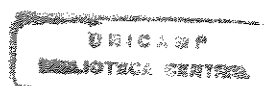


Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

Aderência de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* na superfície da língua de ratos normais e xerostômicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Mestre em Estomatopatologia, área de Patologia

Piracicaba
2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2001.8.9.23

Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

Aderência de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* na superfície da língua de ratos normais e xerostômicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Mestre em Estomatopatologia, área de Patologia

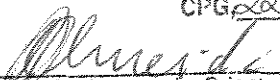
Orientador: Oslei Paes de Almeida

Banca Examinadora:

Antonio Olavo Cardoso Jorge
Pablo Agustin Vargas
Oslei Paes de Almeida

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG 22/05/2001



Assinatura do Orientador

Piracicaba
2001

Ficha Catalográfica

R163a Rangel, Ana Lúcia Carrinho Ayroza.
Aderência de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* na superfície da língua de ratos normais e xerostômicos. /
Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
x, 63f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Adesão. 2. Glândulas salivares. I. Almeida, Oslei Paes de. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 15 de Março de 2001, considerou a candidata ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL aprovada.

1. Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

2. Prof. Dr. ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE

3. Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

"Os caminhos conhecidos são seguros e fáceis mas apenas conduzem aos lugares onde já estamos e não desejamos ficar. O caminho do novo é cheio de riscos, surpresas e cansaço. Mas sempre premia os que escolhem com a chance de descobrir e experimentar a vida que imaginaram viver".

Aos meus queridos pais, **Gregório e Amy**

Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida!

Obrigada por tanto amor!

À toda minha **família**, às minhas queridas tias
Adeny e Avany, aos meus tios, primos e às minhas
inseparáveis amigas de Lorena

Obrigada pelo incentivo, apoio e carinho!

Ao Professor **Oslei Paes de Almeida**,

“Talvez seja um pai, um professor ou um amigo da família, uma pessoa mais amadurecida, paciente e sábia que se interesse por nós e nos compreenda, quando somos jovens, inquietos e inseguros e que nos faça olhar o mundo de uma perspectiva diferente, ajudando-nos com seus conselhos a encontrar nossos novos caminhos”.

Para mim essa pessoa foi você, professor! Me acolheu, ensinou e orientou, passando-me sempre ensinamentos e grandes lições de vida! Muito obrigada!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor Prof^º. Dr Antônio Wilson Salum e ao Prof^º. Dr. Pablo Agustin Vargas, atual coordenador do curso de Pós-graduação em Estomatopatologia.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos, contribuindo para a realização do Curso de Pós-graduação.

Aos professores da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial aos professores Ricardo Della Colleta e Pablo Agustin Vargas pelos ensinamentos e pela amizade durante esses anos!

Aos professores de patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, Heron Fernando de Souza Gonzaga e Luís Carlos Spolidório, pelo agradável convívio!

Ao Professor Antonio Olavo Cardoso Jorge, obrigada pelo incentivo e apoio desde quando tudo começou!

Ao Fábio Alves, pelo carinho e companheirismo!

À Bete, Susana e Silvia por me ensinarem os primeiros passos!

Aos meus colegas de curso, Junior, Roberto, Renata, Eduardo, Cristina pela amizade!

Aos meus queridos amigos da turma de mestrado, Cláudio, Danyel, Fábio Pacheco, Paulo Faria, Karina Neves, Karina Zecchin, Cíntia e Marcelo por tantos momentos alegres!

Às minhas especiais amigas, Paola e Addah, pela confiança e lealdade!

Aos colegas Paulo Faria, Paulo Bonan, Fábio Ramôa e Karina Zecchin, especial agradecimento pela realização das fotos, ajuda na cirurgia dos animais e pela boa-vontade sempre encontrada!

Aos amigos do laboratório Ana Cristina do Amaral Godoy, Maria Helena Vasconcelos Peron, Adriano Luís Martins, João Carlos G. da Silva Junior e Rosa Maria Fornasiari pela paciência em passar seus conhecimentos muitas e muitas vezes! Obrigada pelo convívio!

Ao Sr. Wanderlei, pela ajuda no cuidado com os animais.

Ao Prof. Marcelo Corrêa Alves pela realização da análise estatística.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. Gênero <i>Candida</i>	04
2.2. <i>Candida albicans</i>	05
2.3. <i>Candida tropicalis</i>	06
2.4. <i>Candida Krusei</i>	06
2.5. Presença de fungos na boca	07
2.6. Candidose bucal	08
2.7. Xerostomia	10
2.8. Mecanismos de patogenicidade e aderência do Gênero <i>Candida</i>	12
3. PROPOSIÇÃO	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Animais	18
4.2. Amostras	19
4.3. Dessalivação	19
4.4. Presença de leveduras na boca de ratos normais	22
4.5. Preparo da suspensão de <i>Candida</i> e inoculações das amostras	22
4.6. Quantificação de leveduras aderidas	23
4.7. Quantificação de saliva e recuperação das espécies de <i>Candida</i>	24
4.8. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9. ANEXO	58

RESUMO

A adesão de microrganismos às superfícies mucosas do hospedeiro é um pré-requisito importante para a colonização e infecção microbiana. Dentre as espécies de *Candida*, *C.albicans* é considerada a mais patogênica e com maior capacidade de aderência às células epiteliais, seguida de *C.tropicalis*. *C.krusei* é uma espécie pouco patogênica e com baixa capacidade de aderência, causadora de doença principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Muitos dos estudos sobre aderência de *Candida* são realizados *in vitro*, havendo poucos estudos *in vivo*. Este trabalho teve como objetivo principal estudar a aderência de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* no dorso da língua de ratos.

Foram utilizados 270 ratos divididos em 3 grupos de 90 animais, cada grupo recebendo inóculo de uma das três espécies e sendo composto de 45 animais normais e 45 xerostômicos. A recuperação de *Candida* a partir da saliva foi realizada nos períodos de 5, 15, 30, 60 minutos e 4, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Logo em seguida os animais foram sacrificados e a língua foi retirada para contagem de leveduras aderidas. A quantificação foi feita a partir do volume de saliva coletado e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas. A contagem foi realizada em 20 campos da região das papilas verdadeiras da língua dos ratos. Os resultados mostraram que a aderência de *Candida* ocorre principalmente na queratina mole das papilas verdadeiras, sobre a placa bacteriana presente nesta área. A xerostomia aumentou a quantidade de placa bacteriana nas papilas linguais e facilitou a aderência das três espécies de *Candida*, aumentando também o número de leveduras recuperadas. *C.krusei*, *C.tropicalis* e *C.albicans* apresentaram valores semelhantes tanto na recuperação como na contagem.

ABSTRACT

The adhesion of microorganisms to host mucosal surfaces is an important prerequisite for successful microbial colonization and infection. *Candida albicans* is the most pathogenic of *Candida* species and has a high ability of adherence to epithelial cells, followed by *C.tropicalis*. *C.krusei* is the least pathogenic species, causing candidosis only in immunocompromised host. Candidal adherence is studied mainly *in vitro*, and there are few *in vivo* studies. The aim of this study was to determine *in vivo* *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C.krusei* adhesion to rat tongue.

270 rats were divided in 3 groups of 90 animals, each group having 45 normal and 45 xerostomic rats. Each group received oral inoculation of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* or *Candida krusei* suspension and yeasts were recovered from saliva after 5, 15, 30, and 60min, and in 4, 12, 24, 48, and 72h. After saliva recovery the rats were sacrificed and their tongues removed for histological evaluation and yeasts quantification, considering the volume of saliva recovered and the number of colony-forming units (CFU). Histologically, 20 high-power fields of true papillae of the rat tongue were counted and the results showed that the *Candida* adherence occurred mainly over the bacterial plaque in the “soft keratin” of the papillae. Xerostomia increased the amount of bacterial plaque in the papillae and facilitated the adherence of all three species, increasing also the number of recovered yeasts. *C.krusei*, *C.tropicalis* and *C.albicans* showed similar values in salivary recovery and histological quantification.

1. Introdução

A aderência de microrganismos às superfícies mucosas é um pré-requisito fundamental para o sucesso da colonização e infecção microbiana, e sua importância na patogenia das infecções fúngicas é amplamente reconhecida (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE 1998). O mecanismo de aderência ainda não está bem esclarecido, embora acredite-se que a adesão de leveduras à mucosa bucal ocorra provavelmente pela interação entre adesinas dos microrganismos e receptores das células epiteliais (OLSEN 1990).

A doença fúngica mais comum da cavidade bucal é a candidose (SAMARANAYAKE 1986, FREITAS & BIRMAN 1989), podendo ser causada por várias espécies de *Candida*. *C. albicans* é a espécie mais patogênica e também a mais freqüentemente envolvida em infecções orais (ODDS *et al.* 1989, HEIMDAHL 1990), seguida por *C. tropicalis* (ODDS 1987) e outras espécies menos patogênicas como *C. krusei* (SAMARANAYAKE *et al.* 1998).

A saliva parece interferir na aderência de microrganismos, entretanto seu papel na adesão de leveduras é pouco conhecido. É provável que componentes específicos da saliva ou do soro possam mediar essa adesão (SAMARANAYAKE & MACFARLANE 1982).

A maioria dos estudos de aderência de *Candida* são realizados *in vitro*. Entretanto, alguns estudos experimentais *in vivo* têm demonstrado os efeitos da xerostomia sobre a aderência de *Candida*, comprovando uma maior aderência às superfícies mucosas de ratos xerostômicos quando comparados aos normais (JORGE *et al.* 1993a, JORGE *et al.* 1993b, SANTOS 1999). Vários trabalhos mostram lesões orais induzidas por *C. albicans* em animais, entretanto há pouca informação sobre espécies menos patogênicas como *C. krusei* (SAMARANAYAKE *et al.* 1998). O objetivo deste trabalho foi verificar a aderência de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* *in vivo* no dorso da língua de ratos associada aos efeitos da xerostomia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GÊNERO *Candida*

Cerca de 25 gêneros e 167 espécies de fungos já foram isolados em humanos, sendo 10 gêneros e 40 espécies identificados como causadores de infecção. As leveduras são os únicos fungos pertencentes a microbiota normal do homem (STENDERUP 1990). Neste grupo se encontra o gênero *Candida* que compreende aproximadamente 200 espécies de fungos (KREGER-van RIJ 1984). *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* são encontradas como parte da microbiota oral normal de indivíduos saudáveis, embora também sejam reconhecidas como importantes patógenos. Entretanto, *C. albicans* é a espécie mais patogênica, encontrada no corpo humano sob forma comensal ou oportunista (STENDERUP 1990, CANNON *et al.* 1995, LOCKHART *et al.* 1999).

As espécies do gênero *Candida* estão amplamente distribuídas na natureza. No homem pode ser isolada da orofaringe, boca, vagina, pele, embora o trato gastrointestinal continue sendo o maior reservatório. Várias espécies foram isoladas da água do mar, esgoto, solo, plantas, mamíferos, aves, frutas, laticínios e cosméticos (HEIMDAHL & NORD 1990, STENDERUP 1990, CANNON *et al.* 1995).

2.2 *Candida albicans*

É um fungo que pode crescer sob diferentes formas, desde levedura à hifa (CANNON *et al.* 1995). Na forma de levedura apresenta-se como célula globosa, ovalada ou alongada, medindo em média 3 a 7µm de largura por 3 a 14µm de comprimento (MEYER *et al.* 1984). Na forma de micélio, suas células apresentam-se como pseudo-hifas, podendo também formar hifas verdadeiras. São microrganismos Gram-positivos, aeróbios, sendo capazes de crescer em anaerobiose, o que acentua a formação de micélio *in vitro* (PETTINATI 1980, DAHLE & OLSEN 1991). Em ágar-fubá produz clamidósporos e em soro a 37°C, formam colônias brancas ou branco-amareladas, com diâmetro variando de 4 a 8mm, úmidas, cremosas e com odor característico. Fermenta glicose e maltose, sendo variável para galactose. Assimila glicose, galactose, maltose e sacarose (MEYER *et al.* 1984).

C. albicans é a espécie relatada com maior frequência em candidoses bucais, vaginites, infecções em vários órgãos (AHEARN 1978, BASSIONY *et al.* 1984, ALLEN 1992), fungemias hospitalares (HARVEY & MYERS 1987, KOMSHIAN *et al.* 1989, MARINA *et al.* 1991) e pacientes debilitados (TYLENDÁ *et al.* 1989, PAULA *et al.* 1990, FRANKER *et al.* 1990, HEIMDAHL & NORD 1990, WILKIESON *et al.* 1991).

2.3 *Candida tropicalis*

Microscopicamente as células em brotamento são esféricas, ovais ou alongadas, medindo 2,5 µm de largura por 3 a 14 µm de comprimento, podendo apresentar-se em cachos ou cadeias. O fungo cresce bem a 25 e 37°C em ágar Sabouraud dextrose, em anaerobiose, produzindo colônias lisas e brancas, formando película em caldo. No microcultivo *C. tropicalis* forma pseudohifa, mas não clamidósporo. Embora algumas amostras possam formar tubos germinativos atípicos, a maioria não os produz (GELFAND 1989). Assimila glicose, maltose, sacarose, galactose e trealose (GELFAND 1989, SANDVEN 1990).

C. tropicalis está presente em candidoses invasivas (MARINA *et al.* 1991), com infecções indistinguíveis das produzidas por *C. albicans*. Depois de *C. albicans*, *C. tropicalis* é a espécie mais comumente envolvida em infecções orais e sistêmicas (GELFAND 1989). É encontrada no meio ambiente e em culturas de rotina do nariz, garganta, pele, vagina e trato gastrintestinal de indivíduos saudáveis (AHEARN 1978).

2.4 *Candida krusei*

Apresenta-se como células ovóides e predominantemente cilíndricas. Pode formar pseudomicélio. O tamanho das células é variável, medindo aproximadamente 3 a 5µm de largura por 6 a 20µm de comprimento. Em ágar Sabouraud dextrose apresenta colônias amareladas, com aspecto semi-opaco e superfície lisa ou rugosa. Cultivando-se em meio líquido, uma fina película que se

estende contra a parede do vidro é formada na maioria das amostras. Fermenta e assimila apenas glicose(SANDVEN 1990).

C. krusei pode ser isolada da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (STENDERUP 1990), tendo sido descrita em infecções oculares, candidoses vaginais, artrites e fungemias hospitalares (MCLLROY 1991, SANDIN *et al.* 1993). Entretanto, *C.krusei* é uma espécie menos patogênica e com baixa capacidade de aderência às células epiteliais, causando doença em indivíduos imunocomprometidos (SAMARANAYAKE *et al.* 1998).

2.5 PRESENÇA DE FUNGOS NA BOCA

As leveduras são os únicos fungos pertencentes a microbiota normal do homem (STENDERUP 1990). A presença de espécies do gênero *Candida* na cavidade bucal pode apresentar um índice de variação entre 35 a 60% em indivíduos sadios, sendo essa variação decorrente possivelmente dos diferentes métodos de coleta, origem das amostras, meio de cultura, grupos de indivíduos estudados e métodos de análise (FOTOS *et al.* 1991, MARSH *et al.* 1992).

Na cavidade oral normal de pessoas portadoras de *Candida*, *C.albicans* compreende 60-70% dos isolados, *C. tropicalis* 7%, *C.krusei* e *C.guilliermondii* são bem menos freqüentemente isoladas (STENDERUP 1990).

ARENDORF & WALKER (1980) obtiveram culturas positivas para leveduras, sendo *C. albicans* identificada em 88% e *C.krusei* e *C.guilliermondii* em 4%. Observaram que *C. albicans* não estava distribuída uniformemente na boca;

sendo que o dorso da língua era o reservatório primário do fungo e a superfície dos dentes, saliva e o restante da mucosa eram secundariamente colonizados.

Vários fatores têm sido implicados na presença de *Candida* na boca, tais como a dieta (SAMARANAYAKE, 1986), interações com a microbiota bacteriana, diferenças no tecido do hospedeiro e fluídos corpóreos (WILLIAMSON 1972), presença de anticorpos específicos e componentes do soro (STENDERUP 1990). O estado de portador também tem sido relacionado com o grupo sangüíneo tipo O (BURFORD-MASON *et al.* 1988). Indivíduos não secretores de antígenos dos grupos sangüíneos na saliva apresentaram maior predisposição à candidose (LAMEY *et al.* 1991).

2.6 CANDIDOSE BUCAL

A infecção superficial causada pelo gênero *Candida*, incluindo a candidose oral, é a mais comum de todas as doenças fúngicas que afetam a raça humana e a principal encontrada na cavidade bucal (SAMARANAYAKE 1986, FREITAS & BIRMAN 1989). *C. albicans* é a espécie mais freqüentemente envolvida na candidose bucal, seguida de outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* (ODDS *et al.* 1989, HEIMDAHL & NORD 1990, SAMARANAYAKE *et al.* 1998).

A infecção é facilitada por fatores locais ou sistêmicos tais como uso de próteses totais, imunossupressão, AIDS, diabetes, antibioticoterapia e gravidez (STENDERUP 1990, LOCKHART *et al.* 1999). Como é uma doença oportunista, a

virulência da *Candida* é determinada mais pelo hospedeiro que por fatores inerentes à própria levedura (BUDTZ-JÖRGENSEN 1990a, ALLEN 1992).

