaCgCt	7,06 ±0,142	57,1	61,6	61,5	60,5

Fonte: Elaboração própria

## 5.7 Análise do Hemograma

Durante a análise de sangue, foram observadas as seguintes alterações nos leucócitos, neutrófilos e linfócitos dos grupos experimentais em relação ao grupo CN (tabela 2, figura 13): os animais do grupo CT apresentaram valores mais elevados de leucócitos em relação aos animais do grupo CN (11,655±1,215 para os machos; 8,996±1,335 para as fêmeas). Para os animais fêmeas, os valores médios de neutrófilos foram maiores para todos os grupos experimentais em relação ao grupo CN, enquanto que, para os animais machos, somente os animais do grupo Ct e CaCt foram mais elevados que o grupo CN. Porém não foi observado diferença significativa (APÊNDICE D) entre os grupos ( $p \geq 0,048$ ) e sim uma diferença significativa entre os sexos ( $p < 0,001$ ).

**Figura 13:** Hemograma dos animais machos e fêmeas de cada grupo.



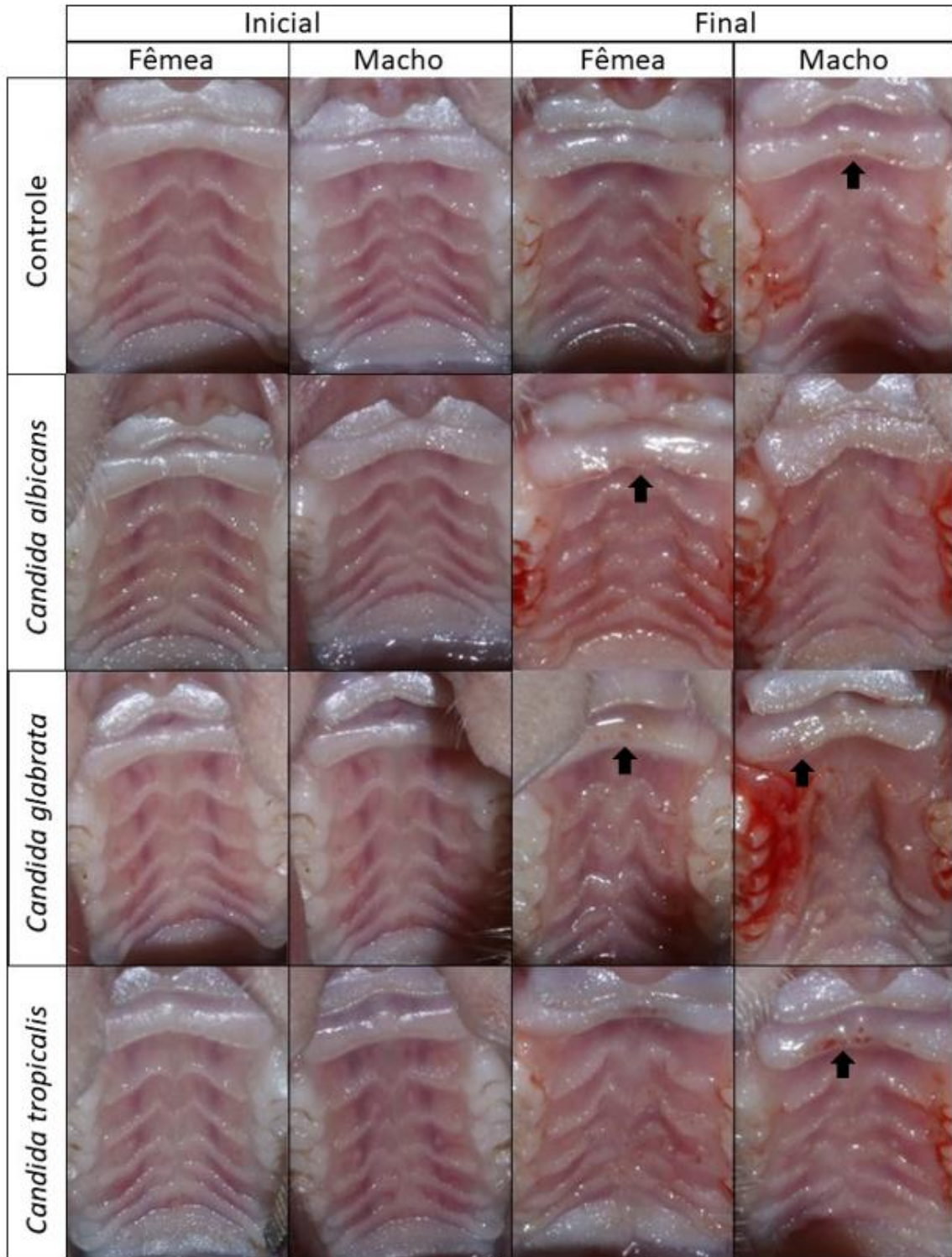
A: Leucócitos; B: Hemácias; C: Neutrófilos; D: Linfócitos.

Fonte: Elaboração própria

## **5.8 Análise Macroscópica**

Foi observada uma alteração morfológica nas distribuições das papilas e um sangramento abundante na região de sulco gengival na maioria dos animais após a remoção do dispositivo. Não foram observados sinais de inflamação na mucosa do palato. Porém, pontos hiperêmicos foram observados na rugosidade palatina de alguns animais, sendo mais intensos ou menos intensos (Figura 14, 15).

