

ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE, C.D.ⁿ

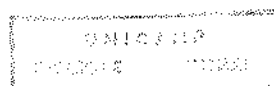
EFEITOS DA SIALOADENECTOMIA NA
PRESENÇA DE Candida albicans E
CANDIDOSE NA CAVIDADE BUCAL DE RATOS

Orientador: Prof.Dr. Oslei Paes de Almeida^t

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

PIRACICABA, S.P.

1991



A minha mãe JURACY,

A memória de meu pai, OLAVO.

Ao Prof.Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA, Professor Titular
de Patologia da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba/UNICAMP, nosso agradecimento pela
orientação objetiva e criteriosa e pela con-
fiança em nós depositada.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, na pessoa de seu Diretor, Prof.Dr. ROGERIO LACAZ NETTO, pela oportunidade que nos foi concedida, para a realização do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

Ao Prof.Dr. MATHIAS VITTI, Coordenador do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental.

A Profa.Dra. TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO, Ex-Coordenadora do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental, pelo estímulo e compreensão.

Aos demais Professores do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental, que sempre procuraram transmitir seus conhecimentos e experiências.

A Profa.Dra. VERA FANTINATO, Chefe do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

Aos Profs.Drs. NEIDE QUERIDO ALMEIDA, MARIO TSUNEZI SHIMIZU, VERA FANTINATO e CARMELINDA SCHIMIDT UNTERKIRCHER, da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pela compreensão durante nosso afastamento para realização deste trabalho.

A aluna de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, MARILDA APARECIDA GONÇALVES TOTTI, pela ajuda durante a fase experimental, principalmente no manuseio dos animais.

A aluna de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, CLAUDIA MARIA NAVARRO, pela ajuda na interpretação histopatológica.

A Profa. VÂNIA CÉLIA VIEIRA DE SIQUEIRA, Professora Assistente de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela ajuda na confecção das placas acrílicas.

Ao Sr. PEDRO DUARTE NOVAES, Técnico Especializado de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela ajuda na microscopia eletrônica e na documentação fotográfica deste trabalho.

A Srta. FABIANA FACCO CASAROTTI, Técnica do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela obtenção dos cortes histológicos.

A Srta. ELIZABETE BRASIL DOS SANTOS, Técnica do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pela ajuda na identificação das amostras de Candida albicans.

A Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Prof.Dr. LUIZ VALDRIGHI, pela utilização das dependências do Laboratório da disciplina.

A Profa. LEILA NOVAES, Bibliotecária da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pela orientação nas referências bibliográficas.

A Profa. MARLY CARDOSO DE ALMEIDA, pela revisão ortográfica do texto.

A Colega de curso, LAURA ALVARENGA ZUCCO BROGLIO, pelo estímulo e companheirismo durante a realização dos créditos.

Aos demais colegas do Curso de Biologia e Patologia Bucodental, aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, e a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o auxílio
da FAPESP, processo nº 91/0983-3.

SUMARIO

	pg
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DA LITERATURA	04
1 <u>Candida albicans</u>	04
2 PRESENÇA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA	07
3 PATOGENICIDADE DE <u>Candida albicans</u>	10
4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE <u>Candida albicans</u> NOS TECIDOS	14
5 CANDIDOSE BUCAL	16
6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CANDIDOSE	21
7 XEROSTOMIA	28
MATERIAL E MÉTODOS	35
1 ANIMAIS	35
2 PRESENÇA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS	36
2.1 Formação de tubo germinativo	37
2.2 Produção de clamidósporo	37
2.3 Fermentação de açúcares	38
2.4 Interpretação das provas	38
3 SIALOADENECTOMIA, QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA E PREPARO DA SUSPENSÃO DE <u>Candida albicans</u>	40
3.1 Sialoadenectomia	40
3.2 Quantificação de saliva	41
3.3 Preparo da suspensão de <u>Candida albicans</u> ..	41
4 PERSISTÊNCIA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	43
5 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS	45
5.1 Macroscopia	45
5.2 Microscopia de luz	45
5.3 Microscopia eletrônica	46
5.4 Morfologia de <u>Candida albicans</u> "in vitro" ..	46

		pg
6	APLICAÇÃO DE <u>Candida albicans</u> COM "SWAB" NA LINGUA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS ..	47
7	INOCULAÇÃO PROLONGADA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	48
8	INOCULAÇÃO DE <u>Candida albicans</u> EM RATOS PORTADORES DE PLACA ACRILICA NO PALATO	49
	8.1 Confeção e adaptação das placas acrílicas .	49
	8.2 Grupos de animais	50
9	CANDIDOSE NO DORSO DA LINGUA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	51
10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
	RESULTADOS	54
1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA LINGUA E DO PALATO DE RATOS NORMAIS	54
	1.1 Língua	54
	1.2 Palato duro	56
	1.3 Palato mole	57
2	PRESENÇA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS	66
3	QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	67
4	PERSISTÊNCIA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	69
5	MORFOLOGIA DE <u>Candida albicans</u> "IN VITRO"	72
6	EFEITOS DA APLICAÇÃO DE <u>Candida albicans</u> COM "SWAB" NA LINGUA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	75
7	EFEITOS DA INOCULAÇÃO PROLONGADA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	92
8	EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE <u>Candida albicans</u> EM RATOS PORTADORES DE PLACA ACRILICA NO PALATO ...	101
9	CANDIDOSE NO DORSO DA LINGUA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	108

DISCUSSÃO	151
1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA LÍNGUA E DO PALATO DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	151
2 PRESENÇA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS	154
3 SIALOADENECTOMIA, QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA NA BOCA DE RATOS E SUSPENSÃO DE <u>Candida albicans</u> UTILIZADA	155
4 PERSISTÊNCIA DA <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	161
5 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE <u>Candida albicans</u> EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA	164
6 APLICAÇÃO DE <u>Candida albicans</u> COM "SWAB" NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS ...	165
7 INOCULAÇÃO PROLONGADA DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS ...	171
8 INOCULAÇÃO DE <u>Candida albicans</u> NA BOCA DE RATOS PORTADORES DE PLACA ACRÍLICA NO PALATO	174
9 CANDIDOSE NO DORSO DA LÍNGUA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS	177
CONCLUSÕES	185
RESUMO	188
SUMMARY	191
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	194

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A candidose bucal está associada a fatores locais ou sistêmicos que alteram o sistema de defesa do hospedeiro, diminuem o fluxo salivar ou interferem com a microbiota bucal (BRAWNER e CUTLER, 1989; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a; HEINDAHL e NORD, 1990; SCHIODT e cols., 1990; WILKIESON e cols., 1991). Alterações clínicas como a Síndrome de Sjögren, uso de medicamentos e alterações das glândulas salivares decorrentes de radiações, produzem xerostomia em humanos (HERRERA e cols., 1988) e facilitam infecções bucais por fungos (EPSTEIN e cols., 1983). A saliva é importante mecanismo de defesa, não apenas mecanicamente, mas também através de fatores enzimáticos e imunológicos (HERRERA e cols., 1988; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990b; OKSALA, 1990).

A colonização, permanência e patogenicidade de Candida albicans na cavidade bucal de ratos, foram descritas por vários autores (RUSSELL e cols., 1976; FISHER e cols., 1982 a e b; SHAKIR e cols., 1986a, b; ALLEN e BECK, 1987; REED e cols., 1990), entretanto há poucos dados dos efeitos da xerostomia na candidose bucal em animais. JONES e ADAMS (1970) não observaram alterações na frequência de infecção por C. albicans em ratos com diminuição do fluxo salivar. Por outro lado, OLSEN e HAANAES (1977) verificaram que macacos com diminuição do fluxo salivar apresentaram

candidose mais intensa e de regressão mais lenta em relação aos animais normais. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da xerostomia, provocada pela sialoadenectomia, na presença de C.albicans e no desenvolvimento da candidose na cavidade bucal de ratos.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 Candida albicans

A espécie Candida albicans pertence ao género Candida, família Cryptococcaceae, classe Blastomycetes, subdivisão Deuteromycotina, divisão Eumycota, reino Fungi (KREGER-VAN RIJ, 1984).