O uso de próteses e aparelhos ortodônticos favorecem o abrigo de *Candida* na boca (WILLIAMSON 1972). Elevados números de leveduras foram encontrados por VANDENBUSCHE & SWINNE (1984) em portadores de prótese, sendo 82% *C. albicans*, 10,3% *C. tropicalis* e *Candida sp.*, 6,8% *C. parapsilosis* e 4,8% *C. glabrata*. A estomatite por prótese afeta cerca de 65% de seus usuários (IACOPINO & WATHEN 1992).

Uma variedade de fatores nutricionais incluindo deficiência de ferro, ácido fólico e vitaminas têm sido implicada na patogênese da candidose bucal (SAMARANAYAKE 1986). Dieta rica em carboidratos pode predispor à candidose bucal (OKSALA 1990). O uso de antibióticos de largo espectro leva a alterações na microflora oral e é um fator importante no estabelecimento de candidoses bucais, pela supressão da população bacteriana (OKSALA 1990). Pode ocorrer um impedimento ou inibição no desenvolvimento de microrganismos que atuariam como antagonistas à implantação da levedura, seja por competição de alimentos ou pela aderência à receptores nas células epiteliais que também servem de receptores para a *Candida*. Corticosteróides, uso excessivo de enxaguatórios bucais com ação antibacteriana e drogas que têm a xerostomia como efeito secundário predispõem à micoses orais. (OKSALA 1990).

As infecções por fungos têm se destacado nos últimos anos em pacientes imunocomprometidos, especialmente nos portadores de AIDS (ODDS *et al.* 1989). Têm sido demonstrado que a candidose oral é uma das primeiras manifestações

da doença (BUDTZ-JÖRGENSEN 1990b). *C. tropicalis* é a segunda espécie que mais causa doença nesses pacientes (GELFAND 1989).

2.7 XEROSTOMIA

Xerostomia significa boca seca, e também uma diminuição efetiva do fluxo salivar. A saliva apresenta importante papel na manutenção da saúde fisiológica da boca (EPSTEIN & SCULLY 1992), tendo diversas funções no trato digestivo. Modulando a microbiota, a saliva remove os microrganismos da boca para o estômago, onde são inativados pelo meio ácido (HERRERA *et al.* 1988). Apresenta função protetora, tanto pela limpeza mecânica como por mecanismos enzimáticos e imunológicos, além da manutenção de pH relativamente neutro na boca através de sua capacidade tampão (OKSALA 1990, EDGARD 1990). A secreção salivar é produzida quase na totalidade (90%) pelas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais. O restante é derivado de glândulas salivares menores (HERRERA *et al.* 1988).

Síndrome de Sjögren, radioterapia de cabeça e pescoço e o uso de medicamentos são as principais condições que podem levar à xerostomia em humanos (HERNANDEZ & DANIELS 1989, HEIMDAHL & NORD 1990).

O papel da saliva na adesão de leveduras é pouco conhecido. Entretanto é provável que componentes específicos da saliva ou do soro possam mediar essa adesão (SAMARANAYAKE & MACFARLANE 1982). A IgA salivar é capaz de inibir a aderência, neutralizar microrganismos e suas toxinas, podendo também inibir a

aderência de *C. albicans* às células epiteliais da boca (EPSTEIN *et al.* 1982). Componentes salivares como lisozima e lactoferrina podem inibir o crescimento de *C. albicans in vitro* (TOBGY *et al.* 1988); peptídios ricos em histidina são fungicidas (POLLOCK *et al.* 1984) e anticorpos salivares têm atividades anti-candida (BUDTZ-JÖRGENSEN 1990b).

A falta de lubrificação resulta na aderência da língua e bolo alimentar à mucosa bucal ou superfícies de dentes e próteses, dificultando a mastigação, deglutição e fonação (HERRERA *et al.* 1988).

Fluxo salivar reduzido é provavelmente uma das causas mais comuns de candidose em humanos, mas há poucos relatos em ratos (JORGE *et al.* 1993b). Entretanto alguns estudos experimentais têm demonstrado os efeitos da xerostomia na candidose bucal. MEITNER *et al.* (1990) desenvolveram candidose mais intensa na boca e esôfago de ratos com fluxo salivar reduzido. No estudo realizado por JORGE *et al.* (1993b), após 3 inoculações semanais de *C. albicans* durante 32 semanas, candidose foi observada em 70% dos ratos xerostômicos e em 20% dos animais com salivação normal. JORGE *et al.* (1993a) observaram após 3 inoculações, que *C.albicans* foi encontrada na boca de 50% dos animais normais e 100% dos animais xerostômicos após 5 semanas. Após 8 semanas *C.albicans* não foi encontrada em animais normais e encontrada em 66,6% dos animais xerostômicos. SANTOS (1999) encontrou resultados semelhantes, visto que a xerostomia facilitou a aderência de *C. albicans*, aumentou a quantidade de candidose e o número de leveduras recuperado da cavidade bucal de ratos.

2.8 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE E ADERÊNCIA DO GÊNERO *Candida*

Os mecanismos que determinam a patogenicidade do gênero *Candida* ainda não estão bem esclarecidos, entretanto várias hipóteses têm sido sugeridas como fatores intrínsecos das espécies e amostras, aderência aos tecidos, dimorfismo, produção de toxinas, enzimas e composição da superfície celular (ODDS 1987).

A aderência das leveduras às células epiteliais é um dos passos mais importantes no desenvolvimento de candidose, sendo necessária para a colonização inicial e persistência da *Candida* no hospedeiro (GHANNOUN *et al.* 1990, BUDTZ-JÖRGENSEN 1990a). Essa adesão às células epiteliais é também um fator importante em determinadas bactérias para a colonização de superfícies mucosas e provavelmente influencie na patogênese das infecções por *Candida* (GIBBONS & van ROUTE 1975). A associação de *Candida* com outras bactérias promove a colonização de leveduras ao biofilme oral, tecidos do hospedeiro e catéteres (el-AZIZI & KHARDORI 1999).

A aderência de *Candida* à mucosa bucal ocorre provavelmente pela interação entre adesinas do microrganismo e receptores das células epiteliais. As possíveis adesinas da *Candida* são manoproteínas, glucano e quitina, proteínas da parede celular e lipídios, manose, N-acetilglicosamina, mucinas, lamininas e colágeno (DOUGLAS 1987, GHANNOUM 1988, KENNEDY 1988, OLSEN 1990). Há evidências de que interações hidrofóbicas possam ser importantes na adesão

de leveduras (KLOTZ *et al.* 1985). Forças hidrofóbicas parecem ser relevantes nas etapas iniciais da interação adesina-receptor (HAZEN & HAZEN 1988, KENNEDY *et al.* 1988). Para COTTER & KAVANAGH (2000) a aderência de *Candida* ao tecido hospedeiro é alcançada por uma combinação de mecanismos específicos (interações ligante-receptor) e não-específicos (cargas eletrostáticas, forças de van der Waals). Moléculas presentes nas camadas mais externas das células de *Candida* são essenciais para a aderência às superfícies do hospedeiro. Entre elas receptores para fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno tipo I e IV e outros componentes da matriz extracelular têm sido descritos na superfície das células de *Candida* (SENET 1998, el-AZIZI & KHARDORI 1999). A expressão dessas moléculas pode ser influenciada por condições particulares de cada hospedeiro podendo ser responsável pela transição do comensalismo à patogenicidade. Proteínas da superfície também são essenciais para a interação entre o fungo e mecanismos de defesa que atuam durante a candidose (SENET 1998). A transformação de leveduras em hifas favorece a aderência, por estar associada a alterações na expressão de adesinas e hidrofobicidade na superfície celular (WELLMER & BERNHARDT 1997, MILLÄN *et al.* 2000). A adesão de *C. albicans* às superfícies orais é modulada por diferentes componentes salivares, incluindo mucinas, outras proteínas salivares e IgA secretora. Esses componentes podem ter efeitos diversos, acentuando ou inibindo a adesão. A inibição da adesão às superfícies orais é uma importante estratégia na prevenção da candidose. Várias pesquisas têm sido realizadas tentando inibir a aderência de *C. albicans* às células epiteliais e materiais plásticos. Entre elas o uso de antígenos de *C. albicans*,

proteínas do hospedeiro, agentes antifúngicos e anticorpos (MILLÄN *et al.* 2000). Açúcares têm um importante papel na aderência de *Candida*. Galactose promove maior aderência aos tecidos hospedeiros e superfícies plásticas em comparação a outros mono ou dissacarídeos. Por outro lado, açúcares com porção amino-terminal inibem a aderência de leveduras (el-AZIZI & KHARDORI 1999). PIZZO *et al.* (2000) estudando o efeito de carboidratos na adesão de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei in vitro* em células HeLa, encontraram uma maior adesão nas culturas ricas em carboidratos. Sugeriram que o consumo freqüente de carboidratos como sacarose, glicose, maltose e frutose pode representar um fator de risco à candidose oral. A limitação do consumo pela substituição por xilitol ou sorbitol pode contribuir para o controle da colonização e infecção por *Candida*.

Íons bivalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} promovem uma maior aderência de *Candida* em relação aos íons monovalentes (el-AZIZI & KHARDORI 1999).

A maioria dos estudos sobre aderência de *Candida* é realizada *in vitro*. Em cultura de células da mucosa do dorso da língua de ratos recém-nascidos, HOWLETT (1976) estudou a aderência e capacidade de invasão de *C. albicans*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. *C. albicans* foi a única espécie capaz de invadir todos os tecidos, inclusive o estrato córneo. *C. tropicalis* e *C. Krusei* penetraram no tecido conjuntivo e nas células nucleadas profundas do epitélio, mas não invadiram a camada de queratina, enquanto *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* demonstraram somente discreta invasão do tecido conjuntivo. As cinco espécies mostraram habilidade variada para invasão, a qual poderia indicar as diferenças de patogenicidade. RAY *et al.* (1984) observaram aderência de

Candida aos queratinócitos e às células mucosas, sugerindo que a aderência às células epiteliais fornece estímulo para a transformação micelial. Examinando *in vitro* a capacidade de aderência às células epiteliais bucais e vaginais de sete espécies de *Candida*, KING *et al.* (1980) demonstraram que *C. albicans* aderiu-se a um nível significativamente maior que as outras espécies. *C. tropicalis* e *C. stellatoidea* revelaram moderada capacidade, e *C. parapsilosis* aderiu-se muito pouco. *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kefyr* não foram capazes de interagir com as células epiteliais da mucosa. Os autores sugeriram também que a aderência pode estar relacionada diretamente com a patogenicidade.

Muitos fatores podem influenciar na adesão de *Candida*, tais como as condições de cultivo e o meio de cultura utilizado, composição da superfície celular, diferenças na virulência das amostras, além de condições intrínsecas ao próprio hospedeiro. ANTLEY & HAZEN (1988) demonstraram que células de *C. albicans* foram mais virulentas para camundongos quando crescidas em temperatura ambiente comparadas às crescidas em 37°C. Para KENNEDY & SANDIN (1988), o meio utilizado para o cultivo é importante e sugerem que a utilização de diferentes meios de cultura pode explicar as discrepâncias encontradas na literatura.

McCOURTIE & DOUGLAS (1984) demonstraram que amostras de *C. albicans* foram capazes de sintetizar uma camada de superfície fibrilar em resposta às altas concentrações de açúcar no meio e esta modificação resultou no aumento de adesão às células epiteliais bucais e na virulência para camundongos.

GHANNOUM *et al.* (1988) observaram que *C. albicans* possui menor aderência às células epiteliais bucais de pacientes com câncer do que indivíduos saudáveis, porque provavelmente os métodos terapêuticos provocaram mudanças na superfície das células afetando seus sítios receptores.

Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans* possui maior capacidade de aderência às células epiteliais e outras superfícies, o que pode estar diretamente relacionado com sua maior patogenicidade (KIMURA & PEARSAL 1978, DOUGLAS 1985). Após a colonização e adesão de *Candida* às superfícies epiteliais, as subseqüentes lesões da mucosa ocorrem devido à destruição do tecido por enzimas proteolíticas e/ou toxinas, e a uma resposta inflamatória aos antígenos da *Candida*. Assim, a atividade enzimática também é considerada importante na patogenicidade de espécies de *Candida*, que provavelmente facilita a sua invasão aos tecidos do hospedeiro. (BUDTZ-JÖRGENSEN 1990a).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da xerostomia na aderência de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* no dorso da língua de ratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 270 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus Wistar*), machos, com 2 meses de idade, pesando cerca de 200g, proveniente do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram divididos em 2 grupos: compostos de 135 ratos normais e 135 ratos xerostômicos. Para cada um desses grupos, 45 animais receberam inóculo de *C. albicans*, 45 de *C. tropicalis* e 45 de *C. krusei*, como mostrado na TABELA 1. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (5 ratos por caixa), alimentados com ração Labina (Purina) e água *ad libitum*. As caixas plásticas foram lavadas periodicamente com hipoclorito de sódio a 2,5% e as mamadeiras e os bicos autoclavados.

Tabela 1 - Número de ratos normais e xerostômicos, utilizados neste trabalho (N= normal, X=sialoadenectomizado).

Grupos	N/alb	X/alb	N/trop	X/trop	N/kru	X/kru
Nº de animais	45	45	45	45	45	45

4.2 AMOSTRAS

Amostras utilizadas (*C.albicans*, *C.tropicalis* e *C.krusei*) provenientes do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, que foram mantidas em frascos de vidro contendo água destilada.

4.3 DESSALIVAÇÃO

Os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de xylazina a 2% (Rompun, Bayer®, 0,5ml/kg) e anestesiados com cloridrato de ketamina a 10% (Ketamina, Agener®, 1ml/kg), ambos por via intramuscular. Após a tricotomia sobre a região massetérica esquerda, foi feita anti-sepsia com álcool iodado e incisão com lâmina de bisturi n.º 11, com cerca de 1,0cm de extensão na região mais central do músculo, expondo o tecido subjacente. Nesta região, visualizam-se dois filamentos esbranquiçados correspondentes a dois nervos um abaixo do outro (Nervo facial acima e seu ramo abaixo). Realizou-se um nó ao redor do nervo inferior (ramo do Nervo facial) com fio de sutura de seda 4.0, fazendo assim simultaneamente a ligadura do ducto da parótida, uma vez que este ducto localiza-se logo abaixo desse nervo e apresenta pequenas dimensões que dificultam sua visualização ao olho nu. Depois de realizada a ligadura, a pele do animal foi suturada com fio de algodão 3.0. Procedimento similar foi realizado no lado direito do animal.

Em seguida foi realizada a tricotomia e a anti-sepsia com álcool iodado na região cervical-mediana e feita uma incisão no sentido longitudinal, removendo-se os tecidos subjacentes, expondo as glândulas salivares submandibulares e sublinguais. As duas glândulas foram removidas simultaneamente por formarem uma massa única. A remoção foi realizada após prévia ligadura dos ductos e vasos com fio de nylon n.º 4.0, seguida de sutura no local da incisão (BOWEN *et al.* 1985). Os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais, recebendo ração e água *ad libitum* até completar a cicatrização das lojas cirúrgicas, por cerca de 7 dias.

Os animais xerostômicos utilizados neste trabalho, receberam o inóculo de *Candida* após 30 dias do ato cirúrgico. Embora este procedimento mantenha as glândulas salivares menores intactas, a maior parte da secreção salivar é eliminada. No momento do sacrifício dos animais, removeu-se também as glândulas parótidas de ambos os lados, a fim de comprovar histologicamente o efeito da ligadura do ducto, nas glândulas.