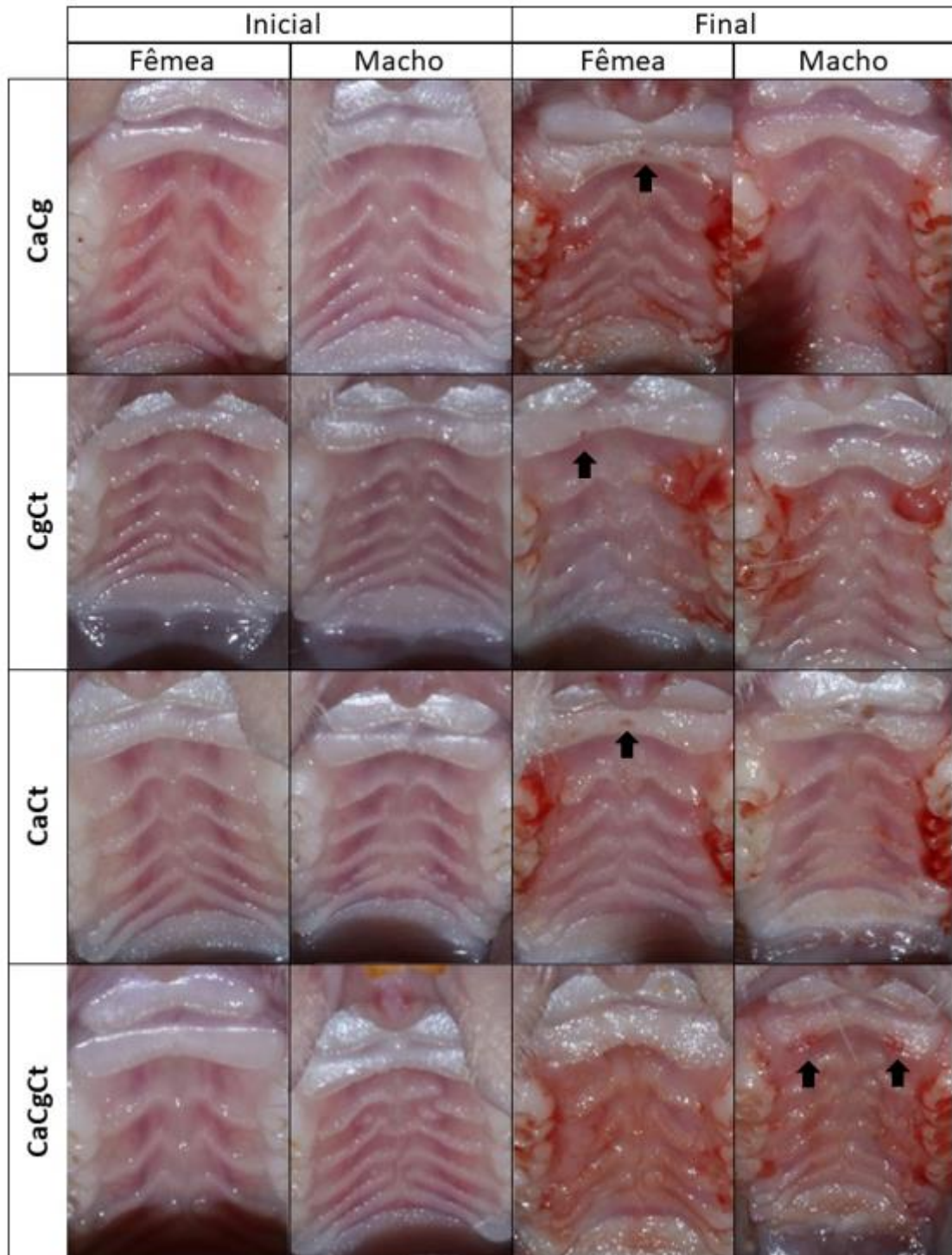
**Figura 14:** Análise macroscópica inicial (dia 0) e final (dia 42<sup>o</sup>) dos animais machos e fêmeas dos grupos Controle, Ca (*Candida albicans*), Cg (*Candida glabrata*) e Ct (*Candida tropicalis*)



Seta: pontos hiperêmicos

Fonte: Elaboração própria

**Figura 15:** Análise macroscópica inicial (dia 0) e final (dia 42<sup>o</sup>) dos animais machos e fêmeas dos grupos CaCg (*Candida albicans* + *Candida glabrata*), CgCt (*Candida glabrata*), CaCt (*Candida albicans* + *Candida tropicalis*) e CaCgCt (*Candida albicans* + *Candida Glabrata* + *Candida tropicalis*)