C. albicans é um fungo dimórfico que na forma de levedura apresenta-se como células globosas, Gram positivas, ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 a 7 μm de largura por 3 a 14 μm de comprimento (MEYER e cols., 1984). Quando na forma de micélio, apresenta-se como pseudohifas, podendo formar hifas verdadeiras, que se alongam a partir das leveduras (ODDS, 1987).

Em meio de cultura líquido, C. albicans forma sedimento; em meio sólido, a colónia apresenta coloração branca ou branco-amarelada, 4 a 8 mm de diâmetro, eventualmente com filamentos nas bordas. Em microcultivo, a formação de pseudohifas é abundante, podendo-se detectar hifas verdadeiras. Em soro a 37°C, C. albicans produz tubo germinativo, enquanto que cultivada em Agar-fubá, apresenta estruturas esféricas características, os clamidósporos. Fermenta a glicose e maltose, não ocorrendo o mesmo com a lactose; geralmente não fermenta a sacarose e a fermentação

da galactose é variável. Como fontes de carbono assimila dextrose, galactose, maltose, trealose, xilose, sacarose e manitol; eventualmente arabinose, ribose e glucitol (KREGER-VAN RIJ, 1984).

A C.albicans é aeróbica, no entanto, é capaz de crescer em anaerobiose (ODDS, 1987). A formação de micélio "in vitro" é acentuada em condições de anaerobiose (DAHLE e OLSEN, 1991), e a presença de microfilamentos no citoplasma, parece ser essencial para sua filamentação (YOKOYAMA e cols., 1990).

É classificada em sorotipos A e B (HASENCLEVER e MITCHELL, 1961), porém o grau de virulência das amostras de C.albicans para camundongos não está relacionada com os mesmos (HASENCLEVER e MITCHELL, 1962).

Na microscopia eletrônica de transmissão, as leveduras apresentam parede celular composta de camadas variáveis em espessura e eletrondensidade; membrana citoplasmática sinuosa, com invaginações de periodicidade definida. O citoplasma apresenta várias mitocôndrias, largo vacúolo, retículo endoplasmático liso e rugoso, polirribossomos e grânulos de reserva. O núcleo é revestido por dupla membrana, com nucléolo evidente (BAKERSPIGEL, 1964). As pseudohifas também apresentam organelas bem definidas, apesar de não visíveis em todas as secções (CAWSON e RAJASINGHAN, 1972). A parede celular da C.albicans, tanto na forma de levedura como de pseudohifa, pode apresentar

matriz fibrilar externa, evidenciável pelo vermelho de rutênio (MARRIE e COSTERTON, 1981).

As leveduras do gênero Candida, acham-se amplamente espalhadas na natureza, sendo que algumas espécies vivem como saprófitas ou parasitas no homem e em outras espécies animais. A C. albicans, associada obrigatoriamente a seres humanos ou outros animais homotermos (SHEPERD e cols., 1985), vive normalmente na orofaringe, na boca, nas dobras da pele, na secreção brônquica, na vagina, urina e fezes de humanos (LACAZ, 1980).

2 PRESENÇA DE Candida albicans NA BOCA

As leveduras são os únicos fungos pertencentes à microbiota normal do homem, ocorrendo comumente na cavidade bucal de indivíduos sadios. C.albicans é a espécie prevalente, constituindo de 60 a 70% do total dos fungos isolados (STENDERUP, 1990).

C.albicans é isolada da boca de 5 a 7 % das crianças nas primeiras 24 horas após o nascimento, estando presente em 14,21% após 1 semana (RUSSELL e LAY, 1973; LAY e RUSSELL, 1977). BERDICEVSKY e cols.(1984) relataram presença de Candida em 49% das crianças de 3 a 5,5 anos e em 65% nas de 6 a 12 anos.

ARENDORF e WALKER (1980b) relataram C.albicans em 44,4% das culturas de material de boca de adultos dentados sadios, enquanto BERDICEVSKY e cols.(1980), apresentaram porcentual de 88% de Candida em portadores de próteses totais sem candidose e 52% em pacientes dentados.

C.albicans não está distribuída uniformemente na boca; o dorso da língua parece ser o reservatório primário do fungo, a partir do qual o restante da mucosa, superfícies dos dentes, placa bacteriana e saliva tornam-se colonizados secundariamente (ARENDORF e WALKER, 1980b).

Ainda não está claro porque alguns pacientes são portadores de C.albicans e outros não, entretanto fatores nutricionais, interações com a microbiota bacteriana e

presença de anticorpos específicos na saliva parecem ser relevantes (STENDERUP, 1990). O estado de portador ocorre em maior número em indivíduos do tipo sanguíneo O (BURFORD-MASON e cols., 1988) e em não-secretores de antígenos dos grupos sanguíneos na saliva (LAMEY e cols., 1991).

Em pacientes saudáveis, apesar da variabilidade, as contagens de leveduras geralmente apresentam números baixos (WILLIANSOON, 1972a, b; EPSTEIN e cols., 1980; BURFORD-MASON e cols., 1988). OLSEN e STENDERUP (1990) salientam que na saliva de pacientes saudáveis, as contagens de C.albicans geralmente são inferiores a 400 unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml).

A superfície acrílica da prótese total predispõe ao aumento no número de C.albicans, visto que o fungo cresce e coloniza mais intensamente a superfície da prótese que a mucosa palatina (RENNER e cols., 1978; SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1980). Outros tipos de prótese e aparelhos ortodônticos também facilitam o desenvolvimento de C.albicans na boca (BUDTZ-JÖRGENSEN e cols., 1975; PROROK, 1978; MIRANDA e cols., 1983; GIANNI e cols., 1984; ARENDORF e ADDY, 1985; JORGE, 1986; JORGE e cols., 1987).

Os sorotipos A e B de C.albicans estão igualmente distribuídos na boca de pacientes saudáveis, porém nos pacientes imunodeprimidos, como na AIDS, a predominância é do sorotipo B (BRAWNER e CUTLER, 1984). Nas estomatites por

prótese total, o sorotipo A tem sido mais isolado (MARTIN e LAMB, 1982).

Pacientes hospitalizados apresentam taxas mais altas de isolamento do gênero Candida, com valores acima de 80% para a C.albicans (ODDS, 1987; KOMSHIAN e cols., 1989; WILKIESON e cols., 1991). Em pacientes aidéticos, FRANKER e cols.(1990) descreveram leveduras na mucosa bucal em 78% dos casos, sendo C.albicans o agente mais isolado. Em diabéticos, a quantidade de C.albicans é maior, principalmente quando associado ao uso de prótese total (TAPPER-JONES e cols., 1981).

Pacientes que receberam radioterapia na cabeça e pescoço também apresentam aumento na quantidade de C.albicans. ROSSIE e cols.(1987) relataram aumento no número de C.albicans (UFC/ml), assim como culturas positivas para a levedura em 47% dos pacientes que apresentavam culturas negativas antes da radiação.

Em condições normais, o organismo mantém C.albicans como comensal, entretanto, alterações locais ou sistêmicas favorecem o desenvolvimento da sua ação patogênica, causando a candidose, micose superficial de maior frequência na boca (ALY e cols., 1975; KIMURA e PEARSALL, 1978; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a).

3 PATOGENICIDADE DE Candida albicans

Os mecanismos pelos quais C. albicans causa doença são pouco conhecidos, entretanto vários fatores tem sido sugeridos: capacidade de aderência à mucosa, habilidade em formar pseudohifas, presença de substâncias semelhantes a endotoxinas e secreção de enzimas histolíticas (ODDS, 1987; DOUGLAS, 1987)..

Em bactérias, a aderência às células epiteliais é importante fator para a colonização de mucosas, como ocorre com Streptococcus na cavidade bucal (GIBBONS e VAN HOUTE, 1971), Vibrio cholerae no intestino (FRETER e JONES, 1972), e Neisseria gonorrhoeae no trato genital (MARDT e WESTROM, 1976).

A C. albicans possui capacidade de aderência às células epiteliais bucais e vaginais "in vitro" (KIMURA e PEARSBALL, 1978; KING e cols., 1980; SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1981, 1982a, 1982b; GHANNOUM e cols., 1990; DARWAZEH e cols., 1991), a qual é mais intensa na C. albicans, C. guilhiermondii e C. stellatoidea, espécies consideradas mais patogênicas para camundongos, do que C. crusei, C. parapsilosis, C. pseudotropicalis e C. tropicalis (MACURA e cols., 1983). Por outro lado, KEARNS e cols. (1983) não observaram diferenças entre a capacidade de adesão e a patogenicidade de duas amostras patogênicas e duas não patogênicas de C. albicans para camundongos.