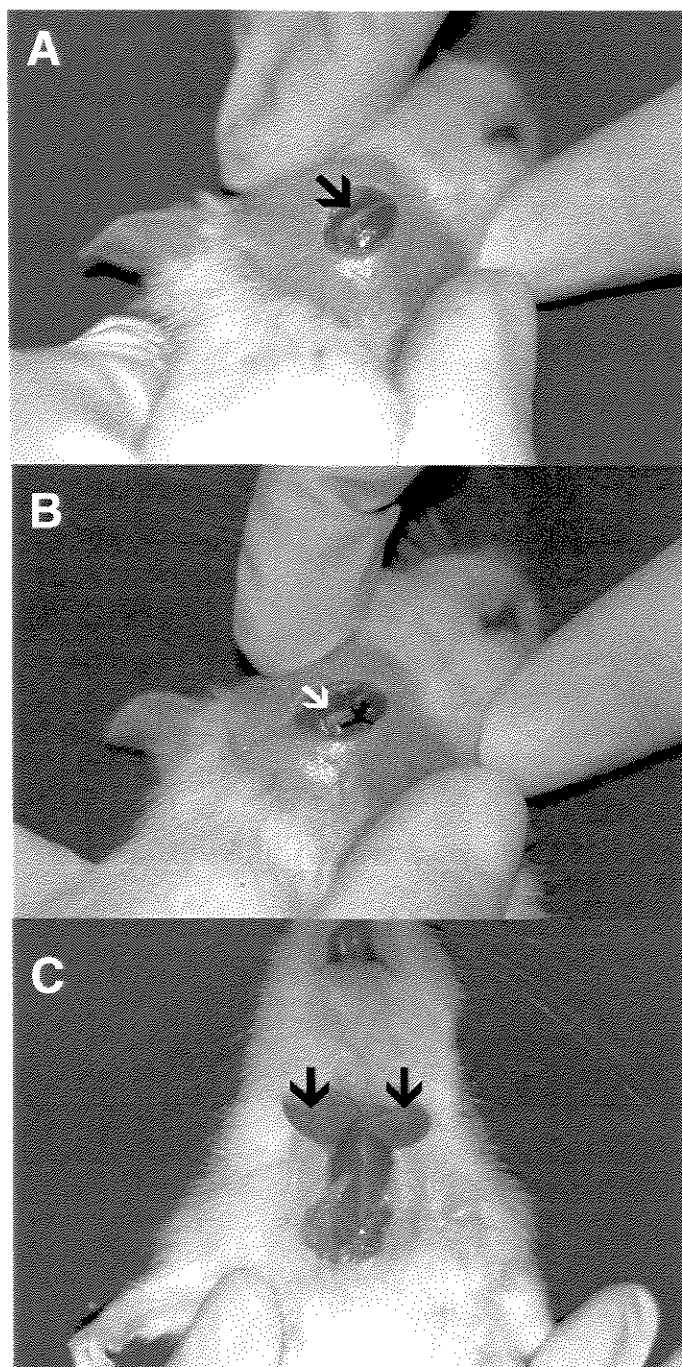


FIGURA 1 – Passos da técnica cirúrgica utilizada para dessalivação. A – ramo do nervo facial (seta) onde imediatamente abaixo encontra-se o ducto da parótida. B – ligadura simultânea do nervo e ducto da parótida. C – conjunto glândulas submandibular e sublingual direita e esquerda (setas).

4.4 PRESENÇA DE LEVEDURAS NA BOCA DE RATOS NORMAIS

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a pesquisa de leveduras do gênero *Candida* na boca, sendo que os portadores foram descartados. Foram feitas 2 coletas, com intervalo de 1 semana, utilizando-se de “swab” esterilizado passado por toda cavidade bucal dos ratos. Imediatamente após a coleta o material foi semeado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco) com cloranfenicol a 0,1mg/l de meio (Quemicetina Succinato, Carlo Herba) e foram incubadas a 37°C por 48h. Após a incubação foi feita a pesquisa de colônias características de *Candida*, portanto colônias esféricas, 8mm de diâmetro e de odor e aspecto característicos. A confirmação foi feita em esfregaços corados pelo método de Gram, observando-se células ovaladas, grandes, Gram-positivas, com ou sem brotamento.

4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO DE *CANDIDA* E INOCULAÇÕES DAS AMOSTRAS

Para a obtenção da suspensão de *Candida*, a amostra foi semeada em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 37°C por 48 horas. A seguir a cultura foi suspensa em 5ml de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,9%) e centrifugada a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O precipitado foi re-suspenso, centrifugado novamente e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi

suspenso em 5 ml de solução fisiológica e homogeneizado. A contagem do número de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se azul de metileno a 0,05%. A suspensão foi padronizada em 25×10^8 células viáveis/ml.

Ratos não anestesiados receberam na boca, inóculo de 0,2 ml de suspensão padronizada, contendo 5×10^8 células, com auxílio de seringa de 1 ml e agulha 30 x 8, com ponta-romba. Os animais receberam inoculações únicas, ficando privados de água por 1 hora, após a inoculação.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ADERIDAS

Os animais foram sacrificados 5, 15, 30 minutos e 1, 4, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. A língua foi retirada, lavada em solução fisiológica com a finalidade de remover as células de *Candida* não aderidas e fixada em solução de formol a 10%. Antes da inclusão em parafina, a língua foi cortada longitudinalmente na porção central e no sentido transversal em três partes: terço anterior, médio e posterior. Microscopicamente, o dorso da língua dos ratos é composto por papilas filiformes e fungiformes. As filiformes são classificadas em cônicas simples, gigantes e verdadeiras. As papilas cônicas simples ocupam os dois terços anteriores, enquanto as gigantes e verdadeiras ocupam o terço posterior. Foram obtidos três cortes de 5µm do terço posterior de cada língua, sendo em seguida corados pelas técnicas de H&E, PAS-hematoxilina e Gomori-Grocott. A contagem de leveduras aderidas foi realizada com auxílio de objetiva de 40X e ocular de 10X, exclusivamente nas papilas verdadeiras, uma vez que o

número de células de *Candida* inicialmente observado nas outras regiões foi muito pequeno. A contagem foi realizada em dois cortes da língua, 10 campos por corte, totalizando 20 campos das papilas verdadeiras por animal. As contagens foram realizadas sempre no sentido da região faríngea em direção à porção média da língua.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA E RECUPERAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *CANDIDA*

A recuperação de *Candida* da cavidade bucal dos ratos foi feita antes do sacrifício dos animais. A quantidade de leveduras foi calculada coletando-se saliva com auxílio de “bolinha” de algodão previamente esterilizada e pesada. A bolinha de algodão foi passada suavemente pela cavidade bucal dos ratos, com auxílio de uma pinça hemostática esterilizada, durante 5 minutos. A seguir novamente pesada, obtendo-se pelas diferenças de peso a quantidade de saliva coletada.

A “bolinha” de algodão foi colocada em tubo de ensaio contendo solução fisiológica a 0,9% esterilizada de forma a completar o volume de saliva coletada para 2 ml. Após homogenização por 2 minutos, foram obtidas diluições decimais de até 10^{-5} , sendo então semeadas alíquotas de 0,1 ml em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, em duplicata, e incubadas a 37°C por 48h. As colônias características de *Candida* foram contadas nas placas que apresentaram de 30 a 300 colônias. A quantificação de *Candida* foi feita a partir do volume de saliva coletado e do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada análise de variância individual, com modelo adequado para experimentos inteiramente casualizados, e arranjo fatorial de grupo e tempo incluindo a interação. O estudo é preliminar para aplicação da técnica de análise conjunta de experimentos, através da avaliação dos quadrados médios residuais. Quadrados médios residuais com valores até 4 vezes maiores uns que outros foram considerados homogêneos, com propósito de efetuar a análise conjunta de experimentos. Uma vez determinada a homogeneidade de variâncias, entre os experimentos planejados para cada espécie, foi feita a análise de variância conjunta dos experimentos, o que permitiu a reunião das análises efetuadas para as três espécies em uma única análise. Optou-se pelo teste de Bonferroni para comparação de médias dos fatores qualitativos (espécie e grupo) e regressão linear para estudo dos efeitos significativos do tempo.

Foi estabelecido o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Preliminarmente a todos os testes foram efetuados estudos de suposição que objetivaram determinar a completa adequação do modelo de análise adotado. Os estudos de suposições revelaram a necessidade da aplicação de transformações de dados à variável Saliva Coletada e da utilização de estatísticas não-paramétricas para as variáveis Contagem e Recuperação, as quais foram analisadas através de suas ordens (postos). Os dados foram analisados através do sistema SAS[®], versão 8.0*.

* SAS Institute Inc. SAS System, Software BASE e STAT. Cary, NC, 1998.

5. RESULTADOS

As papilas filiformes encontradas no dorso da língua de ratos apresentam duas superfícies, uma côncava e outra convexa. A superfície côncava é composta por uma queratina acidófila ("queratina dura") e a superfície convexa por uma queratina basófila ("queratina mole"). A colonização bacteriana no dorso da língua de ratos se dá normalmente na superfície convexa das papilas filiformes, geralmente não ocorrendo em outras regiões. Neste trabalho observou-se nos ratos normais, que a placa bacteriana estava bem organizada e localizada na superfície convexa das papilas verdadeiras. Embora não tenha sido feita a quantificação, nos animais xerostômicos a placa bacteriana estava mais acentuada e desorganizada, tendo sido observada principalmente na superfície convexa das papilas verdadeiras, entretanto também foi observada na superfície côncava e regiões interpapilares. As papilas verdadeiras dos animais xerostômicos apresentaram-se mais alongadas quando comparadas às mesmas dos ratos normais.

De forma semelhante à colonização bacteriana, nos animais normais e xerostômicos, as células de *Candida* aderiram-se preferencialmente sobre a placa bacteriana da superfície convexa das papilas verdadeiras, entretanto nos ratos xerostômicos a aderência também foi observada nas outras regiões.

A remoção das glândulas submandibulares e sublinguais, e a ligadura dos ductos das parótidas provocaram intensa xerostomia nos animais. As glândulas

parótidas removidas no momento do sacrifício, dos ratos previamente submetidos à ligadura dos ductos, apresentaram microscopicamente intensa atrofia acinar, ectasia ductal e fibrose, confirmando a eficácia da técnica utilizada para induzir xerostomia nos animais. A média da quantidade de saliva coletada de todos os animais normais foi de $0,05\text{ml} \pm 0,01$ enquanto a dos xerostômicos foi de $0,009\text{ml} \pm 0,001$, concluindo-se que nos ratos normais o volume de saliva coletado foi 5,55 vezes maior que nos xerostômicos. As médias e desvios padrão da quantidade de saliva coletada em todos os grupos do trabalho encontram-se na tabela 2.

TABELA 2 - Média e desvio padrão da quantidade de saliva coletada (ml) da boca de ratos normais e xerostômicos inoculados com 0,2ml de suspensão de *Candida*. O tempo corresponde aos períodos da inoculação até a coleta da saliva. Para cada período foram usados 5 animais.

Período	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Candida krusei</i>	
	normal	xerostômico	normal	xerostômico	normal	xerostômico
5 min	$0,03 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,005$	$0,008 \pm 0,003$
15 min	$0,06 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,004$
30 min	$0,1 \pm 0,09$	$0,01 \pm 0,008$	$0,07 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$
1 h	$0,1 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,003$	$0,06 \pm 0,03$	$0,006 \pm 0,005$
4 h	$0,09 \pm 0,02$	$0,009 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,008$	$0,04 \pm 0,01$	$0,006 \pm 0,003$
12 h	$0,08 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,003$	$0,06 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,002$	$0,01 \pm 0,008$	$0,01 \pm 0,008$
24 h	$0,15 \pm 0,1$	$0,008 \pm 0,001$	$0,09 \pm 0,08$	$0,01 \pm 0,002$	$0,08 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,007$
48 h	$0,03 \pm 0,02$	$0,009 \pm 0,002$	$0,06 \pm 0,03$	$0,009 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,007$	$0,01 \pm 0,004$
72 h	$0,06 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,004$	$0,05 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,006$	$0,09 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,009$
Total	$0,07 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,003$	$0,06 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$	$0,008 \pm 0,001$

A quantidade de *Candida* recuperada da saliva, diminuiu gradativamente em todos os grupos estudados. A diminuição foi grande no período de 15min em relação ao 5 min. A diminuição também foi acentuada no período de 1h em relação

ao de 30min. Nos períodos de 24, 48 e 72h os valores foram baixos, mas as leveduras ainda estavam presentes (TAB.3). Os gráficos 1 e 2 ilustram a diminuição gradativa da quantidade de *Candida* recuperada da saliva em função do tempo para as três espécies estudadas. Tanto para animais normais como para xerostômicos, a reta correspondente à *C.krusei* apresentou uma queda mais acentuada em função do tempo quando comparada às retas de *C.tropicalis* e *C.albicans*. Entretanto este fato, pode se dar à uma recuperação inicial maior de *C.krusei* em relação às demais espécies. Todas as retas foram significativas, quanto à diminuição da recuperação de *Candida* a partir da saliva em função do tempo.

TABELA 3 - Média e desvio padrão da quantidade de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* em UFC/ml x 10^4 de saliva, recuperados da boca de ratos normais e xerostômicos. O tempo corresponde aos períodos da inoculação até a coleta da saliva. Foram inoculados 0,2ml de suspensão contendo 25×10^8 células/ml. Para cada período foram usados 5 animais.

Período	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Candida krusei</i>	
	normal	xerostômico	normal	xerostômico	normal	xerostômico
5 min	12356 ± 9339	27251 ± 14468	6280 ± 7682	33030 ± 12739	17649 ± 12828	42291 ± 23264
15 min	701 ± 660	10740 ± 11288	4289 ± 3761	25243 ± 4905	4611 ± 4544	4393 ± 32654
30 min	534 ± 322	4324 ± 952	1405 ± 773	20499 ± 11603	3541 ± 2412	6811 ± 7162
1 h	34,3 ± 17,7	3121 ± 1380	2539 ± 2491	3902 ± 1757	363 ± 355	8219 ± 6146
4 h	28,4 ± 6,87	841 ± 1151	489 ± 300	2694 ± 2162	430 ± 253	1456 ± 637
12 h	9,92 ± 8,01	106 ± 94	35,2 ± 37,8	91,6 ± 72,0	42,5 ± 42,6	18,8 ± 16,36
24 h	0,32 ± 0,37	9,14 ± 1,49	6,36 ± 8,29	27 ± 10,9	2,42 ± 1,85	3,56 ± 3,31
48 h	1,66 ± 2,78	8,4 ± 9,83	0,88 ± 0,92	2,08 ± 2,33	1,72 ± 0,63	0,72 ± 0,44
72 h	1,04 ± 0,71	5,74 ± 4,52	0,01 ± 0,017	0,12 ± 0,12	0,42 ± 0,37	0,31 ± 0,33

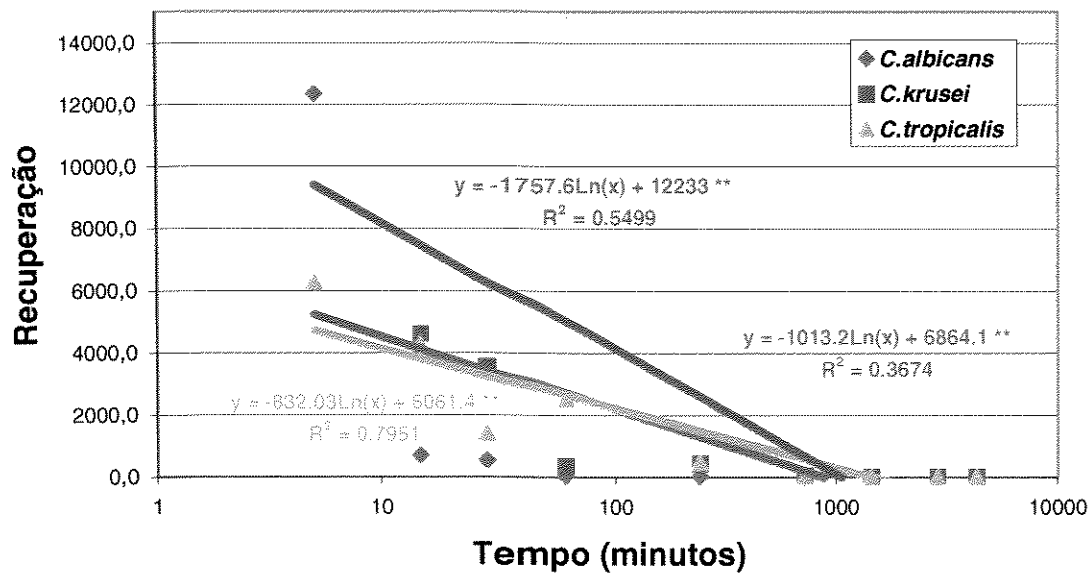


GRÁFICO 1 - Regressões lineares da recuperação em função do tempo para cada espécie em animais normais. ** indica que a regressão é significativa com nível de significância de 5%.

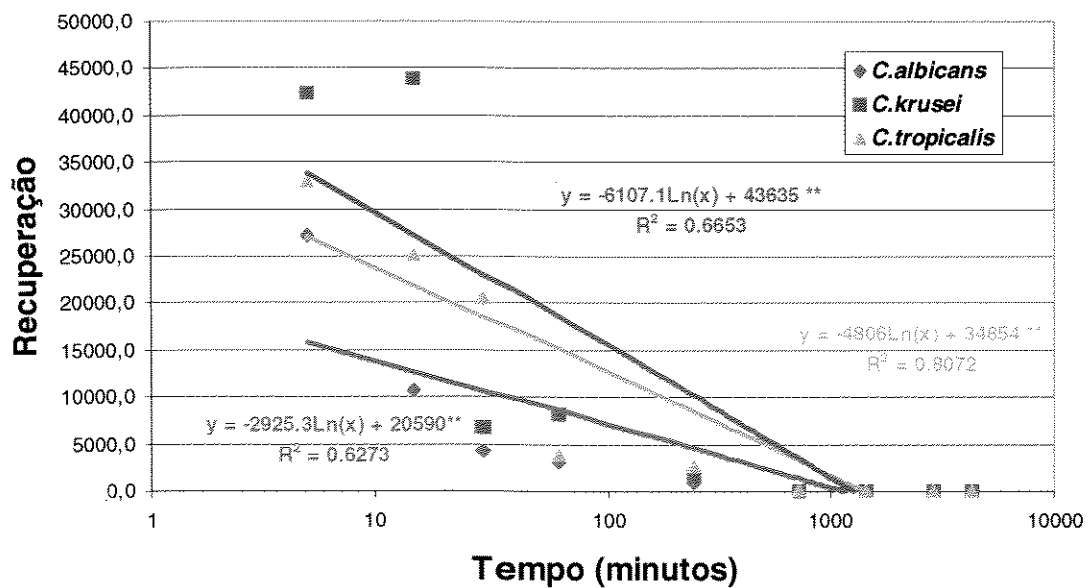


GRÁFICO 2 - Regressões lineares da recuperação em função do tempo para cada espécie em animais xerostômicos. ** indica que a regressão é significativa com nível de significância de 5%.