Seta: pontos hiperêmicos

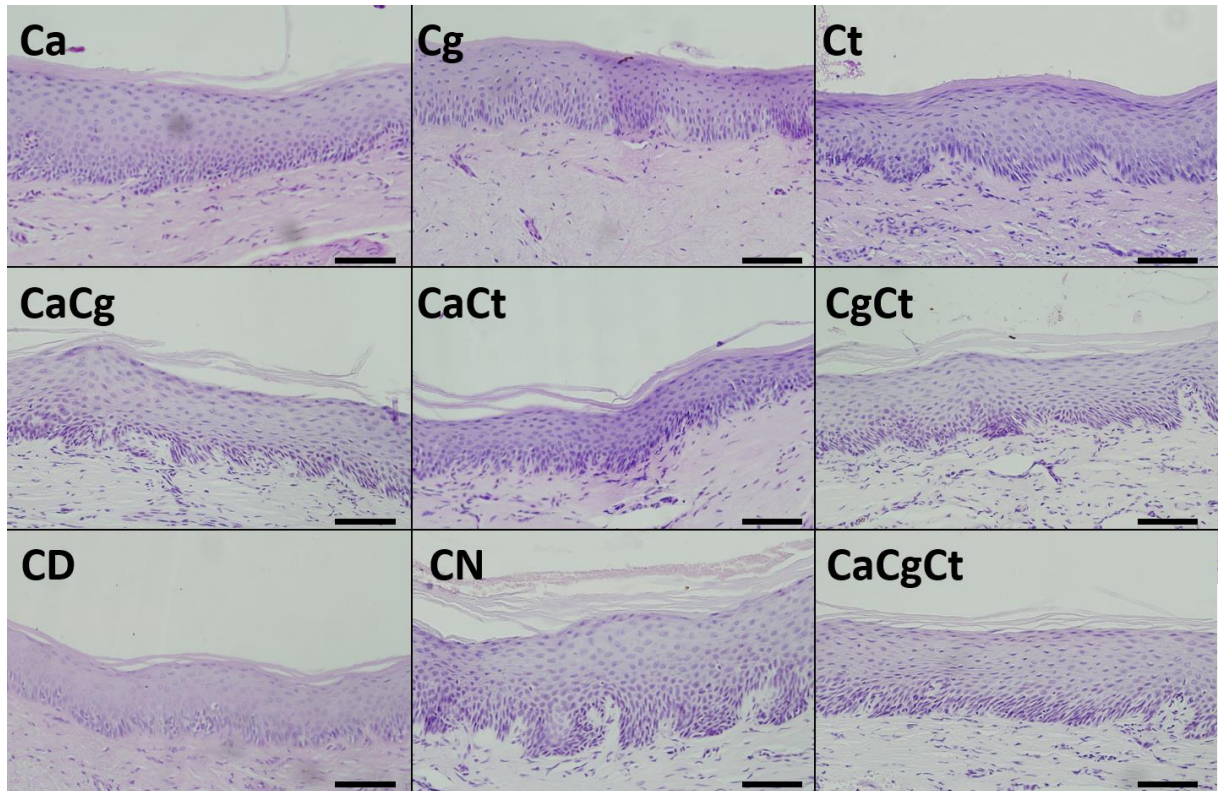
Fonte: Elaboração própria

## 5.9 Análise Histopatológico

Na análise histopatológica (Figuras 16 e 17), os achados foram semelhantes para todos os animais dos grupos que utilizaram dispositivo (com ou sem inóculo fúngico). Entretanto, foi observado que a camada queratinizada estava aparentemente reduzida em todos os grupos que utilizaram o dispositivo intraoral em relação aos animais do grupo Controle Negativo (CN, animais sem dispositivo), em todo sentido longitudinal do palato. Algumas áreas do epitélio apresentaram a camada córnea muito delgada (Cg, Ct, Figura 16; Ca, Ct, CD figura 17).

Não foi observada a presença de células inflamatórias na lâmina própria da mucosa palatina, por toda a extensão dos cortes das amostras de todos os grupos. Além disso, a presença de hifas ou leveduras fúngicas não foi observada em nenhuma amostra analisada dos grupos inoculados com *Candida* spp.

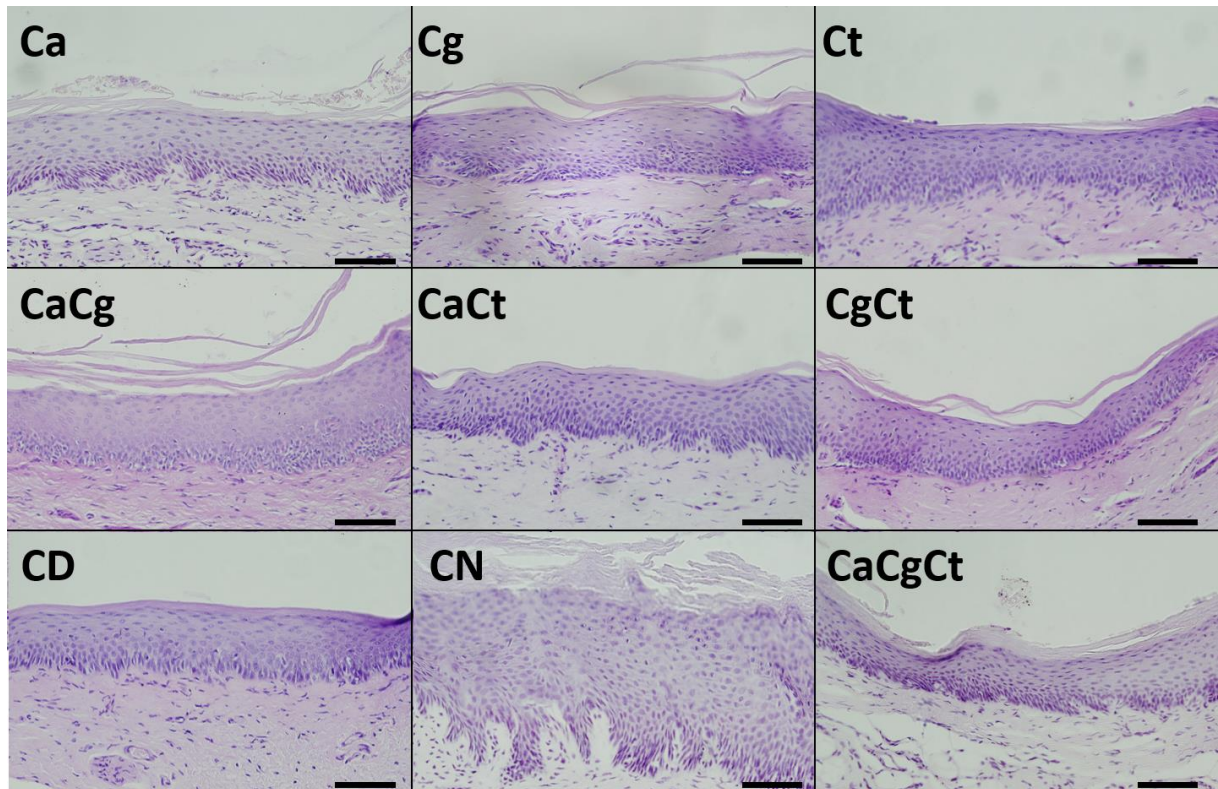
**Figura 16:** Análise Histológica do epitélio do palato dos animais (machos) após o uso do dispositivo intrabucal. Legenda: Ca: *C.albicans*, Cg: *C.glabrata*, Ct: *C. tropicalis*, CaCg: *C.albicans* + *C.glabrata*, CgCt: *C.glabrata* + *C. tropicalis*, CaCt: *C. albicans* + *C.tropicalis*, CaCgCt: *C. albicans* + *C. Glabrata* + *C. tropicalis*. CD: Controle Dispositivo e CN: Controle negativo (animal sem dispositivo)



Magnificação: 20x; Barra: 100  $\mu$ M

Fonte: Elaboração própria

**Figura 17:** Análise Histológica do epitélio do palato dos animais (Fêmeas) após o uso do dispositivo intrabucal. Legenda: Ca: *C.albicans*, Cg: *C.glabrata*, Ct: *C. tropicalis*, CaCg: *C.albicans* + *C.glabrata*, CgCt: *C.glabrata* + *C. tropicalis*, CaCt: *C. albicans* + *C.tropicalis*, CaCgCt: *C. albicans* + *C. Glabrata* + *C. tropicalis*. CD: Controle Dispositivo e CN: Controle negativo (animal sem dispositivo)



Magnificação: 20x; Barra: 100  $\mu$ M

Fonte: Elaboração própria

## 6 DISCUSSÃO

Os trabalhos descritos na literatura não demonstram um protocolo padronizado para indução de estomatite protética em ratos através de um dispositivo intraoral. Muitos estudos variam de acordo com a espécie, idade dos animais e, principalmente, o protocolo para indução da lesão<sup>62</sup>. Há divergências no tempo de uso do dispositivo nos animais, uso de antibiótico e imunossupressor, além de diferenças entre cepas fúngicas, concentração de inóculo, tipo de dispositivo, dentre outros fatores, o que dificulta uma metodologia que seja efetiva para indução da infecção. Por isso, realizamos um estudo com ratos *Wistar* machos e fêmeas com 90 dias de vida para avaliar a estomatite protética. Foi estabelecido que os animais utilizassem o dispositivo intrabucal inoculados com até três espécies de *Candida* spp. por aproximadamente 4 semanas em uma concentração entre  $1,8 \times 10^6$  a  $2,6 \times 10^7$  UFC/mL, e cada animal foi inoculado três vezes<sup>43</sup>.