A C.albicans, espécie considerada mais patogênica para o homem, adere-se às células esfoliativas bucais ou vaginais em maior número do que C.tropicalis, que normalmente é menos patogênica (DOUGLAS, 1987). Em coágulo de fibrina, C.albicans apresenta acentuada aderência, enquanto que C.crusei, C.quilliermondii e Torulopsis glabrata aderem-se menos (SAMARANAYAKE e cols., 1988). A C.albicans possui também capacidade de aderência às superfícies acrílicas "in vitro" (SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1980; SAMARANAYAKE e cols., 1980; McCOURTIE e DOUGLAS, 1981; KLOTZ e cols., 1985; McCOURTIE e cols., 1986a e b; SEGAL e cols., 1988; BRANTING e cols., 1989).

A adesão de leveduras aos tecidos bucais ocorre, provavelmente, pela interação entre adesinas do microrganismo e receptores das células epiteliais da boca. Na C.albicans, manoproteínas, glucano, chitina, proteínas da parede celular e lipídeos são possíveis adesinas (OLSEN, 1990).

Existe correlação entre germinação e aumento de aderência de C.albicans nas células epiteliais da boca, visto que a inibição parcial da germinação com cisteína, resulta em diminuição da aderência (KIMURA e PEARSALL, 1980), contribuindo para diminuir a patogenicidade da C.albicans (MARTIN e cols., 1984).

A produção do tubo germinativo pela C.albicans propicia retenção adicional desta espécie às células do epitélio

bucal, ao acrílico (KIMURA e PEARSALL, 1980; SOBEL e cols., 1984; TRONCHIN e cols., 1988) e à pele (RAY e PAYNE, 1988), enquanto que sua inibição pelo uso de drogas, diminui a aderência (GHANNIDUM e cols., 1990).

Endotoxinas de C.albicans também são consideradas importantes na patogenicidade (ISENBERG e cols., 1963; CUTLER e cols., 1972). Endotoxinas de Candida são letais para camundongos quando injetadas endovenosamente (MOURAD e FRIEDMAN, 1961) e produzem eritema em pele de coelhos e cobaias (WINNER, 1958). Extrato solúvel liofilizado de C.albicans, livre de células, é capaz de provocar dermatite, semelhante às doenças dermatológicas no homem (MAIBACH e KLIGMAN, 1962). Sobrenadante de culturas de C.albicans, livre de células, aumenta a atividade mitótica do epitélio bucal de ratos (REED e cols., 1990).

A endotoxina melhor caracterizada até o momento é a candidoxina descrita por IWATA em 1975. Tem natureza protéica, alto peso molecular e localiza-se no citoplasma da célula. A ação principal da candidoxina parece ser a de liberar histamina dos mastócitos.

Outro mecanismo de patogenicidade de C.albicans é pela atividade enzimática, que possivelmente facilita sua penetração nos tecidos. Vários autores relataram a produção de fosfolipase (PUGH e CAWSON, 1975; PRICE e CAWSON, 1977; PRICE e cols., 1982; SAMARANAYAKE e cols., 1984; BANNO e cols., 1985; BARRETT-BEE e cols., 1985), proteinase

(BUDTZ-JØRGENSEN, 1971b; RÜCHEL e cols., 1982; RÜCHEL, 1984; GHANNOUM e ELTEEN, 1986; CASSONI e cols., 1987; RAY e PAYNE, 1988; BORG e RÜCHEL, 1988 e 1990; NEELY e HOLDER, 1990), hialuronidase e condroitin sulfatase (SHIMIZU, 1988) pela C.albicans. SHIMIZU (1990) e ALMEIDA (1991), sugeriram a relação destas enzimas com a patogenicidade de C.albicans.

A proteinase de C.albicans é capaz de degradar IgA secretória e sérica da saliva; os possíveis efeitos protetores destes anticorpos ficariam diminuídos na presença de amostra do microrganismo capaz de produzir proteinase (REINHOLDT e cols., 1987). Proteinase Ácida produzida por C.albicans, possui atividade queratolítica, podendo participar na aderência e penetração da levedura nas superfícies queratinizadas do epitélio (RAY e PAYNE, 1988; BORG e RÜCHEL, 1988).

Há evidências de que alguns biotipos de C.albicans produzem nitrosamina endógena, substância comprovadamente cancerígena para células dos tecidos bucais (KROGH, 1990).

Embora os mecanismos patogênicos não estejam determinados, os dados da literatura indicam que são variados, dependendo da amostra de C.albicans, do modelo experimental e da espécie animal utilizados (ALBANO e SCHMITT, 1973; HOLBROOK e cols., 1983; McMILLAN e COWELL, 1985; ALLEN e BECK, 1983 e 1987).

4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE Candida albicans NOS TECIDOS

A C.albicans apresenta-se nos tecidos na forma de micélios e leveduras, dimorfismo característico da espécie. As leveduras aparecem como estruturas arredondadas ou ovaladas, diâmetro em torno de 4 μ m, paredes delicadas e bem demarcadas, podendo mostrar gemulação inicial. O micélio é geralmente longo, de espessura variável, com numerosas constrições. Pode-se observar septações a curtos intervalos, conferindo à pseudohifa aspecto característico, bem como ramificações de angulação variável. Quando observada em cortes transversais, exibe secção circular com discretas variações de calibre (PETTINATI, 1980).

A C.albicans provoca reação inflamatória aguda, com edema, acúmulo de neutrófilos e formação de microabcessos múltiplos. Nas superfícies mucosas, o micélio exibe crescimento exuberante, constituindo massas de filamentos e leveduras, causando infiltração inflamatória e frequentes ulcerações epiteliais multifocais (PETTINATI, 1980).

Em microscopia eletrônica, dois tipos de adesão podem ser observadas entre a levedura da C.albicans e a célula epitelial: associação mais fraca com espaço preenchido por matriz evidenciável pelo vermelho de rutênio; ou associação mais firme, sem a presença de espaço entre o blastoporo e a célula epitelial (MARRIE e COSTERTON, 1981). Após a

aderência da levedura à célula epitelial, quando ocorre a filamentação e invasão da pseudohifa, a união é mantida entre a parede da pseudohifa e a célula, não sendo visíveis danos evidentes à mesma, com exceção do local da entrada. Ocasionalmente há perda de componentes intercelulares nas proximidades do local de invasão da pseudohifa (HOWLETT e SQUIER, 1980).

As pseudohifas de C.albicans apresentam crescimento intracelular na microscopia eletrônica, podendo em alguns casos aparecer perto ou cruzando as junções intercelulares das células epiteliais (CAWSON e RAJASINGHAM, 1972). Nas candidoses crônicas, a ultraestrutura da camada superficial do epitélio revela C.albicans em localização extra e intracelular. A penetração de Candida geralmente ocorre nas camadas mais superficiais, raramente atingindo as camadas profundas do epitélio. O citoplasma das células epiteliais demonstra alterações degenerativas e fragmentações das tonofibrilas na proximidade imediata ao fungo. Microabcessos, formados por neutrófilos são comuns acima da camada espinhosa, contendo bactérias e fungos fagocitados por neutrófilos e macrófagos. No conjuntivo há acúmulo de neutrófilos e macrófagos e aumento no número de mastócitos (MOHAMED, 1975).

5 CANDIDOSE BUCAL

Candidose ou candidíase bucal, é definida como uma infecção micótica oportunista, causada por fungos do gênero Candida, principalmente C.albicans (SHEPERD e cols., 1985; FREITAS e BIRMAN, 1989; STENDERUP, 1990).

A C.albicans ocorre normalmente como comensal no hospedeiro humano, tendo capacidade de invadir os tecidos quando as defesas locais ou sistêmicas estão diminuídas. Portanto, a virulência da C.albicans é determinada mais pelo hospedeiro do que pelo fungo (ODDS, 1979).