Comparando-se as três espécies estudadas, até o período de 24 horas houve tendência à recuperação de maior quantidade de *Candida*, tanto nos animais normais quanto nos xerostômicos, das espécies *C.tropicalis* e *C. krusei* em relação a *C. albicans*. Nos períodos de 48 e 72 horas os valores foram muito baixos para as três espécies (TAB.3). Entretanto, a partir do período de 48 horas a quantidade de *C. albicans* recuperada aumentou discretamente em relação as demais espécies, possivelmente indicando uma maior permanência desta, na boca dos ratos normais e xerostômicos (TAB.3). Os gráficos 3 e 4 comparam médias de recuperação entre espécies dentro de um mesmo tempo, mostrando resultados semelhantes para as três espécies estudadas. A recuperação de *C.albicans* aumenta nos gráficos 3 e 4 a partir do período de 48h, sendo significante apenas no período de 72h. Ainda com o objetivo de confirmar os resultados encontrados, o gráfico 5, compara as espécies dentro de um mesmo grupo, normal e xerostômico. Os valores correspondem às médias obtidas de todos os tempos analisados para cada espécie, mostrando uma menor recuperação de *C.albicans* em relação às outras espécies. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre as espécies no grupo xerostômico.

A xerostomia aumentou a quantidade de *Candida* recuperada da boca dos animais. O gráfico 6 mostra que as médias foram estatisticamente diferentes, sendo que a quantidade de *Candida* recuperada foi maior para os ratos xerostômicos em comparação aos normais para as três espécies analisadas (GRAF.6).

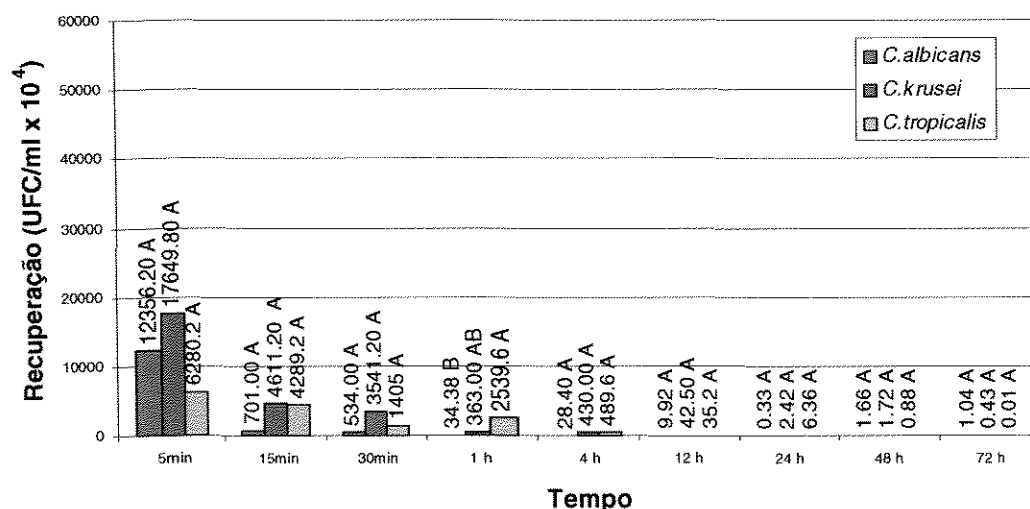


GRÁFICO 3 - Comparação das médias de recuperação entre espécies dentro de cada tempo para animais normais. Barras com letras diferentes indicam existência de diferença estatística significativa entre espécies dentro de um mesmo tempo pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

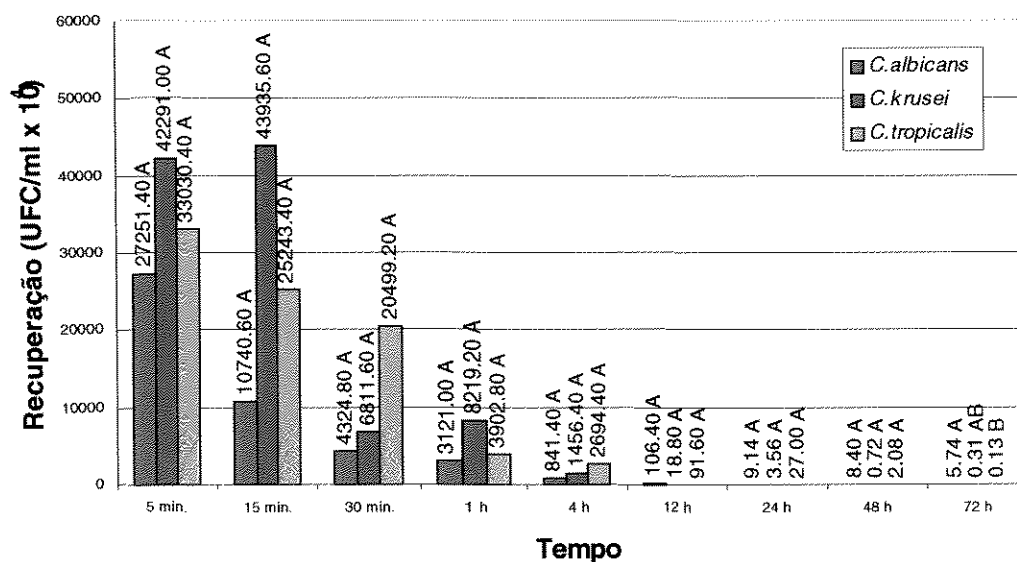


GRÁFICO 4 - Comparação das médias de recuperação entre espécies dentro de cada tempo para animais xerostômicos. Barras com letras diferentes indicam existência de diferença estatística significativa entre espécies dentro de um mesmo tempo pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

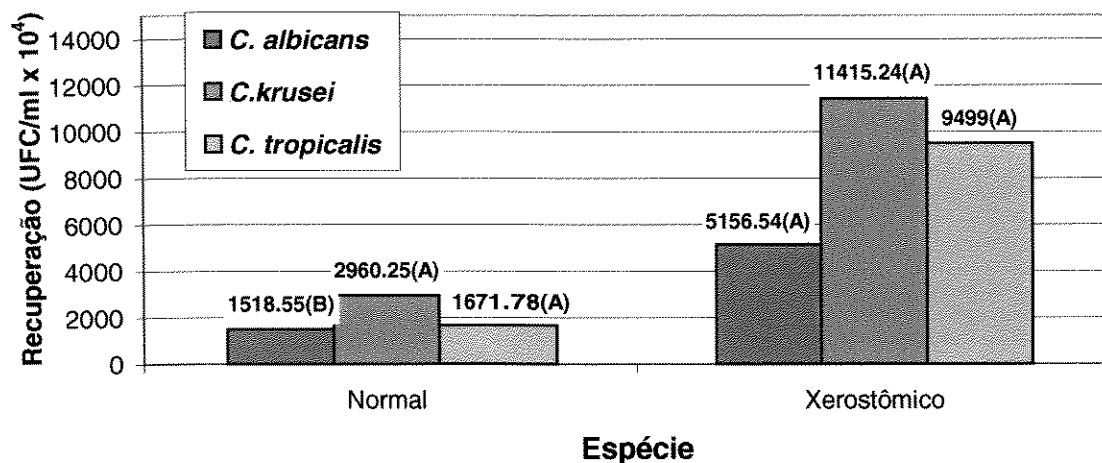


GRÁFICO 5 - Comparação de médias de Recuperação das espécies. Barras com a mesma letra não indicam existência de diferença estatística significativa entre espécies dentro de um mesmo grupo pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

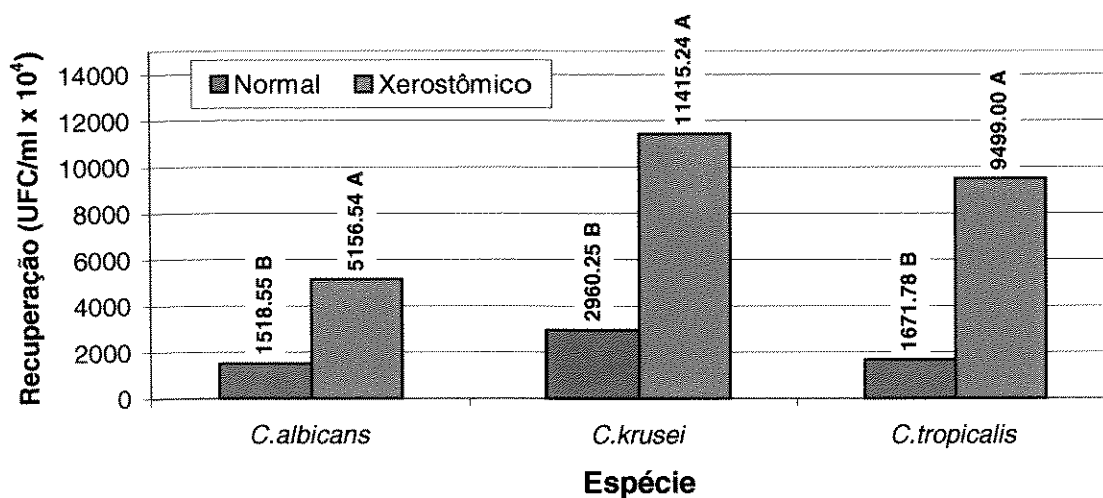


GRÁFICO 6 - Comparação das médias de recuperação dos grupos normais e xerostômicos. Barras com letras diferentes indicam existência de diferença estatística significativa entre grupos de uma mesma espécie pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

Com relação ao número de leveduras aderidas às papilas verdadeiras, a xerostomia aumentou a aderência das três espécies estudadas. A xerostomia favoreceu a aderência até o período de 24 horas mas as diferenças foram mais evidentes até 1 hora após a inoculação (TAB.4). O gráfico 7 mostra a comparação das médias de células aderidas entre o grupo normal e o xerostômico de cada espécie, com diferença significativa entre eles para todas as espécies.

Houve até o período de 4 horas tendência para aderência de maior quantidade de leveduras de *C.tropicalis* e *C. krusei* em relação à *C. albicans*. Nos períodos seguintes a aderência de leveduras foi pequena e semelhante para as três espécies estudadas (TAB. 4). Entretanto a partir do período de 12 horas os valores da contagem foram ligeiramente maiores para *C.albicans*, possivelmente indicando uma maior permanência dessa espécie na boca dos ratos, de forma semelhante aos resultados encontrados na recuperação de *Candida* a partir da saliva. Os gráficos 8 e 9 comparam os valores da contagem entre *C.albicans*, *C.tropicalis* e *C.krusei* em cada tempo para ratos normais e xerostômicos, respectivamente. Tanto para animais normais como para xerostômicos a aderência foi semelhante para as três espécies, com aumento para *C.albicans* no período de 24h. O gráfico 10, compara as espécies dentro de um mesmo grupo, mostrando uma maior aderência de *C.krusei* em relação às outras espécies, embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre elas. Comparando-se os gráficos 5 e 10, verificou-se que para cada espécie de *Candida* os valores da recuperação a partir da saliva foram semelhantes à contagem de células aderidas.

Observou-se uma diminuição gradativa no número de células aderidas às papilas até o período de 12 horas. Nos demais períodos os valores se mantiveram baixos e com poucas variações (TAB.4). Nos gráficos 11 e 12, as retas mostram que a diminuição da aderência foi significativa em função do tempo para as três espécies analisadas.

Em nenhum dos períodos estudados foram encontradas áreas de candidose.

TABELA 4 - Média e desvio padrão da contagem de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, correspondente a 20 campos da região das papilas verdadeiras na língua de ratos normais e xerostômicos. O tempo corresponde aos períodos da inoculação até a coleta da saliva. Foram inoculados 0,2ml de suspensão contendo 25×10^8 células/ml. Para cada período foram usados 5 animais.

Período	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Candida krusei</i>	
	normal	xerostômico	normal	xerostômico	normal	xerostômico
5 min	95.6 $\pm$ 88.4	117.7 $\pm$ 64.54	17.5 $\pm$ 6,58	216.3 $\pm$ 90.48	137.5 $\pm$ 49.3	291.5 $\pm$ 118.0
15 min	25.7 $\pm$ 16.28	96.2 $\pm$ 65.02	26,5 $\pm$ 22,0	100.8 $\pm$ 26.31	36.2 $\pm$ 24.25	116.2 $\pm$ 65.03
30 min	15.2 $\pm$ 6.63	25.4 $\pm$ 12.65	7,4 $\pm$ 4,44	55.4 $\pm$ 29.62	29.5 $\pm$ 15.79	35.2 $\pm$ 16.37
1 h	12.5 $\pm$ 12.22	19.9 $\pm$ 11.03	12,1 $\pm$ 4,68	27.9 $\pm$ 17.51	8.6 $\pm$ 7.11	32.2 $\pm$ 19.07
4 h	3.7 $\pm$ 3.7	4.3 $\pm$ 0.57	6,1 $\pm$ 2,77	8.5 $\pm$ 3.84	1.1 $\pm$ 0.74	11.9 $\pm$ 2.53
12 h	2.7 $\pm$ 2.1	3.1 $\pm$ 1.78	0,6 $\pm$ 0,41	0.9 $\pm$ 0.89	1.1 $\pm$ 0.65	2.6 $\pm$ 0.54
24 h	2.5 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.82	0.2 $\pm$ 0.44	0.4 $\pm$ 0.22	0.1 $\pm$ 0.22	2.3 $\pm$ 1.44
48 h	0.1 $\pm$ 0.22	2.1 $\pm$ 1.34	0.2 $\pm$ 0.27	1.2 $\pm$ 0.44	0.1 $\pm$ 0.22	1.2 $\pm$ 0.83
72 h	0.3 $\pm$ 0.27	0.6 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.27	0.4 $\pm$ 0.41	0.1 $\pm$ 0.22	2.3 $\pm$ 1.15

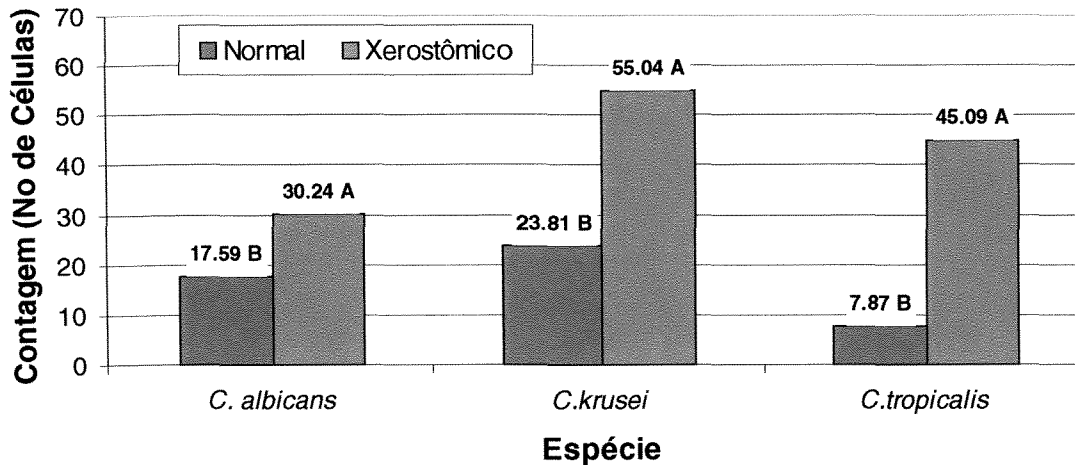


GRÁFICO 7 – Comparação das médias de contagem dos grupos normais e xerostômicos. Barras com letras diferentes indicam existência de diferença estatística significativa entre grupos para uma mesma espécie pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