A maioria dos estudos que induzem candidíase oral a partir de um dispositivo acrílico intrabucal utilizam animais machos<sup>31,33,41,47</sup>, apesar da estomatite protética ser, nos humanos, mais prevalente em mulheres<sup>2,3</sup>. Neste estudo, foi verificado que os achados para ambos os sexos foram similares. Porém, não existem estudos na literatura que tenham comparado candidíase bucal em machos e fêmeas em modelos animais.

Os resultados obtidos nesta investigação demonstraram que, com a metodologia utilizada, não foi possível induzir a estomatite protética. A ausência de inflamação do palato e de alterações histológicas no tecido epitelial confirmam essa conclusão. Esse resultado difere dos encontrados em estudos prévios, que demonstram alterações inflamatórias no palato de ratos após uso do dispositivo acrílico e inoculação de *C. albicans*<sup>33,42</sup>. A diferença entre esses achados pode ser explicada pelas variações nas metodologias utilizadas. Para indução de candidíase bucal, muitos estudos realizam a imunossupressão dos animais<sup>33,42,45,51,53</sup> e/ou antibioticoterapia com tetraciclina<sup>51-53</sup> para que *C. albicans* possa superar a defesa do sistema imune do hospedeiro e a microbiota local para, assim, colonizar e promover infecção do tecido bucal. Entretanto, neste estudo, a imunossupressão e a antibioticoterapia nos animais não foram realizadas, pois essas condições não refletem o estado da maioria dos pacientes usuários de próteses e portadores de estomatite protética. Sabe-se que, nesses pacientes, somente a alteração local

promovida pela colocação da prótese dentária já é um fator etiológico para o desenvolvimento da candidíase bucal<sup>6</sup>. Além disso, a imunossupressão e a antibioticoterapia nos animais não foram empregadas para que não houvesse alteração da microbiota bucal promovida por esses fatores, uma vez que as amostras coletadas foram submetidas ao sequenciamento genético para analisar a alteração do microbioma (disbiose) promovida somente pelo uso do dispositivo e pela inoculação de *Candida* spp. (dados ainda não adquiridos).

Durante o período experimental, os animais conseguiram se adaptar com o dispositivo. Apesar da perda de massa corporal ocorrida na primeira semana de uso, os animais aumentaram suas massas corpóreas ao longo do período experimental. Os valores recuperados da microbiota total cultivável da cavidade bucal apresentaram aproximadamente um aumento de 0,78 log<sub>10</sub>(UFC/mL) para os animais machos e 0,9 log<sub>10</sub>(UFC/mL) para as fêmeas, ao final do período experimental em relação à coleta inicial. Para os animais machos inoculados com biofilme simples, foi observado que somente 46,63%, 57,45% e 46,67% foram recuperados da cavidade bucal para Ca, Cg e Ct, respectivamente, em relação à concentração do inóculo. Para as fêmeas, esses valores foram 46,63%, 42,75% e 48,66%, respectivamente. Para os animais inoculados com espécies mistas de *Candida*, os valores foram semelhantes ao biofilme simples. Já para os animais inoculados com três espécies de *Candida*, os valores foram maiores, correspondendo a 57,1% para os machos e 61,5% para as fêmeas.

A diferença dos valores recuperados da cavidade bucal em relação ao inóculo variou entre 4,9x10<sup>3</sup> UFC/mL na cavidade oral e 1,5x10<sup>3</sup>UFC/mL nos dispositivos. Em outro estudos<sup>43</sup> autores recuperaram aproximadamente 1x10<sup>4</sup> UFC/mL da cavidade bucal e 1x10<sup>4</sup> a 1x10<sup>5</sup> UFC/mL dos dispositivos de ratos machos que utilizaram o artefato acrílico por 4 semanas. Nesse estudo, os animais foram inoculados com a 1x10<sup>9</sup> UFC/mL de *Candida albicans* e/ou *Candida glabrata*. A quantidade fúngica recuperada foi similar à observada no presente estudo, uma vez que o valor recuperado dos animais foi menor do que os valores inoculados. Entretanto, esse estudo não reporta a inflamação macroscópica do palato dos animais. Os autores relataram somente efetiva colonização de ambas espécies na cavidade bucal e no dispositivo dos animais, dano à mucosa palatina mensurado por liberação de lactato desidrogenase e infiltrado inflamatório histológico no tecido

observado somente nos animais inoculados com *C. albicans* ou ambas espécies, mas não nos animais inoculados somente com *C. glabrata*<sup>43</sup>.

Apesar de a espécie *C. albicans* ser a mais virulenta e o principal fator etiológico para candidíase entre todas as espécies<sup>5</sup>, os resultados obtidos com as três espécies de *Candida* avaliadas nos animais foram similares, tanto para biofilmes simples ou mistos, como para a coleta final (recuperação de microrganismos), análise macroscópica e histológica<sup>43</sup>. Como mencionado anteriormente, Yano et al.<sup>43</sup>também não observaram efeitos potencializadores na virulência de *C. albicans* quando associada com *C. glabrata* em animais que utilizaram o dispositivo intrabucal por 28 dias.

Poucos estudos na literatura<sup>41</sup>utilizaram *C.tropicalis* para indução da estomatite protética. Apesar de ser uma espécie muito encontrada em infecções clínicas, pouco se sabe sobre a interação dela entre outras espécies<sup>41,63</sup>. Shakir et al.<sup>41</sup>observaram que tanto *C. tropicalis* e *C. glabrata* não promoveram alterações histológicas nem invasão epitelial no tecido palatino de ratos Wistar após a utilização de um dispositivo acrílico intrabucal durante 2 semanas de uso.