Múltiplos fatores predispoem as infecções por fungos na boca, sendo rara a ocorrência de infecção sem a presença de um ou mais destes fatores. Entre estes fatores são destacados por OKSALA (1990): irritantes crônicos locais; aparelhos protéticos mal adaptados ou inadequadamente cuidados; mudanças na microbiota bucal por antibióticos, corticosteróides ou xerostomia; doenças crônicas ou malignas; discrasias sanguíneas graves; radioterapia de cabeça e pescoço; idade; hospitalização; displasia epitelial bucal; e tabagismo.

As candidoses são muito comuns; cerca de 5% das crianças apresentam a doença na boca nas primeiras semanas de vida (BUTLER e BAKER, 1988). Infecções profundas por C.albicans são raras e restritas a pacientes com doenças graves (ODDS, 1987). O aumento de prevalência de candidose

superficial e profunda nas duas últimas décadas, tem sido atribuído à difusão do uso de antibióticos, agentes imunodepressivos, quimioterapia, alimentação parenteral e à prática de procedimentos cirúrgicos invasivos (SAMARANAYAKE, 1986; BUDTZ-JØRGENSEN, 1990b; HEINDAHL e NORD, 1990).

As candidoses bucais estão entre as manifestações mais frequentemente associadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (MONIACI e cols., 1990; EPSTEIN, 1990; RAMIREZ e cols., 1990; SCHIODT e cols., 1990; WRAY e cols.; 1990; LUCATORTO e cols., 1991; SWANGO e cols., 1991). FRANKER e cols. (1990) identificaram C. albicans em 84% dos pacientes aidéticos, sendo que 58% tinham candidose. No Brasil, de acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (AIDS, Tuberculose e infecção pelo HIV, 1989), no período de 1980 a 1989, a candidose foi a doença prevalente nos aidéticos, afetando 32% dos pacientes.

A candidose bucal pode manifestar-se clinicamente em diversas formas, e HOLMSTRUP e AXÉLL (1990) propuseram a seguinte classificação:

- Aguda:
 - Pseudomembranosa
 - Eritematosa
- Crônica:
 - Pseudomembranosa
 - Eritematosa
 - Tipo "placa"
 - Nodular
- Lesões associadas à Candida:
 - Queilite angular
 - Estomatite por prótese
 - Glossite rombóide mediana

A forma pseudomembranosa aguda, aparece com frequência em recém-nascidos e adultos debilitados (FREITAS e BIRMAN, 1989). As lesões geralmente assumem aspecto de placas brancas e cremosas, que podem se estender por toda a mucosa, com localização preferencial na língua, palato e bochechas, atingindo eventualmente gengiva e assoalho da boca (SHAFFER e cols., 1985). Histologicamente, a pseudomembrana constitui-se de tecido necrótico, restos alimentares, leucócitos e bactérias emaranhados e ancorados ao epitélio bucal por leveduras e pseudohifas de C.albicans, que invadem a superfície queratinizada do epitélio. Usualmente a C.albicans não atinge as camadas profundas do epitélio, que entretanto mostram acantose, edema e microabscessos. O conjuntivo apresenta reação inflamatória, com presença de polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990b). Alterações semelhantes são observadas em animais com candidose bucal induzidas experimentalmente (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1973b, 1975).

A candidose eritematosa é particularmente visível no dorso da língua e está geralmente relacionada ao uso de antibióticos, caracterizando-se por áreas avermelhadas, com bordos mal definidos, (HOLMSTRUP e AXELL, 1990). É dolorosa, podendo estender-se às comissuras labiais e à faringe (LEHNER, 1967). No exame histopatológico é semelhante à forma pseudomembranosa, entretanto com menor

quantidade de hifas e infiltrato inflamatório mais intenso no conjuntivo (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990b).

Formas crônicas de candidose (pseudomembranosa e eritematosa) ocorrem frequentemente em pacientes imunodeprimidos ou que utilizam corticosteróides inaláveis. Candidose tipo "placa" e nodular apresentam-se apenas na forma crônica. As lesões em "placa" são caracterizadas pela presença de placas brancas, geralmente firmes e persistentes, envolvidas por eritema, localizando-se preferencialmente no lábio, língua e bochechas. A lesão nodular caracteriza-se pela formação de pápulas ou nódulos (HOLMSTRUP e AXELL, 1990). Histologicamente, as formas crônicas caracterizam-se pela presença de pseudohifas na superfície do epitélio (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990b).

A queilite angular, estomatite por prótese e glossite rombóide mediana são lesões onde C. albicans é frequentemente isolada (TURREL, 1966; DAVENPORT, 1970; MacFARLANE e HELNARSKA, 1976; BUDTZ-JÖRGENSEN e BERTRAN, 1970; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1972 e 1973a; OLSEN, 1974; OLSEN e BIRKELAND, 1976; RENNER e cols., 1978; ARENDORF e WALKER, 1979, 1980a, 1987; WALKER e cols., 1981; WATSON e MacDONALD, 1982; HOLMSTRUP e BESSERMAN, 1983; AMBJÖRNSSEN, 1985; OHMAN e JONTELL, 1988; WILKIESON e cols., 1991). Estas três lesões estão geralmente relacionadas à outras entidades clínicas, possuem etiologia discutida, podendo ser decorrentes da associação entre bactérias e fungos (BUDTZ-JÖRGENSEN e

cols., 1983; GUSBERTI e cols., 1985; CATALAN e cols., 1987; SHIMIZU e cols., 1987; KOOPMANS e cols., 1988; ÖHMAN e JONTELL, 1988; SAMARANAYAKE e cols., 1989; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a).

A estomatite por prótese, é relatada em 11 a 67% dos usuários de prótese total, sendo mais comum na mucosa do palato e em mulheres (ARENDORF e WALKER, 1987). Histologicamente a lesão caracteriza-se por reação inflamatória severa, atrofia e hiperplasia do epitélio (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a), com presença de elementos da resposta imune humoral e celular (JOHANNESSEN e cols., 1986). Áreas inflamadas do palato coradas pelo PAS, frequentemente não demonstram invasão dos tecidos pela Candida (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1974).

A hipótese de que a C. albicans é o fator etiológico da estomatite por prótese total é suportado pela produção de lesões no palato de macacos (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1974 e 1975) e de ratos, após adaptação de placas acrílicas e inoculação da levedura (OLSEN e BONDEVICK, 1978; SHAKIR e cols., 1981). Entretanto, como não foram utilizados animais gnotobióticos nestes modelos, não se pode descartar o envolvimento da microbiota bacteriana.

6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CANDIDOSE

Em 1924, REDAELLI relatou que a inoculação endovenosa de C.albicans resultava em rápida disseminação em preas, ratos e coelhos. A susceptibilidade destes animais, incluindo camundongos e hamsters a C.albicans foi confirmada por vários autores (FUENTES e cols., 1952; ADRIANO e SCHWARZ, 1955; HASENCLEVER, 1959; HURLEY, 1966; ALBANO e SCHMITT, 1973; MARDON e cols., 1975; GIGER e cols., 1978a e b; McMILLAN e COWELL, 1985).

Além de infecção sistêmica pela C.albicans, são também relatados experimentos de candidose cutânea em pele de voluntários (MAIBACH e KLIGMAN, 1962; REBORA e cols., 1973); cães (SCHWARTZMAN e cols., 1965); cobaias (VAN CUTSEN e THIENPORT, 1971); camundongos (RAY e WUEPPER, 1976 e 1978; GIGER e cols., 1978a e b); e, de ratos (RAY e WUEPPER, 1976 e 1978). TASCHDJIAN e cols. (1960) relataram candidose experimental vaginal em ratos. A patogenicidade da C.albicans também foi estudada em membrana cório-alantóide de ovos embrionados (PARTRIDGE e cols., 1971; PUGH e CAWSON, 1977), em cultura de células mucosas de animais (HOWLETT, 1976a e b; HOWLETT e SQUIER, 1980) e em células epiteliais bucais e vaginais humanas "in vitro" (KIMURA e PEARSALL, 1978, 1980; KING e cols., 1980; SOBEL e cols., 1981; SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1981, 1982a e b; MACURA e cols., 1983; HAZEN, 1989; GHANNOUN e cols., 1990).