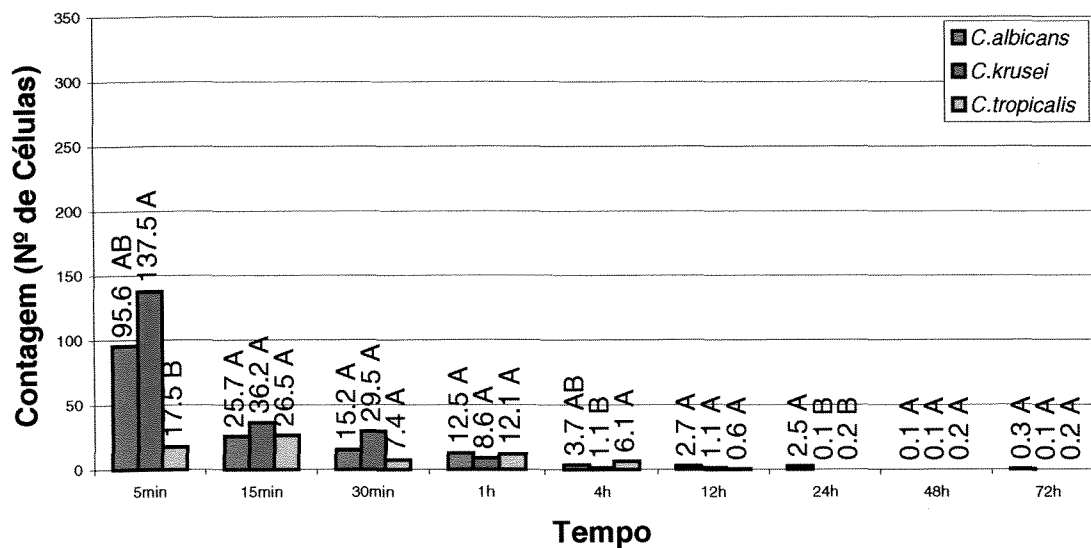


GRÁFICO 8 - Comparação das médias de contagem entre espécies dentro de cada tempo para animais normais. Barras com letras diferentes indicam existência de diferença estatística significativa entre espécies dentro de um mesmo tempo pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

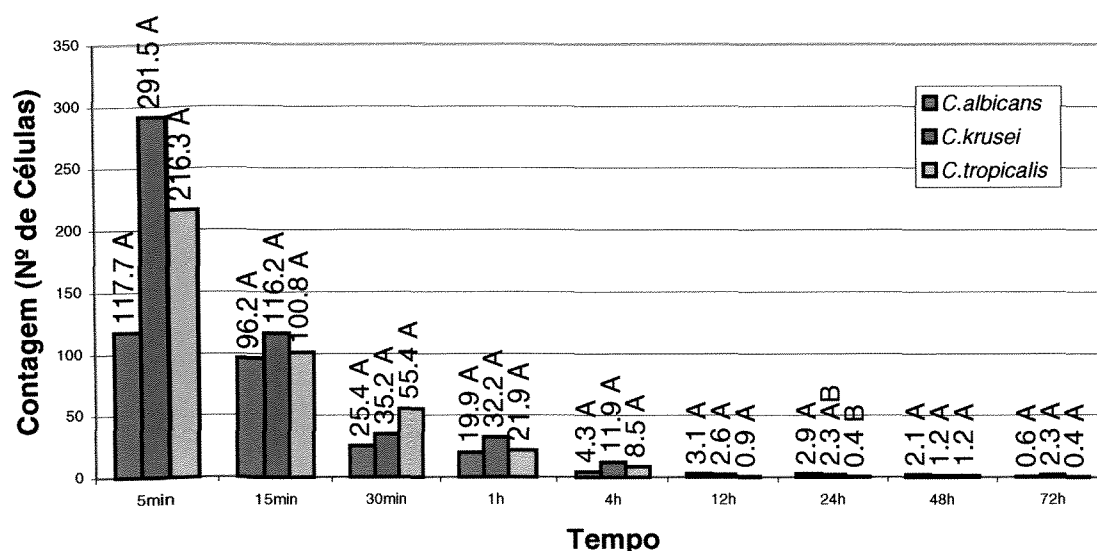


GRÁFICO 9 - Comparação das médias de contagem entre espécies dentro de cada tempo para animais xerostômicos. Barras com letras diferentes indicam existência de diferença estatística significativa entre espécies dentro de um mesmo tempo pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

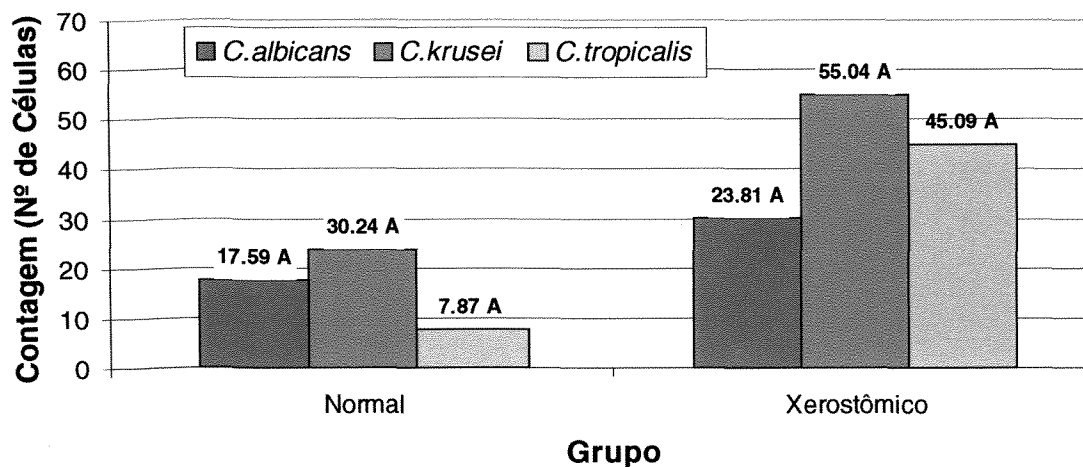


GRÁFICO 10 - Comparação das médias da contagem de células entre espécies. Barras com a mesma letra não indicam existência de diferença estatística significativa entre espécies dentro de um mesmo grupo pelo teste de Bonferroni com nível de significância alfa de 5%.

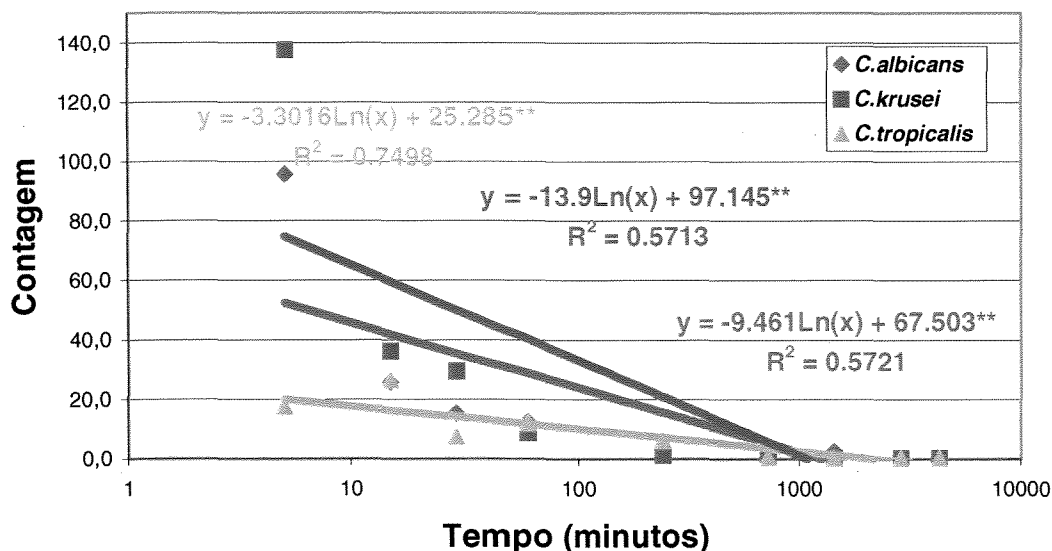


GRÁFICO 11 - Regressões lineares da contagem em função do tempo para cada espécie em animais normais. ** indica que a regressão é significativa com nível de significância de 5%.

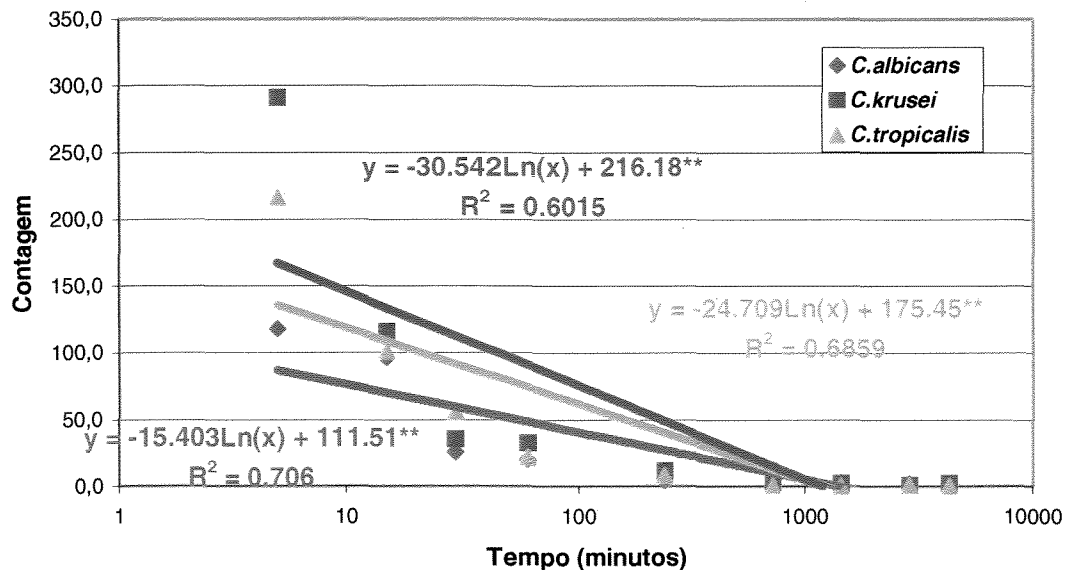


GRÁFICO 12 - Regressões lineares da contagem em função do tempo para cada espécie em animais xerostômicos. ** indica que a regressão é significativa com nível de significância de 5%.

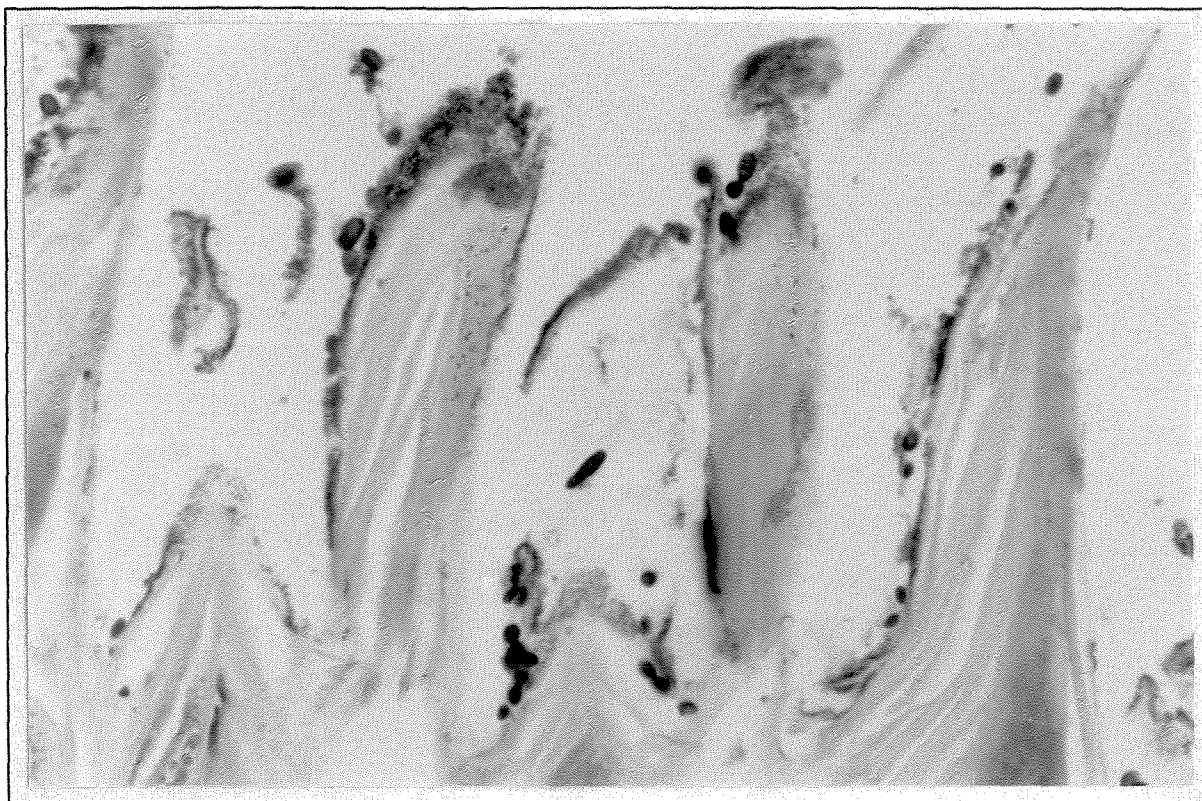


FIGURA 2 – Aderência de *Candida tropicalis* na superfície da língua de rato xerostômico, 5 minutos após a inoculação. A placa bacteriana apresenta-se em grande quantidade e as leveduras encontram-se aderidas nas regiões interpapilares, superfície côncava e principalmente sobre as bactérias localizadas na “queratina mole” da face convexa das papilas verdadeiras (400X – PAS-H).

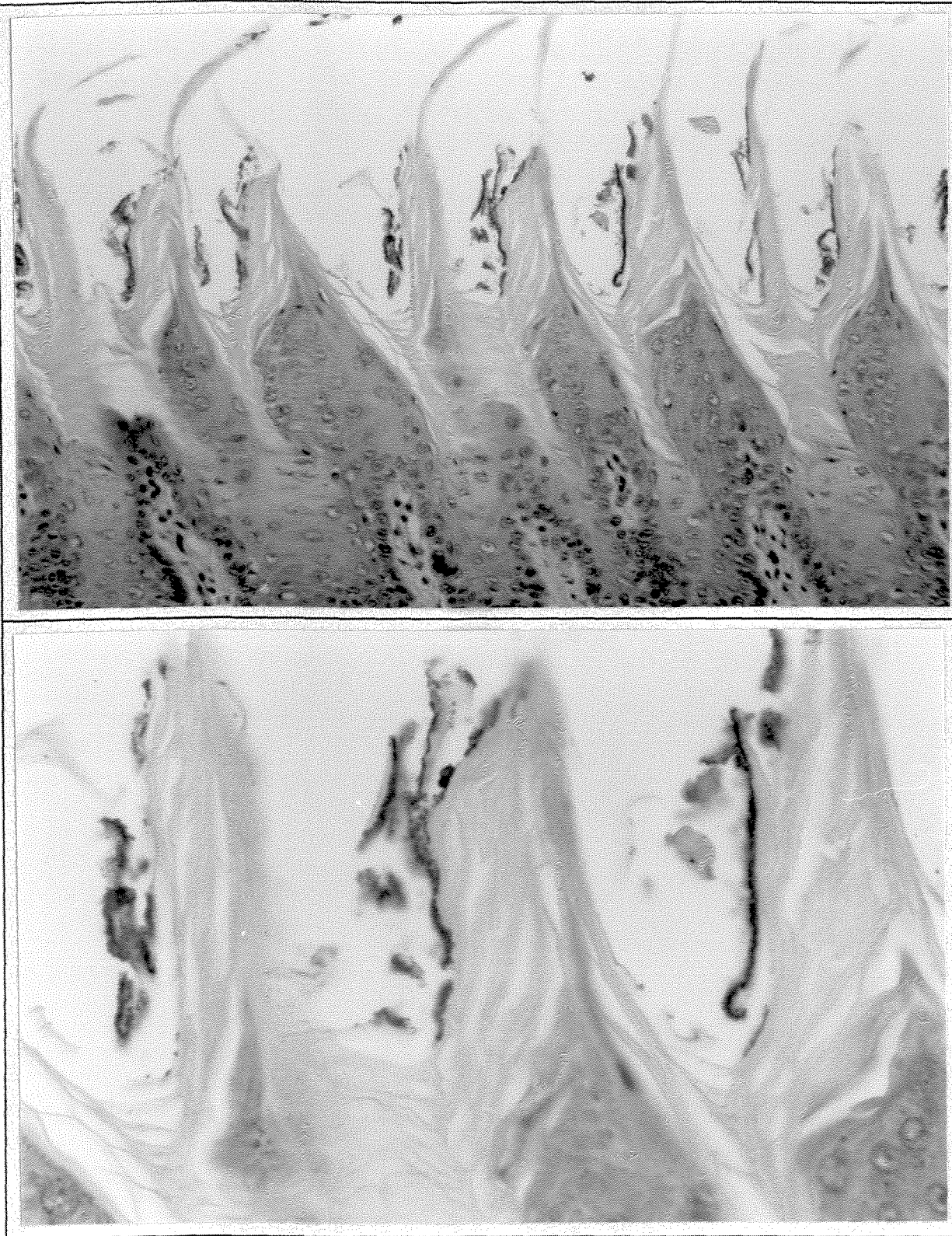


FIGURA 3 – Corte histológico da superfície da língua de rato xerostômico, 24 horas após a inoculação de *Candida albicans*. As leveduras foram encontradas em pequeno número. Não foram observadas áreas de candidose. (160X, PAS-H).

FIGURA 4 – Maior aumento da figura 3 (400X, PAS-H).