Durante a análise histopatológica do presente estudo, não foi observada a presença ou invasão de *Candida spp.* na camada epitelial da mucosa do palato. Um outro fato importante é a constante descamação das células epiteliais; esse processo pode auxiliar a eliminação do fungo aderido na superfície do epitélio, impedindo uma penetração ou invasão fúngica<sup>45,48</sup>. Outros estudos também não observaram a presença fúngica no epitélio da mucosa do palato<sup>31,48</sup>. Outro fator que possa justificar a não invasão do fungo é que os animais avaliados nesta pesquisa não foram submetidos à antibioticoterapia e nem foram imunossuprimidos. Esses dois procedimentos são considerados fundamentais para indução de candidose oral em camundongos<sup>51</sup>.

No modelo in vivo utilizado por Sultan et al.<sup>42</sup>, após 96 horas da instalação do dispositivo e inoculação fúngica de *Candida albicans* ( $1 \times 10^9$  células/mL), os autores observaram edema, eritema e inflamação na mucosa do palato, além de placas brancas e densas. Na análise histológica, foi observada a presença de fungos na mucosa do palato e da língua, nas superfícies mais externas do epitélio, além de microabcessos e neutrófilos em toda extensão infectada. A recuperação no dispositivo variou entre 3,5 a 5 log<sub>10</sub> UFC/mL e no palato ente 2 a 4 log<sub>10</sub>células/grama. Em nosso estudo, a recuperação foi similar às análises de UFC,

porém não foi observada nenhuma alteração histológica ou macroscópica semelhante a este estudo. Esses autores utilizaram antibioticoterapia (ampicilina 0,5g/L) e imunossupressores (cortisona 200mg/kg) nos animais, o que difere do nosso modelo.

Nette et al.<sup>33</sup> observaram invasão fúngica no epitélio da mucosa palatina em ratos imunossuprimidos com uma dose única de cortisona a uma concentração de 200 mg/kg e um inóculo de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *C. albicans* em ratos Sprague-Dawley machos, além de células inflamatórias na camada basal do epitélio. O fato de comprometer a defesa imune do hospedeiro facilita com que os fungos consigam penetrar no epitélio<sup>33,51,53</sup>. Porém, em animais saudáveis, isso não foi observado. Além de imunossupressores, muitos estudos também associam antibióticos na água de beber antes da inoculação fúngica, para reduzir as espécies bacterianas da microbiota bucal, o que permite o desenvolvimento das leveduras<sup>45,53,65</sup>. Desta forma, a associação de imunossupressores com antibioticoterapia facilitam a indução da estomatite protética<sup>45,51,65</sup>, porém essa condição não reflete com precisão uma característica clínica.

Na análise macroscópica do palato dos animais, não foi observada inflamação da mucosa com as características reportadas por Newton<sup>4</sup>, utilizada para diagnosticar estomatite protética em pacientes usuários de prótese. Entretanto, pontos hiperêmicos foram observados em alguns animais na superfície da rugosidade palatina, provavelmente pela pressão do dispositivo exercido sobre a mucosa do palato. Também, sangramento da região de sulco gengival ocorreu durante a remoção do dispositivo. Isso se deve provavelmente pela cimentação do dispositivo nos dentes dos animais com resina acrílica, que penetra em toda região de sulco e provoca inflamação gengival.

Na análise de sangue coletado, os animais apresentaram níveis de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e hemácias similares para todos os grupos. Toboutie et al.<sup>48</sup> observaram que os animais que utilizaram dispositivo inoculados com *C. albicans* apresentaram um aumento do percentual de neutrófilos e uma diminuição percentual de linfócitos após 4 dias de uso do dispositivo quando comparado com animais saudáveis<sup>48</sup>. Os neutrófilos, monócitos e macrófagos são as células do sistema imune inato recrutadas nos locais de infecção por *C. albicans*, capazes de expressar receptores de reconhecimento fúngico<sup>64</sup>.

## 7 CONCLUSÃO

Com a metodologia utilizada, a estomatite protética não foi induzida nos ratos machos e nem nas ratas fêmeas. Porém, a colocação do dispositivo aumentou a microbiota total da cavidade bucal dos animais. A microbiota fúngica da cavidade do palato foi maior para os grupos Ca, Cg, CaCg, CaCgCt em relação ao grupo CD, sendo que a espécie tripla apresentou o maior valor de UFC, apesar de a análise histológica não ter mostrado presença de fungos no epitélio.

## REFERÊNCIAS\*

1. Telles DR, Karki N, Marshall MW. Oral fungal infections: diagnosis and management. *Dent Clin North Am.* 2017 Apr; 61(2): 319-49.
2. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011 Jun; 20(4): 251-60.
3. Pina GM, Lia EN, Berretta AA, Nascimento AP, Torres EC, Buszinski AF et al. Efficacy of propolis on the denture stomatitis treatment in older adults: a multicentric randomized trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017; 2017: 8971746.
4. Newton A: Denture sore mouth, a possible etiology. *Br Dent J* 1962; 112: 357-360.
5. Javed F, Al-Kheraif AA, Kellesarian SV, Vohra F, Romanos GE. Oral *Candida* carriage and species prevalence in denture stomatitis patients with and without diabetes. *J BiolRegulHomeostAgents.* 2017 Apr-Jun; 31(2): 343-46.
6. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26(6): 377-84.
7. Aguayo S, Marshall H, Pratten J, Bradshaw D, Brown JS, Porter SR et al. Early Adhesion of *Candida albicans* onto Dental Acrylic Surfaces. *J Dent Res.* 2017 Jul; 96(8): 917-23.
8. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Mar 1; 16(2): 139-43.
9. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88(11): 982-90.
10. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology.* 2007; 153(10): 3211-7.
11. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Aug 16; 9(10): 737-48.
12. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015;6(4):338-46.
13. Mothibe JV, Patel M. Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. *MicrobPathog.* 2017 Sep; 110: 128-34.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol*. 2011 Feb; 49(2): 208-11.
15. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Oct; 18(10): E380-8.
16. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jun; 111(6): 726-33.
17. Wu PF, Liu WL, Hsieh MH, Hii IM, Lee YL, Lin YT, Ho MW et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans* *Candida* species from cancer patients. *Emerg Microbes Infect*. 2017 Oct 11; 6(10): e87.
18. Fathi N, Mohammadi R, Tabatabaiefar MA, Ghahri M, Sadrossadati SZ. Sequence-identification of *Candida* species isolated from candidemia. *Adv Biomed Res*. 2016 Sep 26; 5: 150.
19. Pignatari AC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, da Mota VP et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One*. 2016 Jan 25; 11(1): e0146909.
20. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol*. 2017 Jan 12; 7: 2173.
21. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*. 2009 Nov; 52(6): 467-75.
22. Tati S, Davidow P, McCall A, Hwang-Wong E, Rojas IG, Cormack B et al. *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS Pathog*. 2016 Mar 30; 12(3): e1005522.
23. Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(1): 70-75.
24. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect*. 2014 Oct; 69(4): 396-407.
25. Riera M, Mogensen E, d'Enfert C, Janbon G. New regulators of biofilm development in *Candida glabrata*. *Res Microbiol*. 2012; 163: 297–307.
26. Kirkpatrick WR, Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Patterson TF. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 902–4.

27. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 1200–8.
28. Vipulanandan G, Herrera M, Wiederhold NP, Li X, Mintz J, Wickes BL et al. Dynamics of Mixed- *Candida* Species Biofilms in Response to Antifungals. *J Dent Res*. 2018 Jan; 97(1): 91-98.
29. Redding SW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, et al. *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 1879-81.
30. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003; 47(5): 321-6.
31. Olsen I, Bondevik O. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand J Dent Res*. 1978 Sep; 86(5): 392-8.
32. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr; 14(2): 398-429.
33. Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun*. 2010 Sep; 78(9): 3650-9.
34. Johnson CC, Yu A, Lee H, Fidel PL Jr, Noverr MC. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. *Infect Immun*. 2012 May; 80(5): 1736-43.
35. Jennings KJ, MacDonald DG. A quantitative method for assessing changes in rat palatal histology under denture-like appliances. *Arch Oral Biol*. 1990; 35(7): 557-9.
36. Nakashima K, Sato T, Hara T, Minagi S. An experimental study on histopathological changes in the tissue covered with denture base without occlusal pressure. *J Oral Rehabil*. 1994 May; 21(3): 263-72.
37. Hara T, Sato T, Nakashima K, Minagi S. Effect of occlusal pressure on the histopathological changes in denture supporting tissues. *J Oral Rehabil*. 1996 Jun; 23(6): 363-71.
38. Mori S, Sato T, Hara T, Nakashima K, Minagi S. Effect of continuous pressure on histopathological changes in denture-supporting tissues. *J Oral Rehabil*. 1997 Jan; 24(1): 37-46.
39. Hotta J, Cral WG, Sakima VT, Lara VS, Urban VM, Neppelenbroek KH. Intraoral Device for Optimal Antifungal Delivery in a Rat Model. *Curr Drug Deliv*. 2017; 14(5): 658-667.
40. Meister LM, Bail M, Pellissari CV, Ban MC, Campagnoli EB, Jorge JH et al. Description of a Rat Palatal Acrylic Plate That Can Be Relined. *J Prosthodont*. 2015 Oct; 24(7): 562-8.

41. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Relative effectiveness of various yeasts, *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the Wistar rat. Arch Oral Biol. 1983; 28(11): 1069-71.
42. Sultan AS, Rizk AM, Vila T, Ji Y, Masri R, Jabra-Rizk MA. Digital Design of a Digital Design of a Universal Rat Intraoral Device for Therapeutic Evaluation of a Topical Formulation against Candida-Associated Denture Stomatitis. Infect Immun. 2019 Nov 18; 87(12): e00617-19.
43. Yano J, Yu A, Fidel PL Jr, Noverr MC. Candida glabrata Has No Enhancing Role in the Pathogenesis of Candida-Associated Denture Stomatitis in a Rat Model. mSphere. 2019 Apr 3; 4(2): e00191-19.
44. Totti MA, Jorge AO, dos Santos EB, de Almeida OP, Scully C. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats. J Oral Pathol Med. 1996 Jul; 25(6): 308-10.
45. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, Ho PL. The relative pathogenicity of *Candida krusei* and *C. albicans* in the rat oral mucosa. J Med Microbiol. 1998 Dec; 47(12): 1047-57.
46. Maruo Y, Sugimoto T, Oka M, Hara T, Sato T. Accelerated DNA fragmentation of the denture-bearing mucosal epithelium in an animal model of diabetes. J Oral Rehabil. 2001 Apr; 28(4): 393-9.
47. Shakir BS, Smith CJ, Martin MV. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the Wistar rat. J Oral Pathol. 1986 Aug; 15(7): 375-80.
48. Tobouti PL, Casaroto AR, de Almeida RS, de Paula Ramos S, Dionísio TJ, Porto VC et al. Expression of Secreted Aspartyl Proteinases in an Experimental Model of *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. J Prosthodont. 2016 Feb; 25(2): 127-34.
49. Lee H, Yu A, Johnson CC, Lilly EA, Noverr MC, Fidel PL Jr. Fabrication of a multi-applicable removable intraoral denture system for rodent research. J Oral Rehabil. 2011 Sep; 38(9): 686-90.
50. Johnson CC, Yu A, Lee H, Fidel PL Jr, Noverr MC. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. Infect Immun. 2012 May; 80(5): 1736-43.
51. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, Abe S. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. Microbiol Immunol. 2003; 47(5): 321-6.
52. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Mar; 109(3): 392-401.

53. Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy mediated by curcumin-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. *Molecules*. 2018 Aug 19; 23(8): 2075.
54. Totti MA, Jorge AO, dos Santos EB, de Almeida OP, Scully C. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats. *J Oral Pathol Med*. 1996 Jul; 25(6): 308-10.
55. Barclay SC, MacDonald DG, Watson IB. The effect of chairside relining materials on rat palatal mucosa. *J Dent*. 1997 May-Jul; 25(3-4): 251-5.
56. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Induced palatal candidosis in the Wistar rat. *Arch Oral Biol*. 1981; 26(10): 787-93.
57. Shakir BS, Smith CJ, Martin MV. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the Wistar rat. *J Oral Pathol*. 1986 Aug; 15(7): 375-80.
58. Martin MV, Appleton J, Chesters J, Smalley JW. The effect of *Candida albicans* on the permeability of rat palatal epithelium: an ultrastructural and biochemical study. *J Med Vet Mycol*. 1987 Feb; 25(1): 19-28.
59. Russell C, Jones JH. The effects of oral inoculation of the yeast and mycelial phases of *Candida albicans* in rats fed on normal and carbohydrate rich diets. *Arch Oral Biol*. 1973 Mar; 18(3): 409-12.
60. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relining resin. *J Prosthodont*. 2008 Jun; 17(4): 312-7.
61. Komatsu K, Shibata T, Shimada A, Viidik A, Chiba M. Age-related and regional differences in the stress-strain and stress-relaxation behaviours of the rat incisor periodontal ligament. *J Biomech*. 2004; 37(7): 1097-1106.
62. Sugio CYC, Garcia AAMN, Albach T, et al. *Candida*-Associated Denture Stomatitis and Murine Models: What Is the Importance and Scientific Evidence?. *J Fungi (Basel)*. 2020; 6(2): 70.
63. de Barros PP, Rossoni RD, Freire F, Ribeiro FC, Lopes LADC, Junqueira JC et al. *Candida tropicalis* affects the virulence profile of *Candida albicans*: an in vitro and in vivo study. *Pathog Dis*. 2018 Mar 1; 76(2).
64. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan; 6(1): 67-78.
65. Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. 2013 Jul 1; 4(5): 391-9.

## ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO CEUA



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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 25/2018

Araraquara, 25 de setembro de 2020.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado **"VALIDAÇÃO DE UM MODELO IN VIVO DE ESTOMATITE PROTÉTICA CAUSADO POR CANDIDA SPP. E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOQUERATINAS EPITELIAIS "** (Proc. CEUA nº 25/2018), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração na metodologia.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **MARÇO/2021**.

Atenciosamente.

  
**Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE**  
Coordenadora da CEUA

Ao  
Prof. Dr. EWERTON GARCIA DE OLIVEIRA MIMA  
DD. Pesquisador Responsável  
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

## APÊNDICE A – CONTROLE DE PESO DOS ANIMAIS

Fêmeas:

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
t0	,139	19	,200*	,944	19	,308
t7	,087	19	,200*	,967	19	,716
t14	,106	19	,200*	,954	19	,464
t10	,168	19	,164	,922	19	,125
t28	,154	19	,200*	,970	19	,774
t21	,158	19	,200*	,946	19	,344
t35	,108	19	,200*	,977	19	,897
t42	,143	19	,200*	,944	19	,306

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

### Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon <sup>b</sup>		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
tempo	,000	150,090	27	,000	,289	,325	,143

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: tempo

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
tempo	Sphericity Assumed	25825,868	7	3689,410	14,173	,000
	Greenhouse-Geisser	25825,868	2,020	12785,668	14,173	,000
	Huynh-Feldt	25825,868	2,276	11344,686	14,173	,000
	Lower-bound	25825,868	1,000	25825,868	14,173	,001

Machos:

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
t0	,104	17	,200*	,928	17	,198
t7	,111	17	,200*	,948	17	,432
t10	,108	17	,200*	,950	17	,457
t14	,137	17	,200*	,965	17	,735
t21	,179	17	,149	,930	17	,215
t28	,109	17	,200*	,967	17	,771
t35	,105	17	,200*	,978	17	,935
t42	,160	17	,200*	,939	17	,308

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

#### Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon <sup>b</sup>		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
tempo	,000	121,204	27	,000	,324	,381	,143

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: tempo

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

#### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
tempo	Sphericity Assumed	142555,699	7	20365,100	30,184	,000
	Greenhouse-Geisser	142555,699	2,271	62768,259	30,184	,000
	Huynh-Feldt	142555,699	2,667	53459,632	30,184	,000
	Lower-bound	142555,699	1,000	142555,699	30,184	,000

## APÊNDICE B – RECUPERAÇÃO FINAL SDA

### TestsofNormality

	grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UFC_f_dispo	CD	,252	10	,072	,850	10	,058
	CA	,194	10	,200*	,901	10	,227
	CG	,148	10	,200*	,925	10	,402
	CT	,143	10	,200*	,977	10	,948
	Cacg	,225	10	,163	,899	10	,216
	Cact	,195	10	,200*	,916	10	,325
	CgCt	,279	10	,026	,811	10	,020
	Cacgct	,217	10	,200*	,880	10	,132
Ufc_f_palato	CD	,221	10	,181	,880	10	,131
	CA	,155	10	,200*	,958	10	,766
	CG	,167	10	,200*	,922	10	,373
	CT	,161	10	,200*	,974	10	,925
	Cacg	,113	10	,200*	,983	10	,979
	Cact	,229	10	,148	,886	10	,155
	CgCt	,292	10	,015	,875	10	,114
	Cacgct	,316	10	,005	,831	10	,035

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. LillieforsSignificanceCorrection

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: Ufc\_f\_palato

F	df1	df2	Sig.
,746	15	64	,729

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + grupos + sexo + grupos \* sexo

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ufc\_f\_palato

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	41,616 <sup>a</sup>	15	2,774	5,697	,000
Intercept	803,408	1	803,408	1649,869	,000
grupos	34,518	7	4,931	10,127	,000
sexo	,190	1	,190	,390	,535
grupos * sexo	6,908	7	,987	2,027	,065
Error	31,165	64	,487		
Total	876,189	80			
Corrected Total	72,781	79			

a. R Squared = ,572 (Adjusted R Squared = ,471)

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: UFC\_f\_dispo

F	df1	df2	Sig.
1,424	15	64	,164

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + grupos + sexo + grupos \* sexo

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: UFC\_f\_dispo

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	48,070 <sup>a</sup>	15	3,205	7,401	,000
Intercept	1023,094	1	1023,094	2362,898	,000
grupos	42,456	7	6,065	14,008	,000
sexo	,175	1	,175	,404	,527
grupos * sexo	5,439	7	,777	1,795	,104
Error	27,711	64	,433		
Total	1098,875	80			
Corrected Total	75,781	79			

a. R Squared = ,634 (Adjusted R Squared = ,549)