Infecção na boca de coelho, foi relatada em 1936 por MacKINNON. BALISCH e PHILLIPS (1966 a,b) infectaram galinhas gnotobióticas com C.albicans por via oral. Candidose bucal experimental foi obtida em macacos (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1971a, 1973b e 1975; OLSEN e HAANAES, 1977), ratos (JONES e ADAMS, 1970; ROGERS e BALISH, 1980) e camundongos (PHILLIPS e BALISH, 1966; LACASSE e cols., 1990).

ADAMS e JONES (1971) obtiveram infecção por C.albicans em cavidade bucal de 5 dos 30 ratos inoculados, principalmente na crista gengival, relatando alterações no grau de queratinização do epitélio, com mínimo envolvimento do conjuntivo. RUSSELL e JONES (1973a) observaram que C.albicans persiste na boca de ratos por tempo maior quando da administração de dieta rica em carboidratos, e que sua infectividade é potenciada pela mesma.

Infecção experimental por C.albicans na mucosa da língua, em 55% dos ratos após 22 semanas de inoculações, foram induzidas por JONES e RUSSELL (1974). As formas micelianas não penetraram abaixo do estrato córneo, e estavam associadas com a perda de papilas linguais, presença de epitélio hiperqueratótico, acúmulo de células mononucleares e significativa alteração na camada muscular mais superficial. JONES e cols. (1976), demonstraram histologicamente infecção em 15, 40 e 20% dos ratos em 6, 9

e 12 meses de inoculações semanais de C.albicans, respectivamente.

Lesão na porção mediana do terço posterior do dorso da língua de ratos, com aspectos clínicos e histológicos similares a glossite rombóide mediana foram obtidas por ALLEN e cols. (1982), sugerindo ser o rato, bom modelo experimental para estudo desta lesão.

Após 3 inoculações orais em dias alternados de C.albicans em ratos, FISHER e cols. (1982a), observaram alta incidência inicial de infecção, seguida de rápido declínio, cinco semanas após a primeira inoculação, com penetração de pseudohifas na mucosa bucal de 33% dos animais. Os locais mais frequentes de infecção (98,8% dos achados) foram a gengiva marginal, a mucosa do sulco bucal e lingual e a língua. Para os autores, a alta seletividade de colonização do epitélio é devido as características próprias do mesmo, principalmente a presença e natureza da queratina.

Lesões clinicamente visíveis, foram obtidas por ALLEN e cols.(1988), na língua de 17 ratos, após inoculações de C.albicans durante 20 semanas. Os 17 animais que apresentaram lesões foram divididos em 2 grupos: um grupo com 8 animais recebeu 20 mg/Kg/dia de ketoconazole, por 2 semanas; e, outro grupo com 9 animais não recebeu tratamento. Todas as lesões do grupo tratado regrediram, enquanto no grupo controle apenas 2 animais apresentaram regressão da lesão. Os autores sugerem que as mudanças

epiteliais produzidas pela C.albicans, para o período de tempo observado, são portanto reversíveis.

Aspectos microbiológicos e histológicos de candidose bucal em camundongos foi demonstrado por LACASSE e cols.(1990), após a inoculação de C.albicans; a levedura colonizou a mucosa bucal dos camundongos até 7 dias após a inoculação, sem a necessidade de qualquer outro fator predisponente.

Outro modelo experimental utilizado para estudo de candidose, principalmente da forma crônica (estomatite por prótese total), foi desenvolvido através da adaptação de placa acrílica recobrindo o palato de animais. BUDTZ-JØRGENSEN (1971a) produziu infecção experimental por C.albicans na mucosa do palato de macacos abaixo da placa acrílica, correlacionando a infecção com a transformação de C.albicans da forma de levedura para pseudohifa. Após reinfecção, o autor verificou inflamação mais intensa quando comparada com a lesão primária, fato que salientou como a capacidade da C.albicans em estimular respostas de hipersensibilidade. OLSEN e BONDEVIK (1978), desenvolveram modelo experimental semelhante em ratos, com a adaptação de placa acrílica nos maxilares e inoculações de C.albicans. Após 1 semana de permanência das placas, inflamação generalizada desenvolveu-se no palato da maioria dos animais, a qual foi mais severa e persistente nos ratos que além da placa receberam inoculações de C.albicans.

Com a metodologia proposta por OLSEN e BONDEVIK (1978), porém com as placas acrílicas permanecendo por 4 semanas, SHAKIR e cols.(1981) demonstraram após uma semana, infiltração de células inflamatórias agudas e colonização da superfície da mucosa do palato por leveduras; na segunda semana, a inflamação aumentou, microabscessos foram observados e pseudohifas penetraram na queratina; na quarta semana as alterações foram intensificadas e o epitélio apresentou-se marcadamente hiperplásico, com penetração de pseudohifas. As mudanças histológicas no epitélio foram dependentes da presença da placa acrílica, pois quando a mesma foi removida, as alterações epiteliais se resolviam em duas semanas; entretanto exames microbiológicos da superfície da mucosa revelaram que o microrganismo persistia.

Com o mesmo modelo experimental, SHAKIR e cols.(1983) testaram a habilidade de C.albicans sorotipos A e B, C.tropicalis e Torulopsis glabrata em produzir candidose no palato de rato. C.albicans sorotipo A produziu consistente candidose, enquanto que o sorotipo B somente produziu em 2 dos 5 animais testados, indicando diferença de patogenicidade entre os dois sorotipos. C.tropicalis e T.glabrata não induziram alterações no palato sobre as condições testadas e sua colonização na mucosa como comensal, dependeu da presença da placa acrílica. Após produzir candidose no palato de ratos portadores de placa

acrílica por 2 semanas, SHAKIR e cols. (1986a) verificaram que a remoção das placas resultaram em completa resolução histológica da lesão em 2 semanas, podendo a amostra de C. albicans entretanto, ser recuperada. A recolocação das placas após o período de recuperação, sem subsequente inoculação de C. albicans, produziu o reaparecimento da candidose em 2 semanas.

O número de mitoses no epitélio do palato após adaptação de placas acrílicas, sofre pequeno decréscimo inicial, com posterior aumento mais intenso nos animais infectados por C. albicans (SHAKIR e cols., 1986b). Após 7 dias de permanência da placa acrílica e inoculações de C. albicans, é também observado, aumento significativo no número de células de Langerhans na mucosa do palato de ratos (FRANCIS e FARTHING, 1989).

Nos modelos experimentais, a maioria dos autores usa antibióticos, principalmente tetraciclina, para predisposição dos animais à candidose (RUSSELL e JONES, 1973b; JONES e RUSSELL, 1974; ALLEN e cols., 1982 e 1985; FISHER e cols., 1982a e b; HOLBROOK e cols., 1983; RENNIE e cols., 1983; HASSAN e cols., 1985; ALLEN e BECK, 1983 e 1987); entretanto outros autores obtiveram candidose sem o uso de antibióticos (ADAMS e JONES, 1971; OLSEN e BONDEVIK, 1978; McMILLAN e COWELL, 1985; ALLEN e cols., 1988).

Tratamento tópico prolongado com tetraciclina em macacos, resulta em contínua proliferação de Candida e

sustenta reação inflamatória mais intensa que aquela causada apenas pela C.albicans (BUDTZ-JØRGENSEN, 1971a).

O uso de tetraciclina favorece o estado de portador e a infectividade em ratos gnotobióticos inoculados com C.albicans. Nos animais convencionais o grau de infectividade e a permanência da C.albicans, apesar de menor que para ratos assépticos, apresenta-se maior que para os convencionais que não receberam tratamento com tetraciclina (JONES e cols., 1976).

RUSSELL e cols. (1976), administraram tetraciclina para ratos durante 1 semana e então inocularam C.albicans na boca dos animais. A colonização do fungo, ocorreu na boca dos ratos que continuaram ou não a receber o antibiótico pelas 22 semanas seguintes. O efeito de potencialização na colonização bucal artificial da C.albicans pelo tratamento com tetraciclina, parece agir segundo esses autores, apenas na colonização inicial da levedura.