7. DISCUSSÃO

A remoção cirúrgica das glândulas submandibulares e sublinguais e a ligadura dos ductos das parótidas provocaram intensa xerostomia nos ratos. Houve redução em cerca de 5 vezes no volume de saliva coletado dos ratos xerostômicos em comparação aos normais. A técnica para induzir xerostomia utilizada neste estudo (BOWEN 1985) foi eficaz uma vez que a secreção salivar é produzida quase na totalidade (90%) pelas glândulas salivares maiores. O restante da saliva coletada provavelmente foi derivado das glândulas salivares menores (HERRERA *et al.* 1988).

As células das três espécies de *Candida* estavam aderidas principalmente na queratina “mole” da face convexa das papilas verdadeiras. A placa bacteriana estava mais acentuada nos ratos xerostômicos e as leveduras foram observadas principalmente sobre as bactérias, de forma semelhante ao descrito por SANTOS (1999). O valor da contagem de leveduras aderidas às papilas verdadeiras foi maior para os ratos xerostômicos quando comparado aos normais para as três espécies estudadas. Considera-se que nos animais com hipossalivação a diminuição da remoção mecânica de *Candida* pela saliva seja o mecanismo facilitador mais importante para a implantação do fungo (JORGE *et al.* 1993a, 1997).

Estes resultados sugerem que a aderência das células de *Candida* na superfície da língua de ratos é favorecida pela presença da placa bacteriana presente na queratina “mole” das papilas linguais, que atua como “ponte

bacteriana” entre as leveduras e o epitélio (BAGG & SILVERWOOD, 1986). A interação das leveduras com as bactérias provavelmente é mediada por polissacarídeos, mas ainda não foram descritas as principais adesinas envolvidas (HOLMES *et al.* 1995).

A xerostomia aumentou a quantidade de *Candida* recuperada por ml/saliva nas três espécies estudadas. Semelhante aos resultados encontrados por JORGE *et al.* (1993a) nos quais a xerostomia provocada pela remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores aumentou os valores de *C. albicans* na boca de ratos. Ratos com hipossalivação são mais susceptíveis às infecções orais e esofágicas causadas por *Candida albicans*. (MEITNER *et al.* 1990).

No presente estudo foram encontrados valores de recuperação semelhantes para as três espécies. Diferentemente dos resultados obtidos por TOTTI *et al.* (1996), onde foram encontrados valores de recuperação maiores, tanto para ratos normais como para xerostômicos, em ordem decrescente, para *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.guilliermondii* e *C.krusei*; sendo que *C.albicans* permaneceu mais tempo na boca dos ratos em todos os tempos analisados. Os animais foram inoculados na cavidade bucal, durante 4 dias consecutivos com 10^8 células da espécie estudada. Após 1,2,3,5,8,15 e 30 dias da última inoculação, as leveduras foram recuperadas da saliva. Apesar dos resultados terem sido semelhantes para as três espécies neste estudo, *C.albicans* a partir do período de 48 horas aumenta em relação às demais, possivelmente indicando uma maior permanência na boca dos ratos, sendo este dado

semelhante ao encontrado pelo autor acima citado. Entretanto necessita-se de um estudo adicional no qual se analise intervalos maiores de tempo.

Para as três espécies analisadas, tanto para ratos normais como xerostômicos, houve uma diminuição gradativa na recuperação e contagem de células aderidas às papilas verdadeiras com o passar do tempo a partir do momento da inoculação. Da mesma forma que SANTOS (1999), onde foi encontrada diminuição gradativa na recuperação de *Candida* da saliva a partir do período de 4 horas. O autor acima citado estudou a aderência de *C.albicans* na superfície da língua de ratos normais e xerostômicos tratados com tetraciclina. A recuperação foi realizada nos períodos de 4, 12, 24 e 48 horas, mostrando diminuição dos valores encontrados, entretanto houve um significativo aumento no período de 48 horas em relação ao de 24 horas. Pode-se considerar que a diminuição gradativa indica simplesmente a eliminação mecânica das células de *Candida* pela saliva.

Há grande quantidade de estudos sobre lesões orais induzidas por *C.albicans* em animais, entretanto há pouca informação sobre espécies menos patogênicas como *C.krusei* (SAMARANAYAKE *et al.* 1998). *C.albicans* é considerada a espécie mais patogênica e com maior capacidade de aderência às células epiteliais (KIMURA & PEARSAL 1978, DOUGLAS 1985), seguida de *C.tropicalis* (GELFAND 1989) e *C.krusei* é uma espécie pouco patogênica e com baixa capacidade de aderência (SAMARANAYAKE *et al.* 1998).

A baixa patogenicidade de *C.krusei* reflete uma habilidade reduzida em aderir-se às células epiteliais bucais. Vários trabalhos refletem esta condição,

entre eles o estudo realizado por KING *et al.*(1980) no qual *C.albicans* foi a espécie que aderiu-se mais às células epiteliais da mucosa bucal e vaginal quando comparadas às outras espécies. *C.tropicalis* revelou moderada capacidade de aderência e *C.krusei* não foi capaz de interagir com as células epiteliais. A aderência pode estar relacionada diretamente com a patogenicidade.

Estudos realizados por SAMARANAYAKE *et al.*(1994) demonstraram que a aderência de *C.krusei* às células epiteliais bucais de indivíduos saudáveis foi 10 vezes menor que para *C.albicans*. SAMARANAYAKE *et al.* (1998) avaliando a patogenicidade, colonização e infectividade de *C.krusei* e *C.albicans* na mucosa oral de ratos normais e imunocomprometidos, demonstraram que *C.albicans* foi capaz de colonizar línguas dos dois grupos de animais. *C.krusei* não foi capaz de infectar animais normais, entretanto provocou lesões extensas em ratos imunocomprometidos.

Neste trabalho, a aderência de leveduras foi semelhante para as três espécies estudadas, diferentemente dos dados encontrados na literatura. Entretanto vários fatores têm sido implicados na patogenicidade do gênero *Candida*, como fatores intrínsecos das espécies e amostras, produção de toxinas, enzimas e composição da superfície celular (ODDS 1987). Outros fatores ainda são descritos por influenciarem na adesão de *Candida* tais como as condições de cultivo das leveduras, o meio de cultivo utilizado, diferenças na virulência das amostras, além de condições intrínsecas ao próprio hospedeiro. No estudo realizado por ANTLEY & HANZEN (1988), células de *C.albicans* foram mais virulentas para camundongos quando crescidas em temperatura ambiente quando

comparadas às crescidas à 37°C. Para KENNEDY & SANDIN (1988), o meio utilizado para o cultivo é importante e sugerem que a utilização de diferentes meios de cultura pode explicar as discrepâncias encontradas na literatura. McCOURTIE & DOUGLAS (1984) demonstraram que amostras de *C.albicans* expostas à altas concentrações de açúcar sintetizaram uma superfície fibrilar que contribuiu para um aumento na adesão às células epiteliais bucais e na virulência para camundongos. A atividade enzimática também é considerada importante na patogenicidade de espécies de *Candida*, que provavelmente facilita sua invasão nos tecidos do hospedeiro (BUDTZ-JÖRGENSEN 1990a). Outra possibilidade a ser considerada, a respeito de espécies como *C.krusei* aderirem-se mais às superfícies mucosas, é que por se tratarem de espécies menos patogênicas talvez evoquem uma resposta menos intensa, sendo então menos eliminadas. Comparando-se os valores da recuperação de *Candida* da saliva e o número de células aderidas de cada espécie, concluiu-se que a técnica utilizada para quantificação de *Candida* a partir da saliva foi eficaz, uma vez que os resultados foram semelhantes.

JORGE *et al.*(1993b) após realização de três inoculações semanais de *C.albicans* durante 32 semanas, encontraram candidose microscopicamente em 20% dos animais normais e 70% dos xerostômicos. SANTOS (1999) após realização de única inoculação de *C.albicans* contendo 5×10^8 células na cavidade bucal de ratos, encontrou áreas de candidose a partir do período de 4 horas da inoculação em ratos xerostômicos. ALLEN *et al.* (1989) realizaram a inoculação de 0,1ml de suspensão de *Candida albicans* contendo 3×10^8

células/ml na boca de ratos e encontraram a partir de 4 dias a penetração de hifas no interior da camada de queratina e microabscessos intra-epiteliais caracterizando candidose.

Por outro lado, nos resultados obtidos por SAMARANAYAKE *et al.* (1998), avaliando a colonização de *C.albicans* e *C.krusei*, nenhuma das espécies foi capaz de induzir candidose em animais normais.

No presente estudo não foram encontradas áreas de candidose em nenhum período tanto para animais normais como para xerostômicos. Algumas hipóteses devem ser consideradas para estes achados, entre elas a possibilidade de células não-viáveis aderirem-se à superfície mucosa. GORMAN *et al.* (1996) afirmaram que células não-viáveis podem se aderir e ter maior capacidade de aderência *in vitro* às células epiteliais bucais que as viáveis, ocupando receptores das viáveis com potencial de formar hifas. A maior parte das leveduras aderidas até trinta minutos da inoculação são rapidamente removidas e as áreas de candidose desenvolvem-se a partir de pequeno número de leveduras que permaneceram aderidas. Segundo SANDIN (1987) a aderência de *C.albicans* ocorre em duas etapas, durante os primeiros 20 minutos há associação inespecífica, seguida por interação específica envolvendo adesinas. Com base nos resultados encontrados no presente estudo, uma hipótese a ser discutida é a presença de células não-viáveis impossibilitando a formação de hifas, embora o valor estabelecido para a concentração da suspensão tenha sido obtido mediante a contagem apenas de células viáveis. Outro fator a ser considerado são as deficiências nos mecanismos específicos de aderência, como as interações ligante-receptor. Outras

possibilidades podem se dar ainda à uma alta imunidade natural dos animais analisados, à uma virulência atenuada ou uma atividade enzimática reduzida da amostra em questão.

Em resumo, este trabalho confirmou que a xerostomia favoreceu a colonização de *Candida* na língua de ratos. As três espécies estudadas, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, apresentaram resultados semelhantes, diferentemente de outros estudos, que mostram maior aderência e recuperação de *Candida albicans*. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão deste resultado e avaliação da língua de rato como modelo de estudo para aderência *in vivo* de *Candida*.

8. Conclusões

- A. A aderência de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* ocorreu principalmente sobre a placa bacteriana encontrada na queratina mole das papilas verdadeiras.
- B. A xerostomia aumentou o número de leveduras recuperadas a partir da saliva e facilitou a aderência às papilas verdadeiras para as três espécies estudadas.
- C. A recuperação e contagem de células aderidas de *C.krusei*, *C.tropicalis* e *C.albicans* diminuiu gradativamente com o tempo.
- D. A recuperação e aderência foi semelhante para as três espécies estudadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AHEARN G.D. Medically important yeasts. **Annu. Rev. Microbiol.** 1978; 32: 59-68.
- 2 ALLEN C.M. Diagnosing and managing oral candidiasis. **J. Am. Dent. Assoc.** 1992; 123: 77-8, 81-2.
- 3 ALLEN C.M., PAULSON R., DUNCAN R. Clinical, histologic and scanning electron microscopic study of the development of chronic candidiasis of the rat tongue. **J. Oral Pathol. Med.** 1989; 18: 352-359.
- 4 ANTLEY P.P., HAZEN K.C. Role of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. **Infect. Immun.** 1988; 56: 2884-90.
- 5 ARENDORF T.M., WALKER D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch. Oral Biol.** 1980; 25: 1-10.
- 6 BAGG, SILVERWOOD Coaggregation reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. **J. Med. Microbiol.** 1986; 22: 165-9.
- 7 BASSIONY A., ALI EL-REFAI H., ABDEL NABI E.A., *et al.* *Candida* infection in the tongue and pharynx. **J. Laryngol. Otol.** 1984; 98:609-11.
- 8 BOWEN W.H., PEARSON S.K., YOUNG D.A., *et al.* The effect of Partial Desalivation on Coronal and Root Surface Caries in the Rat. In: **Factors Relating to Demineralization of the Teeth.** S.A. Leach, Ed., Oxford: IRL Press Ltd., 1985: 243-250.
- 9 BUDTZ-JÖRGENSEN E. Ethiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeasts infections. **Acta Odontol. Scand.** 1990a; 48: 61-9.

- 10 BUDTZ-JÖRGENSEN E. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infection. **Acta Odontol. Scand.** 1990b; 48: 37.
- 11 BURFORD-MASON A.P., WEBER J.C.P., WILLOUGHBY J.M.T. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in healthy subjects. **J. Med. Vet. Mycol.** 1988; 26: 49-56.
- 12 CANNON R.D., HOLMES A.R., MASON A.B., *et al.* Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? **J. Dent Res** 1995; 74 (5): 1152-1161.
- 13 COTTER G., KAVANAGH K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **Br. J. Biomed. Sci.** 2000;57(3): 241-9.
- 14 DAHLE U.R., OLSEN I. Anaerobiosi and serum promote mycelium formation by *Candida albicans* in clones on TSBV agar. **Acta Odontol Scand** 1991; 49: 41-5.
- 15 DOUGLAS L.J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Crit. Rev. Microbiol.** 1987; 15: 27-43.
- 16 DOUGLAS L.J. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. **Microbiol. Sci.** 1985; 2:243-7.
- 17 EDGARD W.M. Saliva and dental health. **Br. Dent. J.** 1990; 11: 96-8.
- 18 el-AZIZI M., KHARDORI N. Factors influencing adherence of *Candida* spp. To host tissues and plastic surfaces. **Indian J. Exp. Biol.** 1999; 37 (10): 941-51.

- 19 ELLEPOLA A.N.B., SAMARANAYAKE L.P. Adhesion of oral *C.albicans* to human buccal epithelial cells following limited exposure to antifungal agents. **J. Oral Pathol. Med.** 1998; 27: 325-32.
- 20 EPSTEIN J.B., KIMURA L.H., MENARD T.W. *et al.* Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. **Arch. Oral. Biol.** 1982; 27: 469-74.
- 21 EPSTEIN J.B., SCULLY C. The role of saliva in oral health and the causes and effects of xerostomia. **J. Can. Dent. Assoc.** 1992; 58: 217-21.
- 22 FOTOS P.G., HELLSTEIN J.W., VINCENT S.D. Oral candidosis revisited. **Gen. Dent.** 1991; 39: 422-30.
- 23 FRANKER C.K.; LUCATORTO F.M., JOHNSON B.S., *et al.* Characterization of the mycoflora from oral mucosal surfaces of some HIV-infected patients. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 1990; 69: 683-7.
- 24 FREITAS H.R., BIRMAN E.G. Candidose bucal: Aspectos clínicos e terapêuticos. **Ver. Assoc. Paul. Cirurg. Dent.** 1989; 43: 227-30.
- 25 GELFAND M.S. *Candida tropicalis*. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** 1989; 10: 280-3.
- 26 GHANNOUN M.A. Mechanisms potentiating *Candida* infections. A review. **Mycoses** 1988; 31: 543-7.
- 27 GHANNOUN M.A., ELTEEN K.B., STRETTON R.J., *et al.* Effects of octenidine and pirtenidine on adhesion of *Candida* species to human buccal epithelial cells *in vitro*. **Arch. Oral Biol.** 1990; 35: 249-53.

- 28 GHANNOUN M.A., ABU-ELTEEN K.H., MOTOWY M.S. Effect of antineoplastic agents and x-ray irradiation on the adherence and of *Candida* sp. to human buccal epithelial cells in vitro. **Mycopathologia** 1988; 104: 171-80.
- 29 GIBBONS R.J., van ROUTE J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annu. Rev. Microbiol** 1975; 29: 19-44.
- 30 GORMAN S.P., JONES D.S., McGOVERN J.G. *et al.* Frequency distribution of *Candida albicans* blastopores adhered to mucosal epithelial cells *in vitro*. **J. Pharm. Pharmacol.** 1996; 48: 1315-9.
- 31 HARVEY R.L., MYERS J.P. Nosocomial fungemia in a large community teaching hospital. **Arch. Intern. Med.** 1987; 147: 2117-20.
- 32 HAZEN B.W., HAZEN K.C. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and germ tube formation of *Candida albicans*. **Infect. Immun.** 1988; 56: 2521-25.
- 33 HEIMDAHL A., NORD C.E. Oral yeast infections in immunocompromised and seriously diseased patients. **Acta Odontol Scand** 1990; 48: 77-84.
- 34 HERNANDEZ Y.L., DANIELS T.E. Oral candidiasis in Sjögren's syndrome: prevalence, clinical correlations, and treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 1989; 68: 324-9.
- 35 HERRERA J.L., LYONS M.F., JOHNSON L.F. Saliva: its role in health and disease. **J. Clin. Gastroenterol.** 1988; 10: 569-78.