## APÊNDICE C – RECUPERAÇÃO INICIAL E FINAL - BHI

Tests of Normality							
	grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UFCi	ca	,198	10	,200*	,857	10	,070
	cg	,209	10	,200*	,898	10	,209
	ct	,181	10	,200*	,934	10	,484
	cacg	,256	10	,062	,756	10	,004
	cact	,158	10	,200*	,937	10	,525
	ctcg	,223	10	,172	,831	10	,035
	cacgct	,119	10	,200*	,978	10	,954
	c	,154	10	,200*	,924	10	,395
UFCf	ca	,196	10	,200*	,932	10	,467
	cg	,166	10	,200*	,963	10	,819
	ct	,280	10	,025	,878	10	,123
	cacg	,159	10	,200*	,969	10	,882
	cact	,313	10	,006	,770	10	,006
	ctcg	,278	10	,028	,897	10	,201
	cacgct	,139	10	,200*	,946	10	,624
	c	,155	10	,200*	,916	10	,325
UFCf_d	ca	,209	10	,200*	,922	10	,374
	cg	,159	10	,200*	,957	10	,756
	ct	,145	10	,200*	,962	10	,811
	cacg	,246	10	,087	,923	10	,384
	cact	,323	10	,004	,749	10	,004
	ctcg	,244	10	,095	,803	10	,016
	cacgct	,203	10	,200*	,906	10	,253
	c	,267	10	,041	,771	10	,007

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

	F	df1	df2	Sig.
UFCi	5,274	15	64	,000
UFCf	3,396	15	64	,000
UFCf_d	5,075	15	64	,000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + sexo + grupo + sexo \* grupo

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	UFCi	8,117 <sup>a</sup>	15	,541	4,116	,000
	UFCf	4,055 <sup>b</sup>	15	,270	1,540	,118
	UFCf_d	3,426 <sup>c</sup>	15	,228	2,358	,009
Intercept	UFCi	2981,293	1	2981,293	22677,369	,000
	UFCf	3980,503	1	3980,503	22676,925	,000
	UFCf_d	4340,349	1	4340,349	44808,763	,000
sexo	UFCi	,051	1	,051	,389	,535
	UFCf	,023	1	,023	,133	,717
	UFCf_d	,086	1	,086	,893	,348
grupo	UFCi	7,067	7	1,010	7,679	,000
	UFCf	3,064	7	,438	2,494	,025
	UFCf_d	2,283	7	,326	3,367	,004
sexo * grupo	UFCi	,999	7	,143	1,086	,383
	UFCf	,967	7	,138	,787	,601
	UFCf_d	1,057	7	,151	1,558	,164
Error	UFCi	8,414	64	,131		
	UFCf	11,234	64	,176		
	UFCf_d	6,199	64	,097		
Total	UFCi	2997,824	80			
	UFCf	3995,792	80			
	UFCf_d	4349,974	80			
Corrected Total	UFCi	16,531	79			
	UFCf	15,289	79			
	UFCf_d	9,625	79			

a. R Squared = ,491 (Adjusted R Squared = ,372)

b. R Squared = ,265 (Adjusted R Squared = ,093)

c. R Squared = ,356 (Adjusted R Squared = ,205)

## APÊNDICE D – HEMOGRAMA

### Tests of Normality

	grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UFC_f_dispo	CD	,252	10	,072	,850	10	,058
	CA	,194	10	,200*	,901	10	,227
	CG	,148	10	,200*	,925	10	,402
	CT	,143	10	,200*	,977	10	,948
	Cacg	,225	10	,163	,899	10	,216
	Cact	,195	10	,200*	,916	10	,325
	CgCt	,279	10	,026	,811	10	,020
	Cacgct	,217	10	,200*	,880	10	,132
Ufc_f_palato	CD	,221	10	,181	,880	10	,131
	CA	,155	10	,200*	,958	10	,766
	CG	,167	10	,200*	,922	10	,373
	CT	,161	10	,200*	,974	10	,925
	Cacg	,113	10	,200*	,983	10	,979
	Cact	,229	10	,148	,886	10	,155
	CgCt	,292	10	,015	,875	10	,114
	Cacgct	,316	10	,005	,831	10	,035

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: WBC

F	df1	df2	Sig.
3,106	15	58	,001

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + grupo + sexo + grupo \* sexo

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: WBC

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	273,115 <sup>a</sup>	15	18,208	1,558	,115
Intercept	6778,508	1	6778,508	580,168	,000
grupo	92,035	7	13,148	1,125	,360
sexo	152,678	1	152,678	13,068	,001
grupo * sexo	34,327	7	4,904	,420	,886
Error	677,655	58	11,684		
Total	7811,182	74			
Corrected Total	950,770	73			

a. R Squared = ,287 (Adjusted R Squared = ,103)

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: NEUT

F	df1	df2	Sig.
4,797	15	54	,000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + grupo + sexo + grupo \* sexo

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NEUT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	30,841 <sup>a</sup>	15	2,056	2,516	,007
Intercept	384,463	1	384,463	470,375	,000
grupo	6,696	7	,957	1,170	,335
sexo	12,522	1	12,522	15,320	,000
grupo * sexo	11,313	7	1,616	1,977	,075
Error	44,137	54	,817		
Total	472,248	70			
Corrected Total	74,978	69			

a. R Squared = ,411 (Adjusted R Squared = ,248)

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: LIMPH

F	df1	df2	Sig.
1,367	15	54	,197

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + grupo + sexo + grupo \* sexo

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LIMPH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	75,029 <sup>a</sup>	15	5,002	1,547	,121
Intercept	2666,118	1	2666,118	824,678	,000
grupo	20,772	7	2,967	,918	,500
sexo	44,688	1	44,688	13,823	,000
grupo * sexo	10,353	7	1,479	,457	,861
Error	174,578	54	3,233		
Total	2990,610	70			
Corrected Total	249,606	69			

a. R Squared = ,301 (Adjusted R Squared = ,106)

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: RBC

F	df1	df2	Sig.
,901	15	57	,567

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + grupo + sexo + grupo \* sexo

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: RBC

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	18,095 <sup>a</sup>	15	1,206	3,221	,001
Intercept	4872,242	1	4872,242	13010,448	,000
grupo	5,757	7	,822	2,196	,048
sexo	10,161	1	10,161	27,132	,000
grupo * sexo	1,419	7	,203	,541	,800
Error	21,346	57	,374		
Total	5024,517	73			
Corrected Total	39,441	72			

a. R Squared = ,459 (Adjusted R Squared = ,316)

**Autorizo a reprodução deste trabalho**

**(Direitos de publicação reservados ao autor)**

**Araraquara, 18 de dezembro de 2020.**

**Vinicius Tatsuyuji Sakima**