ALLEN e col. (1985) estudaram a ação da tetraciclina na patogênese da candidose experimental em língua de ratos, não encontrando diferenças estatisticamente significativas na ocorrência de lesões em ratos tratados ou não com o antibiótico, antes das inoculações de C.albicans. Os autores concluíram que a exposição ao antibiótico não é um fator essencial na patogênese da lesão, entretanto, a área da mesma parece estar relacionada ao uso da tetraciclina.

7 XEROSTOMIA

A saliva apresenta muitas funções no trato digestivo, com importante papel na fisiologia orofaríngea, na digestão e na proteção das células gástricas (HERRERA e cols., 1988). Na boca, a saliva participa efetivamente na mastigação, fala, deglutição, sensibilidade gustativa, lubrificação dos tecidos, proteção das mucosas contra a penetração de diversas substâncias, regulação do pH bucal e na formação da placa bacteriana (MANDEL, 1987).

A proteção da saliva manifesta-se no balanço ecológico da boca através de : 1) remoção mecânica de resíduos, inclusive carboidratos; 2) agregação e redução da aderência de microrganismos através de mecanismos imunológicos ou não; 3) atividade antibacteriana, antifúngica e antivirótica; 4) maturação pós-eruptiva do esmalte; 5) regulação do balanço iônico nos processos de remineralização do esmalte; e, 6) deposição da película adquirida e limitação da difusão de ácidos (MANDEL, 1987).

O controle da microbiota pela saliva é dada principalmente pela produção de substâncias antimicrobianas: 1) lisozima, que possui ação na destruição da parede celular das bactérias; 2) lactoperoxidase que inibe a glicólise de *Lactobacilos* e *Streptococos*; 3) lactoferrina que tem ação em microrganismos que utilizam o ferro em seu metabolismo; e, 4) imunoglobulinas, cuja ação contra antígenos de

estreptococos cariogênicos é comprovada (WALLACE e PETRUSNECK, 1985).

Deve-se salientar também o papel da mucina como modulador da microbiota bucal, pois alguns microrganismos possuem receptores específicos para a mesma. A capacidade tampão da saliva, devido a presença de ions bicarbonato e fosfato, podem exercer atividade antimicrobiana (HERRERA e cols., 1988). Polipeptídeos ricos em histidina presentes na saliva da parótida, inibem o crescimento de C.albicans "in vitro", e possivelmente tenham ação também "in vivo" (POLLOCK e cols., 1984). Várias espécies de bactérias bucais são agregadas pela saliva humana (VAN HOUTE, 1983) e pelas glicoproteínas salivares de alto peso molecular (KOOP e cols., 1987).

Alterações clínicas como a Síndrome de Sjögren, uso de medicamentos, radioterapia e algumas doenças sistêmicas produzem xerostomia em humanos (BERTRAM, 1967; GRAD e cols., 1985; HERRERA e cols., 1988; MANDEL, 1990). OSTERBERG e cols. (1984) em estudo com pacientes idosos, salientam que a idade pode predispor à xerostomia, pois dos 1148 pacientes examinados, 16% dos homens e 25% das mulheres demonstraram xerostomia.

A xerostomia pode produzir alterações nos tecidos da boca, como fissuras na língua, mucosas bucais e lábios e maior predisposição à cárie. Pacientes xerostômicos apresentam dificuldade de mastigação, deglutição e fonação,

pois a falta de lubrificação produz adesão do bolo alimentar e da língua às mucosas da boca e às superfícies dos dentes. Em adição, pacientes com prótese total apresentam dificuldades no uso de seus aparelhos, pois na diminuição de saliva, os mesmos produzem traumatismos nas mucosas bucais (HERRERA e cols., 1988). WALLACE e PETRUSNECK (1985), em estudo longitudinal da xerostomia causada por radioterapia, demonstraram que o índice de cárie aumenta na ausência de saliva.

A perda da barreira de proteção proporcionada pela saliva propicia infecções nas mucosas da boca, incluindo infecções por fungos que são sintomáticas e de difícil tratamento (EPSTEIN e cols., 1983). Pacientes com xerostomia, após radiações na cabeça e pescoço, apresentam alterações da microbiota bucal, com aumento pronunciado no número de Streptococcus mutans, Lactobacillus e Candida, com diminuição paralela nas contagens de S. sanguis, Neisseria e Fusobacterium (BROWN e cols., 1975).

A xerostomia assume, entre os fatores locais predisponentes às candidoses, particular importância, uma vez que os mecanismos de primeira linha, ficam bloqueados. A lisozima e a lactoferrina existentes na saliva são capazes de inibir o crescimento de C. albicans "in vitro" (FONSECA, 1980; TOBGI e cols., 1988). Títulos elevados de anticorpos anti-Candida, especialmente IgA, são encontrados em pacientes com manifestações bucais da candidose. (LEHNER,

1967; UNTERKIRCHER, 1980; UNTERKIRCHER e cols., 1983). Além disso, foi demonstrado presença de leucócitos com atividade anti-Candida na saliva (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1974).

A oclusão dos ductos das glândulas salivares menores presentes na área recoberta pela placa protética e a diminuição de fluxo salivar nesta região, provavelmente desempenham importante papel na etiologia das estomatites por prótese total (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1974).

Os efeitos da xerostomia são também estudados em modelos experimentais. CHEYNE (1939), descreveu as glândulas salivares maiores de ratos e a técnica de remoção cirúrgica, salientando ser este animal um bom modelo experimental para estudo dos efeitos da saliva nos tecidos bucais.

Maior atividade de cárie é relatada em hamster e ratos sialoadenectomizados por diversos autores (GILDA e KEYS, 1947; SHAW e WEISBERGER, 1949; KLAPPER e VOLKER, 1953; MUHLER e SHAFER, 1954; SCHWARTZ e SHAW, 1955; STEINMAN e cols., 1980; ITO, 1990). EDGAR e cols. (1981) demonstraram rápida destruição de dentes de macacos pela cárie, após irradiação das glândulas salivares, semelhante àquela observada em humanos. Os autores sugerem que tal destruição é devida principalmente a redução na quantidade de saliva.

BOWEN e cols. (1988b), inocularam Streptococcus mutans e Actinomyces viscosus e administraram dieta cariogênica para ratos sialoadenectomizados. Os autores observaram

desenvolvimento mais rápido de lesões de cárie nos animais após cirurgia, que em animais normais: cárie coronária em 2 semanas; e, cárie de raiz e reabsorção óssea alveolar após 3 a 4 semanas. S.mutans e A.viscosus estabeleceram-se prontamente em todos os animais xerostômicos, entretanto, a população destes microrganismos foi decrescendo com o desenvolvimento do experimento, devido possivelmente, segundo os autores, pela acidificação do pH.

Flora acidogênica, com alta virulência (incluindo S.sobrinus) é selecionada em ratos sialoadenectomizados, sendo transmitida mais rapidamente quando animais xerostômicos são colocados nas mesmas gaiolas com normais, os quais passam a desenvolver maiores níveis de cáries de superfícies lisas (BOWEN e cols., 1988a). ITO (1990), não verificou qualquer modificação na mucosa bucal de ratos sialoadenectomizados, porém observou maior incidência de cáries e diminuição na placa bacteriana nos dentes incisivos destes animais, em relação aos controles.

O papel da saliva na adesão das leveduras ao epitélio é, entretanto, ainda muito discutida. A aderência de C.albicans parece ser mediada por componentes específicos da saliva e do soro (YOON e cols., 1989). Leveduras pré-incubadas em saliva apresentam maior adesividade a células HeLa, células epiteliais renais embrionárias humanas (SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1982a) e a células epiteliais bucais humanas (KIMURA e PEARSALE, 1978). Por outro lado, a

presença de IgA na saliva tende a inibir a adesão de C.albicans às células epiteliais bucais (EPSTEIN e cols., 1982; VUDHICHAMNOG e cols., 1982). O pré-tratamento de peças acrílicas em saliva mista não estimulada, por 30 minutos, reduziu a adesão de C.albicans "in vitro" (McCOURTIE e cols., 1986b). A lisozima da saliva é capaz de inibir crescimento de C.albicans "in vitro" (TOBGY e cols., 1988).