- 36 HOLMES A.R., CANNON R.D., JENKINSON H.F. Interaction of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J. Ind. Microbiol.** 1995; 15: 208-13.
- 37 HOWLETT J.A. The infection of rat tongue mucosa in vitro with five species of *Candida*. **J. Med. Microbiol.** 1976; 9: 309-16.
- 38 IACOPINO A.M., WATHEN W.F. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. **J. Am. Dent. Assoc.** 1992; 123: 46-51.
- 39 JORGE A.O.C. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo** 1997; 11: 279-85.
- 40 JORGE A.O.C., TOTTI M.A.G., de ALMEIDA O.P., *et al.* Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. **J Oral Pathol Med** 1993a; 22: 138-40.
- 41 JORGE A.O.C., TOTTI M.A.G., de ALMEIDA O.P., *et al.* Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. **J Oral Pathol Med** 1993b; 22: 54-6.
- 42 KENNEDY M.J. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. **Current Topics Med. Mycol.** 1988; 2: 73-169.
- 43 KENNEDY M.J., ROGERS A.L., HANSELMEN L.R., *et al.* Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. **Mycopathologia** 1988; 102: 149-56.

- 44 KENNEDY M.J., SANDIN R.L. Influence of growth conditions on *Candida* adhesion, hydrophobicity and cell wall structure. **J. Med. Vet. Mycol.** 1988; 26: 79-92.
- 45 KIMURA L.H., PEARSAL N.N. Adherence of *Candida* to human buccal epithelial cells. **Infect. Immun.** 1978; 21: 64-8.
- 46 KING R.D., LEE J.C., MORRIS A.L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosa epithelial cells. **Infect. Immun.** 1980; 27: 667-74.
- 47 KLOTZ S.A., DRUTZ D.J., ZAJIC J.E. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. **Infect Immun.** 1985; 50: 97-101.
- 48 KOMSHIAN S.V., UWAYDAH A.K., SOBEL J.D., *et al.* Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. **Rev. Infect. Dis.** 1989; 11: 379-90.
- 49 KREGER-van RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study.**, 3.ed., Amsterdam: Elsevier Science Publisers, 1984: 585-844.
- 50 LAMEY P.J. *et al.* Chronic hyperplastic candidosis and secretor status. **J. Oral Pathol. Med.** 1991; 20: 64-7.
- 51 LOCKHART S.R., JOLY S., VARGAS K., *et al.* Natural Defenses against *Candida* Colonization Breakdown in the Oral Cavities of the Elderly. **J. Dent Res** 1999; 78 (4): 857-868.

- 52 MARINA N.M., FLYNN P.M., RIVERA G.K., *et al.* *Candida tropicalis* and *Candida albicans* fungemia in children with leukemia. **Cancer** 1991; 68: 594-9.
- 53 MARSH P.D., PERCIVAL R.S., CHALLACOMBE S.J. The influence of denturing wearing and age on the oral microflora. **J. Dent. Res.** 1992; 71: 1374-81.
- 54 McCOURTIE J., DOUGLAS L.J. Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. **Infect. Immun.** 1984; 45: 6-12.
- 55 McLLROY M.A. Failure of fluconazole to suppress fungemia in a patient with fever, neutropenia and typhlitis. **J. Infect. Dis.** 1991; 163: 420-1.
- 56 MEITNER S.W., BOWEN W.H., HAIDARIS C.G. Oral and esophageal *Candida albicans* infection in hiposalivatory rats. **Infect. Immun.** 1990; 58: 2228-36.
- 57 MEYER S.A., AHEARN D.G., YARROW D. Genus 4. *Candida* berkholt. In: KREGER-van RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**, 3.ed., Amsterdam: Elsevier Science Publisers, 1984: 585-844.
- 58 MILLÁN R.S., ELGUEZABAL N., REGÚLEZ P. *et al.* Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. **Microbiology**. 2000; 146: 2105-2112.
- 59 ODDS F.C. *Candida* infections: na overview. **Critical Rev. Microbiol.** 1987; 15: 1-5.

- 60 ODDS F.C. *et al.* Carriage of *Candida* species and *Candida* biotypes in patients undergoing chemotherapy or bone marrow transplantation for haematological disease. **J. Clin. Pathol.** 1989; 42: 1259-66.
- 61 OKSALA E. Factors predisposing to oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.** 1990; 48: 71-74.
- 62 OLSEN I. Oral adhesion of yeast. **Acta Odontol. Scand.** 1990; 48: 45-53.
- 63 PAULA C.R., SAMPAIO M.C.C., BIRMAN E.G., *et al.* Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. **Mycopathologia** 1990; 112: 119-24.
- 64 PETTINATI A.H. Anatomia patológica das candidíases. In: LACAZ C.S. **Candidíases** São Paulo, Ed. Pedagógica Universitária e Ed. Universidade de São Paulo, 1980: 101-112.
- 65 PIZZO G., GIULIANA G., MILICI M.E., *et al.* Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. **New Microbiol** 2000; 23(1):63-71.
- 66 POLLOCK J.J., DENEPIITIYA L., MACKAY B.J., *et al.* Fungistatic and fungicidal activity of the human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *C. Albicans*. **Infect. Immun.** 1984;44: 702-7.
- 67 RAY T.L., DIGRE K.B., PAYNE C.D. Adherence of *Candida* species to human epidermal cornocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity. **J. Invest. Dermatol.** 1984; 83: 37-41.

- 68 SAMARANAYAKE L.P., MacFARLANE T.W. Factors affecting the *in vitro* adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to the epithelial cells of human origin. **Arch. Oral Biol.** 1982; 27: 869-73.
- 69 SAMARANAYAKE L.P. Nutricional factors and oral candidosis. **J. Oral Pathol.** 1986; 15: 61-5.
- 70 SAMARANAYAKE Y.H., WU P.C., SAMARANAYAKE L.P. *et al.* Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. **J. Med. Microbiol.** 1994; 41: 250-258.
- 71 SAMARANAYAKE Y.H., WU P.C., SAMARANAYAKE L.P. *et al.* The relative pathogenicity of *Candida Krusei* and *C.albicans* in the rat oral mucosa. **J. Med. Microbiol.** 1998; 47: 1047-1057.
- 72 SANDIN R.L., MEIER C.S., CROWDER M.L., *et al.* Concurrent isolation of *Candida krusei* and *Candida tropicalis* from multiple blood cultures in a patient with acute leukemia. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 1993; 117: 521-3.
- 73 SANDIN R.L. Variation in affinity to *Candida albicans in vitro* among human buccal epithelial cells. **J. Med. Microbiol.** 1987; 24: 151-5.
- 74 SANDVEN P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol. Scand.** 1990; 48: 151-5.
- 75 SANTOS E.B. Efeitos da xerostomia e do tratamento com 4NQO no desenvolvimento de candidose na língua de rato. Piracicaba – SP,1999 (tese de doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.
- 76 SENET J.M. *Candida* adherence phenomena, from commensalism to pathogenicity. **Int. Microbiol.** 1998;1(2): 117-22.

- 77 STENDERUP A. Oral micology. **Acta Odontol. Scand.** 1990; 48: 3-10.
- 78 TYLEND A. C.A., LARSEN J., YEH C-K., *et al.* High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection. **J. Oral. Pathol. Med.** 1989; 18: 520-524.
- 79 TOBGY R.S., SAMARANAYAKE L.P., MACFARLANE T.W. “In vitro” susceptibility of *Candida* species to lysozyme. **Oral Microbiol. Immunol** 1988; 3: 35-9.
- 80 TOTTI M.A.G., JORGE A.O.C., SANTOS E. B., *et al.* Implantation of *Candida albicans* and other species in the oral cavity of rats. **J. Oral. Pathol. Med.** 1996; 25: 308-310.
- 81 VANDENBUSSCHE M., SWINNE D. Yeasts oral carriage in denture wearers. **Mykosen** 1984; 27: 431-5.
- 82 WELLMER A., BERNHARDT H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. **Mycoses** 1997; 40: 363-68.
- 83 WILKIESON C., SAMARANAYAKE L.P., MACFARLANE T.W., *et al.* Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. **J. Oral. Pathol. Med.** 1991; 20: 13-6.
- 84 WILLIAMSON J.J. A study of extent of variation in daily counts of *Candida albicans* in saliva. **Aust. Dent. J.** 1972; 17: 106-9.

ANEXO 1. Dados originais obtidos a partir da inoculação de *Candida albicans* em ratos normais. O tempo corresponde aos períodos de inoculação até a coleta da saliva. Para cada período foram utilizados 5 animais.

	Tempo (min.)	Peso (g)	Saliva Coletada	Recuperação total/2ml ($\times 10^4$)	Recuperação UFC/ml ($\times 10^4$)	Contagem de células (PV)
1	5	230,70	0,026	417	16038	245
2	5	220,02	0,0691	74	1070	33,5
3	5	223,12	0,0115	66	5739	79,5
4	5	237,46	0,0303	760	25082	26
5	5	238,22	0,0462	640	13852	94
Média $\pm$ desvio padrão		229,9 $\pm$ 8,22	0,03 $\pm$ 0,02	391 $\pm$ 318	12356 $\pm$ 9339	95,6 $\pm$ 88,4
1	15	214,58	0,1010	62	613	19
2	15	324,38	0,0735	13	179	16,5
3	15	323,09	0,0336	59	1755	11,5
4	15	328,05	0,0739	62	838	52,5
5	15	331,55	0,0649	7,8	120	29
Média $\pm$ desvio padrão		304,3 $\pm$ 50,2	0,06 $\pm$ 0,02	40,7 $\pm$ 27,8	701 $\pm$ 660	25,7 $\pm$ 16,2
1	30	191,86	0,0756	23	309	13
2	30	202,16	0,0406	18	443	17
3	30	258,53	0,0397	43	1100	5
4	30	220,62	0,2723	97	356	22,5
5	30	227,06	0,0729	33	462	18,5
Média $\pm$ desvio padrão		220 $\pm$ 25,7	0,1 $\pm$ 0,09	42,8 $\pm$ 31,7	534 $\pm$ 322	15,2 $\pm$ 6,6
1	1	313,53	0,0649	3,3	51	14,5
2	1	303,31	0,1676	4,3	26	9,5
3	1	336,85	0,0918	3	33	32,5
4	1	340,88	0,2366	2,3	9,9	4,5
5	1	241,60	0,1215	6,4	52	1,5
Média $\pm$ desvio padrão		307,2 $\pm$ 39,9	0,13 $\pm$ 0,06	3,8 $\pm$ 1,5	34,3 $\pm$ 17,7	12,5 $\pm$ 12,2
1	4	188,46	0,1213	3,2	26	0
2	4	202,44	0,0875	3,1	35	9
3	4	182,02	0,0594	1,5	25	1,5
4	4	198,94	0,1112	4,1	36	2
5	4	319,24	0,085	1,7	20	6
Média $\pm$ desvio padrão		218,2 $\pm$ 57	0,09 $\pm$ 0,02	2,7 $\pm$ 1,09	28,4 $\pm$ 6,8	3,7 $\pm$ 3,7
1	12	250,31	0,0644	0,3	5,3	1
2	12	254,07	0,0505	0,2	4,5	0
3	12	207,55	0,0811	1,9	24	4
4	12	236,95	0,1666	1,2	7,7	3,5
5	12	218,05	0,072	0,5	8,1	5
Média $\pm$ desvio padrão		233 $\pm$ 20,1	0,08 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,7	9,9 $\pm$ 8,0	2,7 $\pm$ 2,1
1	24	390,56	0,3317	0,3	0,9	3,5
2	24	331,05	0,1701	0,008	0,04	2,5
3	24	357,62	0,1073	0,01	0,11	2,5
4	24	351,77	0,0795	0,007	0,08	1,5
5	24	270,39	0,0803	0,04	0,5	2,5
Média $\pm$ desvio padrão		340 $\pm$ 44,5	0,15 $\pm$ 0,1	0,07 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,7
1	48	215,06	0,0556	0,04	0,7	0
2	48	240,27	0,0351	0,004	0,1	0
3	48	241,94	0,0183	0,1	6,6	0
4	48	225,40	0,0632	0	0	0
5	48	215,55	0,0106	0,01	0,9	0,5
Média $\pm$ desvio padrão		227 $\pm$ 12,9	0,03 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,04	1,6 $\pm$ 2,7	0,1 $\pm$ 0,2
1	72	335,08	0,0344	0,04	1,2	0,5
2	72	309,39	0,0436	0,09	2,2	0
3	72	305,84	0,0347	0,03	0,8	0,5
4	72	334,35	0,0443	0,02	0,4	0,5
5	72	335,08	0,1487	0,1	0,6	0
Média $\pm$ desvio padrão		323 $\pm$ 14,9	0,06 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,03	1,0 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,2

ANEXO 2. Dados originais obtidos a partir da inoculação de *Candida albicans* em ratos xerostômicos. O tempo corresponde aos períodos de inoculação até a coleta da saliva. Para cada período foram utilizados 5 animais.

Nº	Tempo (min.)	Peso (g)	Saliva Coletada	Recuperação total/2ml (x 10 ⁴)	Recuperação UFC/ml (x 10 ⁴)	Contagem de células (PV)
1	5	296,30	0,0064	180	28125	177,5
2	5	249,15	0,0164	850	39351	80
3	5	278,99	0,0102	1010	33666	74
4	5	236,30	0,0252	406	32741	59,5
5	5	201,30	0,0539	128	2374	197,5
Média ± desvio padrão		252 ± 37,1	0,02 ± 0,01	514 ± 397	27251 ± 14468	117,7 ± 64,5
1	15	231,76	0,0182	68	3736	57,5
2	15	191,54	0,0045	59	13111	106,5
3	15	230,45	0,0182	60	3296	45
4	15	203,32	0,0091	269	29560	205
5	15	209,25	0,032	128	4000	67
Média ± desvio padrão		213 ± 17,4	0,01 ± 0,01	116 ± 89,7	10740 ± 11288	96,2 ± 65,0
1	30	234,76	0,007	25	3736	21
2	30	196,47	0,0055	29	5418	41
3	30	251,61	0,0242	78	3223	12,5
4	30	268,65	0,0052	26	5153	36,5
5	30	215,55	0,0156	66	4230	16
Média ± desvio padrão		233 ± 28,5	0,01 ± 0,008	44,8 ± 25,2	4324 ± 952	25,4 ± 12,6
1	1	211,10	0,0078	36	4615	33,5
2	1	206,21	0,0149	25	1691	3
3	1	202,19	0,0048	19	3958	23,5
4	1	203,42	0,0126	47	3730	21
5	1	242,40	0,0121	19	1611	18,5
Média ± desvio padrão		213 ± 16,7	0,01 ± 0,04	29,2 ± 12,1	3121 ± 1380	19,9 ± 11,0
1	4	326,39	0,0075	21	2866	4
2	4	273,57	0,0122	2,3	190	5
3	4	322,87	0,0057	1,6	280	4,5
4	4	302,52	0,0120	2,1	175	4,5
5	4	200,59	0,0125	8,7	696	3,5
Média ± desvio padrão		285 ± 51,7	0,009 ± 0,003	7,1 ± 8,2	841 ± 1151	4,3 ± 0,5
1	12	199,62	0,0197	0,8	44	4,5
2	12	236,91	0,0193	0,6	32	5,5
3	12	195,67	0,0104	1,8	179	2
4	12	212,31	0,0162	0,6	42	2
5	12	200,02	0,0135	3,1	235	1,5
Média ± desvio padrão		208,9 ± 16,8	0,01 ± 0,003	1,3 ± 1,0	106 ± 94	3,1 ± 1,7
1	24	245,00	0,008	0,07	9,7	2,5
2	24	233,32	0,0113	0,07	6,5	4
3	24	242,54	0,0077	0,07	10	3,5
4	24	224,54	0,0087	0,08	10	2,5
5	24	245,83	0,0087	0,08	9,5	2
Média ± desvio padrão		238 ± 9,1	0,008 ± 0,001	0,07 ± 0,005	9,1 ± 1,4	2,9 ± 0,8
1	48	218,99	0,0129	0,3	25	4
2	48	227,18	0,0114	0,02	1,7	1
3	48	229,76	0,0113	0,09	8,5	3
4	48	203,73	0,0077	0,004	0,5	1
5	48	231,34	0,0058	0,03	6,3	1,5
Média ± desvio padrão		222 ± 11,3	0,009 ± 0,002	0,08 ± 0,1	8,4 ± 9,8	2,1 ± 1,3
1	72	209,26	0,0059	0,03	6	0,5
2	72	233,38	0,0186	0,07	4	0
3	72	221,73	0,0122	0,06	5	1
4	72	213,94	0,0128	0,01	0,7	1
5	72	188,68	0,0126	0,1	13	0,5
Média ± desvio padrão		213 ± 16,5	0,01 ± 0,004	0,05 ± 0,03	5,7 ± 4,5	0,6 ± 0,4

ANEXO 3. Dados originais obtidos a partir da inoculação de *Candida tropicalis* em ratos normais. O tempo corresponde aos períodos de inoculação até a coleta da saliva. Para cada período foram utilizados 5 animais.

Nº	Tempo (min.)	Peso (g)	Saliva Coletada	Recuperação total/2ml ($\times 10^4$)	Recuperação UFC/ml ($\times 10^4$)	Contagem de células (PV)
1	5	231,72	0,1226	78	636	15
2	5	235,75	0,0834	19	227	12,5
3	5	202,20	0,0073	29	3972	14,5
4	5	250,70	0,038	720	18947	16,5
5	5	232,30	0,0584	445	7619	29
Média $\pm$ desvio padrão		230 $\pm$ 17,6	0,06 $\pm$ 0,04	258 $\pm$ 312	6280 $\pm$ 7682	17,5 $\pm$ 6,5
1	15	325,35	0,0271	257	9483	62,5
2	15	238,03	0,0303	207	6831	5,5
3	15	237,22	0,0624	194	3108	19
4	15	236,78	0,1777	246	1384	15
5	15	232,39	0,0388	120	640	30,5
Média $\pm$ desvio padrão		253 $\pm$ 39,9	0,06 $\pm$ 0,06	204 $\pm$ 54,1	4289 $\pm$ 3761	26,5 $\pm$ 22
1	30	211,91	0,0605	86	1421	7,5
2	30	325,37	0,0819	200	2442	4,5
3	30	216,30	0,1321	89	673	2
4	30	199,04	0,0232	42	1849	13,5
5	30	204,43	0,0875	56	640	9,5
Média $\pm$ desvio padrão		231 $\pm$ 52,9	0,07 $\pm$ 0,03	94,6 $\pm$ 62,1	1405 $\pm$ 773	7,4 $\pm$ 4,4
1	1	316,72	0,0145	97	6703	7,5
2	1	318,34	0,0901	83	928	15,5
3	1	364,58	0,0805	64	806	6,5
4	1	305,76	0,0874	109	1249	15
5	1	297,82	0,0162	48	3012	16
Média $\pm$ desvio padrão		320 $\pm$ 25,9	0,05 $\pm$ 0,03	80,2 $\pm$ 24,5	2539 $\pm$ 2491	12,1 $\pm$ 4,6
1	4	355,64	0,0748	4,9	65	4,5
2	4	329,78	0,0389	13	334	10
3	4	365,47	0,0574	34	601	4,5
4	4	375,54	0,026	22	853	3,5
5	4	314,33	0,0601	35	595	8
Média $\pm$ desvio padrão		348 $\pm$ 25,4	0,05 $\pm$ 0,01	21,7 $\pm$ 13,0	489 $\pm$ 300	6,1 $\pm$ 2,7
1	12	351,20	0,0386	0,5	14	1
2	12	325,32	0,1028	2,8	27	1
3	12	364,01	0,0484	0,5	11	0,5
4	12	345,24	0,1024	2,3	22	0
5	12	305,05	0,0119	1,2	102	0,5
Média $\pm$ desvio padrão		338 $\pm$ 23,1	0,06 $\pm$ 0,04	1,4 $\pm$ 1,0	35,2 $\pm$ 37,8	0,6 $\pm$ 0,4
1	24	224,43	0,0612	0,2	3,5	1
2	24	216,73	0,0835	0,03	0,4	0
3	24	211,93	0,0373	0,7	21	0
4	24	240,84	0,2343	0,8	3,4	0
5	24	204,62	0,0458	0,1	3,5	0
Média $\pm$ desvio padrão		219 $\pm$ 13,8	0,09 $\pm$ 0,08	0,3 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 8,2	0,2 $\pm$ 0,4
1	48	218,80	0,11	0,2	2,5	0,5
2	48	200,55	0,03	0,01	0,3	0,5
3	48	212,42	0,0532	0,02	0,4	0
4	48	238,12	0,0283	0,01	0,4	0
5	48	206,41	0,1017	0,09	0,8	0
Média $\pm$ desvio padrão		215 $\pm$ 14,4	0,06 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,08	0,8 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,2
1	72	212,45	0,0346	0	0	0
2	72	241,69	0,0489	0	0	0,5
3	72	298,66	0,0511	0	0	0,5
4	72	289,14	0,0235	0,001	0,04	0
5	72	266,41	0,132	0,002	0,01	0
Média $\pm$ desvio padrão		261 $\pm$ 35,2	0,05 $\pm$ 0,04	0,0006 $\pm$ 0,0008	0,01 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,2

ANEXO 4. Dados originais obtidos a partir da inoculação de *Candida tropicalis* em ratos xerostômicos. O tempo corresponde aos períodos de inoculação até a coleta da saliva. Para cada período foram utilizados 5 animais.

Nº	Tempo (min.)	Peso (g)	Saliva Coletada	Recuperação total/2ml (x 10 ⁴)	Recuperação UFC/ml (x 10 ⁴)	Contagem de células (PV)
1	5	218,75	0,018	373	20722	207
2	5	225,83	0,0217	255	36428	299,5
3	5	216,73	0,0481	890	18503	69
4	5	207,55	0,0345	235	45192	227
5	5	177,51	0,0325	1440	44307	279
Média ± desvio padrão		209 ± 18,9	0,03 ± 0,01	638 ± 521	33030 ± 12739	216 ± 90,4
1	15	229,34	0,0114	367	32192	120,5
2	15	223,87	0,0182	440	24175	99,5
3	15	210,36	0,0128	360	28125	77
4	15	234,58	0,0159	336	21132	133,5
5	15	221,93	0,0118	243	20593	73,5
Média ± desvio padrão		224 ± 9,0	0,01 ± 0,002	349 ± 70,9	25243 ± 4905	100 ± 26,3
1	30	227,05	0,0018	73	40555	33,5
2	30	218,45	0,0008	53	19107	50
3	30	211,23	0,0227	253	11145	106
4	30	230,02	0,0092	158	17173	53
5	30	196,89	0,0207	135	14516	34,5
Média ± desvio padrão		216 ± 13,3	0,01 ± 0,01	134 ± 79	20499 ± 11603	55,4 ± 29,6
1	1	239,84	0,0065	32	4383	11,5
2	1	169,53	0,0177	60	5042	34,5
3	1	217,61	0,0172	98	5939	41,5
4	1	214,26	0,004	30	2027	45
5	1	218,78	0,0149	24	2123	7
Média ± desvio padrão		210 ± 15,3	0,01 ± 0,003	48,8 ± 30,8	3902 ± 1757	27,9 ± 17,5
1	4	204,64	0,0041	16	3975	4
2	4	258,79	0,0266	18	710	13
3	4	204,77	0,0194	24	1247	5
4	4	217,00	0,0155	26	1683	10
5	4	240,76	0,0084	49	5857	10,5
Média ± desvio padrão		225 ± 23,8	0,01 ± 0,008	26,6 ± 13,1	2694 ± 2162	8,5 ± 3,8
1	12	309,00	0,0093	0,7	76	0
2	12	297,00	0,0046	0,1	26	1,5
3	12	234,08	0,0089	1,6	183	0
4	12	295,07	0,011	0,2	24	1
5	12	292,76	0,0055	0,8	149	2
Média ± desvio padrão		285 ± 29,4	0,07 ± 0,002	0,6 ± 0,5	91,6 ± 72	0,9 ± 0,8
1	24	221,55	0,0129	0,2	22	0,5
2	24	259,23	0,0147	0,1	12	0,5
3	24	239,94	0,0083	0,2	27	0,5
4	24	198,11	0,0077	0,3	41	0
5	24	224,65	0,0109	0,3	33	0,5
Média ± desvio padrão		228 ± 22,7	0,01 ± 0,002	0,2 ± 0,08	27 ± 10,9	0,4 ± 0,2
1	48	218,52	0,0048	0,02	6,0	1,5
2	48	210,64	0,0134	0,004	0,2	1
3	48	239,81	0,0096	0,005	0,5	1,5
4	48	231,97	0,009	0,01	1,5	1,5
5	48	231,68	0,0101	0,02	2,2	0,5
Média ± desvio padrão		226 ± 11,7	0,009 ± 0,003	0,01 ± 0,007	2,0 ± 2,3	1,2 ± 0,4
1	72	208,48	0,0187	0,002	0,1	0
2	72	194,85	0,0266	0,001	0,03	1
3	72	208,38	0,0107	0,003	0,2	0,5
4	72	226,83	0,0104	0,004	0,3	0,5
5	72	207,38	0,0149	0	0	0
Média ± desvio padrão		209 ± 11,4	0,01 ± 0,006	0,002 ± 0,001	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,4

ANEXO 5. Dados originais obtidos a partir da inoculação de *Candida krusei* em ratos normais. O tempo corresponde aos períodos de inoculação até a coleta da saliva. Para cada período foram utilizados 5 animais.

Nº	Tempo (min.)	Peso (g)	Saliva Coletada	Recuperação total/2ml ($\times 10^4$)	Recuperação UFC/ml ($\times 10^4$)	Contagem de células (PV)
1	5	241,02	0,012	63	5250	173
2	5	262,04	0,0221	145	6561	88
3	5	252,06	0,024	464	19333	184
4	5	260,31	0,0213	787	36948	162
5	5	238,37	0,0127	256	20157	80,5
Média $\pm$ desvio padrão		250 $\pm$ 10,8	0,01 $\pm$ 0,005	343 $\pm$ 290	17649 $\pm$ 12828	137 $\pm$ 49,3
1	15	230,70	0,0082	73	8902	68,5
2	15	226,73	0,0371	39	1072	14,5
3	15	219,80	0,0036	36	10111	53
4	15	231,69	0,1294	67	517	13
5	15	244,43	0,0198	48	2454	32
Média $\pm$ desvio padrão		230 $\pm$ 9,0	0,03 $\pm$ 0,05	52,6 $\pm$ 16,6	4611 $\pm$ 4544	36,2 $\pm$ 24,2
1	30	364,23	0,0744	112	1505	8,5
2	30	333,21	0,0194	146	7525	53
3	30	348,98	0,0466	186	3991	28
4	30	320,43	0,0455	93	2043	30
5	30	315,11	0,0787	208	2642	28
Média $\pm$ desvio padrão		336 $\pm$ 20,3	0,05 $\pm$ 0,02	149 $\pm$ 48,3	3541 $\pm$ 2412	29,5 $\pm$ 15,7
1	1	274,36	0,039	3,6	92	17
2	1	244,05	0,0623	16	268	1,5
3	1	278,80	0,0761	21	278	4
4	1	220,13	0,1173	22	192	15,5
5	1	214,47	0,0272	26	985	5
Média $\pm$ desvio padrão		246 $\pm$ 29,7	0,06 $\pm$ 0,03	17,7 $\pm$ 8,6	363 $\pm$ 355	8,6 $\pm$ 7,1
1	4	198,97	0,0412	11	276	1
2	4	215,23	0,0397	17	450	1,5
3	4	199,18	0,0197	17	862	1
4	4	196,83	0,0674	21	311	0
5	4	176,93	0,0389	9,8	251	2
Média $\pm$ desvio padrão		197 $\pm$ 13,6	0,04 $\pm$ 0,01	15,1 $\pm$ 4,6	430 $\pm$ 253	1,1 $\pm$ 0,7
1	12	284,03	0,0099	0,2	27	0,5
2	12	291,21	0,0085	0,9	115	1,5
3	12	301,02	0,02	0,5	27	2
4	12	295,06	0,0298	0,1	3,5	0,5
5	12	297,31	0,0144	0,5	40	1
Média $\pm$ desvio padrão		293 $\pm$ 6,4	0,01 $\pm$ 0,008	0,4 $\pm$ 0,3	42,5 $\pm$ 42,6	1,1 $\pm$ 0,6
1	24	227,81	0,0975	0,2	2,0	0
2	24	278,48	0,0316	0,1	5,5	0
3	24	281,29	0,1423	0,07	0,5	0
4	24	276,51	0,0618	0,1	2,3	0
5	24	284,10	0,0997	0,1	1,8	0,5
Média $\pm$ desvio padrão		269 $\pm$ 23,5	0,08 $\pm$ 0,04	0,1 $\pm$ 0,04	2,4 $\pm$ 1,8	0,1 $\pm$ 0,2
1	48	259,95	0,059	0,1	2,3	0
2	48	243,41	0,0444	0,09	2,0	0,5
3	48	261,73	0,0595	0,1	2,2	0
4	48	285,40	0,0655	0,08	1,2	0
5	48	297,11	0,0542	0,05	0,9	0
Média $\pm$ desvio padrão		269 $\pm$ 21,4	0,05 $\pm$ 0,007	0,08 $\pm$ 0,02	1,7 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,2
1	72	307,00	0,033	0,01	0,3	0
2	72	317,66	0,1856	0,1	1,0	0,5
3	72	317,69	0,0816	0,05	0,6	0
4	72	248,19	0,1116	0,005	0,04	0
5	72	337,85	0,0838	0,02	0,2	0
Média $\pm$ desvio padrão		305 $\pm$ 34,0	0,09 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2

ANEXO 6. Dados originais obtidos a partir da inoculação de *Candida krusei* em ratos xerostômicos. O tempo corresponde aos períodos de inoculação até a coleta da saliva. Para cada período foram utilizados 5 animais.

Nº	Tempo (min.)	Peso (g)	Saliva Coletada	Recuperação total/2ml ($\times 10^4$)	Recuperação UFC/ml ($\times 10^4$)	Contagem de células (PV)
1	5	200,37	0,0093	470	50537	210
2	5	275,31	0,0105	1000	5238	203
3	5	232,04	0,0084	578	68809	445
4	5	211,15	0,0031	144	46451	393,5
5	5	197,06	0,0119	481	40420	206
Média $\pm$ desvio padrão		223 $\pm$ 32,1	0,008 $\pm$ 0,003	534 $\pm$ 307	42291 $\pm$ 23264	291 $\pm$ 118
1	15	277,67	0,0171	315	18421	91
2	15	237,24	0,0126	210	16666	58
3	15	225,60	0,0072	543	75416	113,5
4	15	206,07	0,0054	450	83333	227
5	15	191,41	0,0089	230	25842	91,5
Média $\pm$ desvio padrão		227 $\pm$ 33,0	0,01 $\pm$ 0,004	349 $\pm$ 143	4393 $\pm$ 32654	116 $\pm$ 65
1	30	219,72	0,0047	34	7404	45,5
2	30	190,04	0,0055	23	4345	39,5
3	30	185,47	0,0019	35	18894	19
4	30	211,13	0,0413	46	1121	17,5
5	30	205,52	0,0068	15	2294	54,5
Média $\pm$ desvio padrão		202 $\pm$ 14,3	0,01 $\pm$ 0,01	30,6 $\pm$ 11,9	6811 $\pm$ 7162	35,2 $\pm$ 16,3
1	1	192,90	0,0158	33	2107	48
2	1	230,49	0,0039	20	5153	33,5
3	1	228,74	0,0037	63	17135	53,5
4	1	177,40	0,004	47	11875	15,5
5	1	234,71	0,0075	36	4826	10,5
Média $\pm$ desvio padrão		212 $\pm$ 25,9	0,006 $\pm$ 0,005	39,8 $\pm$ 16,1	8219 $\pm$ 6146	32,2 $\pm$ 19,0
1	4	187,51	0,0065	10	1561	13,5
2	4	171,75	0,0119	15	1285	12
3	4	179,09	0,0066	3,2	489	15
4	4	187,70	0,0024	5,3	2212	8,5
5	4	167,96	0,0028	4,8	1735	10,5
Média $\pm$ desvio padrão		178 $\pm$ 8,9	0,006 $\pm$ 0,003	7,6 $\pm$ 4,8	1456 $\pm$ 637	11,9 $\pm$ 2,5
1	12	208,04	0,0258*	0,3	12	2
2	12	225,34	0,0055	0,05	10	2,5
3	12	217,68	0,0105	0,1	11	2,5
4	12	216,40	0,0147	0,1	13	2,5
5	12	222,13	0,0041	0,2	48	3,5
Média $\pm$ desvio padrão		217 $\pm$ 6,5	0,01 $\pm$ 0,008	0,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 16,3	2,6 $\pm$ 0,5
1	24	327,32	0,0145	0,05	3,8	2,5
2	24	270,04	0,0273	0,02	0,7	1
3	24	284,62	0,0145	0,02	1,5	1
4	24	261,62	0,0118	0,1	9,1	4,5
5	24	261,63	0,0066	0,01	2,7	2,5
Média $\pm$ desvio padrão		281 $\pm$ 27,5	0,01 $\pm$ 0,007	0,04 $\pm$ 0,03	3,5 $\pm$ 3,3	2,3 $\pm$ 1,4
1	48	297,06	0,0069	0,01	1,4	2,5
2	48	292,19	0,0169	0,005	0,2	1,5
3	48	277,77	0,0135	0,01	0,8	1
4	48	282,08	0,0169	0,01	0,7	0,5
5	48	325,88	0,0116	0,006	0,5	0,5
Média $\pm$ desvio padrão		294 $\pm$ 18,9	0,01 $\pm$ 0,004	0,008 $\pm$ 0,002	0,7 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,8
1	72	207,81	0,0298	0,002	0,06	1
2	72	237,27	0,0125	0,007	0,5	3,5
3	72	231,85	0,0175	0,004	0,2	2
4	72	201,77	0,012	0	0	3,5
5	72	232,83	0,0036	0,003	0,8	1,5
Média $\pm$ desvio padrão		222 $\pm$ 16,2	0,01 $\pm$ 0,009	0,003 $\pm$ 0,002	0,3 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 1,1