Poucos trabalhos da literatura relatam os efeitos da xerostomia no desenvolvimento de candidose em animais. JONES e ADANS (1970) demonstraram candidose induzida por inoculações bucais de C.albicans em ratos tratados com "hyoscine" para reduzir a salivagem. Não houve alteração da frequência de infecção em relação aos controles. OLSEN e HAANAES (1977) inseriram placas acrílicas maxilares, inoculadas com C.albicans, em macacos e reduziram o fluxo salivar com injeções intramusculares de "oxyphencyclineine", 2 vezes ao dia durante 3 semanas. Após 1 semana ocorreram lesões mais extensas com regressão mais lenta no palato dos animais com fluxo salivar diminuído.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1 ANIMAIS

Foram utilizados 381 ratos (Rattus norvegicus, Albinus, Wistar), machos, com peso inicial de 170-200 gramas, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, os quais foram alimentados com ração Labina (Purina) e água "ad libitum". Dos 381 ratos, 65 eram portadores de leveduras do gênero Candida na boca, e não foram usados posteriormente. Os 316 restantes foram divididos nos grupos constantes da tabela 1.

Tabela 1 - Número de ratos normais e sialoadenectomizados usados neste trabalho, de acordo com os experimentos realizados.

GRUPOS	R A T O S		
	NORMAIS	SIALOADE- NECTOMIZADOS	TOTAL
QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA	10	10	20
PERSISTÊNCIA <u>C. albicans</u> NA BOCA ..	6	6	12
APLICAÇÃO DE <u>C. albicans</u> COM "SWAB" NA LÍNGUA	55	55	110
INDUÇÃO PROLONGADA DE <u>C. albicans</u> NA BOCA	10	10	20
INDUÇÃO DE <u>C. albicans</u> EM RATOS PORTADORES DE PLACA ACRÍLICA NO PALATO	24	24	48
CANDIDOSE NO DORSO DA LÍNGUA			
- Microscopia de luz	50	50	100
- Microscopia eletrônica	3	3	6
TOTAL	158	158	316

2 PRESENÇA DE Candida albicans NA BOCA DE RATOS NORMAIS

Inicialmente foi determinada a presença ou ausência do gênero Candida e da espécie C.albicans nos 381 ratos utilizados neste trabalho. Material coletado, com um "mini-swab" esterilizado, do palato e do dorso da língua dos ratos, foi imediatamente semeado em placas com Agar Sabouraud dextrose (Difco), adicionado de 0,1 mg de cloranfenicol (Quemicetina Succinato, Carlo Erba) por ml de meio. As placas foram incubadas a 37°C durante 2 a 7 dias, e naquelas que cresceram colônias esféricas, branco-foscas, com aparência de porcelana, 4 a 8 mm de diâmetro e odor característico, foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram. Quando na microscopia, foram observadas células ovaladas, grandes, Gram-positivas, com ou sem brotamento, com aspecto de Candida, as colônias eram transferidas para tubos contendo Agar Sabouraud dextrose para posterior identificação. Foram considerados positivos para leveduras, àqueles animais que forneceram colônias características, as quais foram confirmadas morfológicamente em esfregaços corados pelo Gram.

Para caracterização das amostras foram realizadas três provas, de acordo com SANDVEN (1990):

2.1 Formação de tubo germinativo:

Para observação da formação de tubo germinativo adicionou-se uma alça de cultura pura de 24 horas de levedura em tubo de ensaio (13 X 17 mm) contendo 0,5 ml de soro estéril de coelho, o qual foi colocado em banho-maria a 37°C, por 3 horas. A formação de tubo germinativo foi observada em microscopia de luz, colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e laminula.

2.2 Produção de clamidósporo:

Para verificação da produção de clamidósporo foi utilizado o meio ágar-fubã tween 80 (pH 5.6), com a seguinte constituição:

Fubã	40 g
Agar (Difco).....	20 g
Tween 80	10 ml
Água destilada	1000 ml

O fubã foi dissolvido em 800 ml de água destilada, aquecido em banho-maria durante 1 hora, filtrado (Filtro Whatman, nº 40) e deixado em repouso para decantação. O ágar foi fundido separadamente em 200 ml de água destilada e adicionado o tween 80 e o filtrado de fubã. Após distribuição em Erlenmeyer de 50 ml, o meio foi autoclavado a 120°C/15 minutos e armazenado em geladeira.

Para execução da prova, o ágar-fubã previamente fundido, foi distribuído em lâminas usadas para preparados

histológicos, depositadas sobre bastão de vidro em "U", colocados no interior de placas de Petri esterilizadas. Após solidificação do agar, cada amostra de levedura a ser testada foi semeada em estria única, na superfície do meio e colocada uma laminula no centro da lâmina. Para evitar dessecação, foi adicionado um pedaço de papel de filtro esterilizado e umedecido no fundo da placa. Após incubação por 48 a 72 horas à temperatura ambiente, a leitura foi feita em microscopia de luz, considerando-se positivas quando da presença dos clamidósporos.

2.3 Fermentação de açúcares:

Na fermentação de açúcares foi usado caldo vermelho de fenol (Difco) distribuído em tubos de ensaio, com tubos de Duhran em seu interior e autoclavados a 120°C/15 minutos. Cada açúcar (glicose, maltose, sacarose e lactose), esterilizado por filtração (filtro Millipore, GSWP-02500), foi adicionado de forma a obter concentração de 1%. Os tubos foram semeados a partir de uma cultura pura de 24 horas da levedura em Agar Sabouraud dextrose, e a leitura feita após 48 e 72 horas.

2.4 Interpretação das provas:

As amostras foram consideradas como de C. albicans quando houve formação de tubo germinativo em soro estéril de coelho; presença de clamidósporos em Agar-fubá tween 80;

produção de ácido a partir da sacarose; produção de ácido e gás a partir da glicose e maltose e não fermentação da lactose.

Quando as amostras não produziram clamidósporos em Ágar fubá tween 80, porém formavam hifas e/ou pseudohifas e blastoconídeos, mas não produziam artroconídeos, foram considerados Candida sp.

Como citado anteriormente, os 65 ratos positivos para leveduras do gênero Candida não foram usados posteriormente neste trabalho.

3 SIALOADENECTOMIA, QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA E PREPARO DA SUSPENSÃO DE Candida albicans

3.1 Sialoadenectomia:

A sialoadenectomia foi provocada retirando-se cirurgicamente as glândulas salivares parótida, submandibular e sublingual pela técnica de CHEYNE (1939), modificada. Os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de 45 mg/kg de peso corporal de Thionembutal (Abbott). Após tricotomia da região cervical e antissepsia com álcool-iodado, foi feita incisão na pele na porção cervical mediana, e o tecido subjacente dissecado, preservando-se os grandes vasos. Inicialmente foi exposta a glândula parótida, que se estende da região massetérica até a altura da clavícula, apresentando seu maior eixo na direção céfalo-caudal, que foi retirada divulsionando-se o tecido com pequenas pinças. Posteriormente, as glândulas submandibulares e sublinguais foram expostas simultaneamente, visto que formam uma massa única facilmente distinguida dos linfonodos adjacentes. As glândulas foram removidas cortando-se os ductos e vasos, após prévia ligadura com fio de seda.

Após a sialoadenectomia, a verificação da presença de Candida foi repetida imediatamente antes do uso do animal nos experimentos, para verificar se a cirurgia não propiciou o desenvolvimento da levedura.

3.2 Quantificação de saliva:

A quantificação de saliva foi feita em 10 ratos normais e 10 sialoadenectomizados após 10, 50 e 120 dias da cirurgia. Os animais foram anestesiados com Thionembutal, como já descrito, posicionados ventralmente num suporte, e a saliva presente foi removida com algodão e pinça, e descartada. Em seguida, foram posicionadas 4 "bolinhas" de algodão, previamente pesadas, no dorso da língua, no assoalho da boca e em contato com as bochechas esquerda e direita. Depois de 15 minutos, as quatro "bolinhas" foram retiradas e pesadas novamente. As diferenças de peso encontradas nas 4 "bolinhas", antes e após a coleta de saliva, foram somadas, obtendo-se assim a quantidade de saliva produzida durante 15 minutos. Após a primeira quantificação, os animais foram injetados intraperitonealmente com 8 mg/Kg de peso corporal de pilocarpina (BERNADE e cols., 1956) e a saliva quantificada novamente pelo mesmo método.

3.3 Preparo da suspensão de Candida albicans:

Foi utilizada a amostra F-72 de C. albicans, isolada de paciente que apresentava estomatite por prótese total. Esta amostra apresentou alta letalidade para camundongos e é produtora de proteinase, hialuronidase, condroitin-sulfatase e fosfatase (SHIMIZU, 1990).

Para obtenção da suspensão com número conhecido de microrganismos, a amostra foi semeada em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 37°C por 48 horas. O crescimento foi suspenso em 5 ml de solução fisiológica esterilizada e centrifugado a 2000 rotações por minuto (r.p.m.), durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais uma vez, e o sedimento foi então ressuspenso em 5 ml de solução fisiológica esterilizada.

A contagem do número de células viáveis da suspensão foi feita em câmara de Neubauer, após prévia coloração com azul de metileno a 0,05% (REED e cols., 1990). A suspensão foi padronizada de forma a obter-se aproximadamente 5×10^6 células viáveis/ml.

Com o objetivo de se confirmar o número de leveduras viáveis que foram inoculadas nos animais, a suspensão foi diluída em solução fisiológica esterilizada (10^{-1} a 10^{-6}) e, 0,1 ml de cada diluição foi semeado, em duplicata, na superfície de ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e as colônias contadas, escolhendo-se as placas que continham de 30 a 300 colônias. Foram realizadas contagens em 50 das suspensões usadas, obtendo-se média de $5,71 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml) de C. albicans, com desvio padrão de 3,64.

4 PERSISTÊNCIA DE Candida albicans NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Foram usados 6 ratos normais e 6 sialoadenectomizados, que receberam inicialmente, durante 7 dias consecutivos, 0,1mg/ml de cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer) na água de beber. No oitavo dia, foi feito o primeiro inóculo, colocando-se 0,2 ml da suspensão contendo 10^8 células viáveis de C. albicans na boca dos animais não anestesiados, com auxílio de seringa de 1 ml e agulha 30XB. A concentração do antibiótico na água passou então a ser de 0,01mg/ml até o final do experimento. Foram feitas mais 2 inoculações da levedura no 9º e 10º dias, e após 24 horas do último inóculo, foram coletadas amostras das bocas dos animais com um "mini-swab" de aproximadamente 4 mm de diâmetro, girando-se o mesmo na boca dos animais durante 60 segundos, procurando-se preferencialmente coletar material da língua e palato. O "mini-swab" foi imediatamente colocado em tubo contendo 0,95 ml de solução fisiológica esterilizada e o mesmo foi agitado durante 2 minutos, considerando-se a diluição como sendo 10^{-2} . Foram realizadas diluições até 10^{-4} e 0,1 ml de cada diluição foi semeada em duplicata, na superfície de Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e as placas incubadas a 37°C durante 48 horas. As colônias com características de Candida foram contadas nas placas que continham de 30 a 300

colônias. Placas com número de colônias inferior a 30 na diluição 10^{-2} foram consideradas como 10^1 células de Candida.

Foram realizadas coletas e contagens em ratos normais e xialoadenectomizados após 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112, 119 e 126 dias da última inoculação. A cada tempo, foram escolhidos aleatoriamente uma placa com colônias características de Candida de um animal normal e de um xerostômico para obtenção de culturas puras e confirmação da recuperação de C. albicans.

5 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS

Para facilitar a leitura dos próximos itens, as metodologias utilizadas para as observações macroscópicas e microscópicas são descritas a seguir:

5.1 Macroscopia:

As observações e documentações macroscópicas foram feitas com auxílio de lupa estereoscópica (Zeiss), com aumentos de 10 e 15X.

5.2 Microscopia de luz:

Para observações em microscópio de luz, a língua e/ou o palato foram fixados em formol a 10% por 24 horas. As peças foram seccionadas no sentido sagital, sendo a língua dividida em 4 e o palato em 2 porções. Após inclusão em parafina, os cortes de 7 μ m foram corados em HE e pelas técnicas do PASH, Gram para tecidos e Gomori-Grocott. De cada animal foram obtidos 16 cortes da língua e 8 do palato. As documentações foram feitas num fotomicroscópio (Zeiss) da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

5.3 Microscopia eletrônica:

Para observações em microscopia eletrônica, os espécimes foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato pH 7.4, por 6 horas a 4°C, pós fixados em tetróxido de ôsmio por 2 horas a 4°C e incluídos em araldite. Os cortes semifinos foram corados com azul de metileno a 1% e os ultrafinos com acetato de uranila e citrato de chumbo. As observações foram feitas num microscópio Zeiss EM-10 da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

5.4 Morfologia de Candida albicans "in vitro":

Foram feitas observações de C. albicans, amostra F72, cultivada em Ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 24 horas, para comparação com sua morfologia, quando presentes na superfície ou no interior dos tecidos.

As observações em microscopia de luz foram realizadas em esfregaços corados pelo Gram e pelo azul de metileno. Nos esfregaços não corados, usou-se a técnica de contraste de fase.

Uma colônia isolada foi retirada juntamente com o Ágar ao seu redor, e o material processado para microscopia eletrônica.

6 APLICAÇÃO DE Candida albicans COM "SWAB" NA
LÍNGUA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Cinquenta ratos normais e 50 sialoadenectomizados receberam inóculo contendo 10^6 células viáveis de C. albicans em 3 dias consecutivos. O inóculo foi feito colocando-se 0,2 ml da suspensão de C. albicans na boca dos animais anestesiados com éter etílico, com auxílio de seringa de 1 ml e agulha 30x8. Imediatamente após a inoculação, o material foi espalhado uniformemente pela mucosa do dorso da língua, com auxílio de um "mini-swab" previamente esterilizado que foi embebido na suspensão. Cinco ratos normais e 5 sialoadenectomizados foram sacrificados por deslocamento cervical após 1, 2, 4, 6, 8, 12 horas e 1, 2, 7 e 15 dias após a última inoculação. As línguas foram retiradas, observadas macroscopicamente, fixadas em formol a 10% por 24 horas e incluídas em parafina. Foram também utilizados 5 animais controles e 5 sialoadenectomizados, que não receberam inoculações de C. albicans (os mesmos usados no item 9).

7 INOCULAÇÃO PROLONGADA DE Candida albicans NA
BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Foram usados 10 ratos normais e 10 sialoadenectomizados, que receberam durante 7 dias, 0,1mg/ml de cloridrato de tetraciclina na água de beber. No oitavo dia, receberam a primeira inoculação de C.albicans (como no item 4) e a dosagem de antibiótico na água passou a ser de 0,01mg/ml até o final do experimento.

Posteriormente, os animais receberam 3 inoculações semanais em dias alternados (segunda, quarta e sexta-feira) de suspensão contendo 10^8 células de C.albicans durante 32 semanas. Após 24 horas da última inoculação, os ratos foram sacrificados, a língua e o palato retirados e processados para observações microscópicas.

B INOCULAÇÃO DE Candida albicans EM RATOS
PORTADORES DE PLACA ACRILICA NO PALATO

B.1 Confeção e adaptação das placas acrílicas:

As placas foram confeccionadas em resina acrílica de ortodontia (Jet-Clássico) sobre o palato de um rato fixado em formol a 10% com peso igual aos usados no experimento, como descrito por OLSEN e BONDEVIK (1978). As placas recobriam o palato desde a distal dos terceiros molares até os incisivos, que tinham a região cervical totalmente envolvida pela resina. Após a polimerização, as placas foram retiradas, receberam acabamento com pedra-montada e foram polidas com escova de Robson, taça de borracha e pedra-pomes (Fig.1). Para adaptação das placas acrílicas, os animais foram anestesiados com Thionembutal; as placas posicionadas no palato e nos incisivos, e reembasadas no palato com a mesma resina. Após novo polimento, foi feito um sulco na região palatina dos incisivos superiores dos animais, com broca carbide cilíndrica fissurada (nº1), para aumentar a retenção, e as placas cimentadas com a mesma resina, ao redor dos incisivos.

Durante 25 dias os animais foram alimentados com ração triturada e umidecida, de consistência pastosa. Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e a placa acrílica removida. Após observações macroscópicas, os palatos foram fixados em formol a 10% por 24 horas, e processados para observações microscópicas.

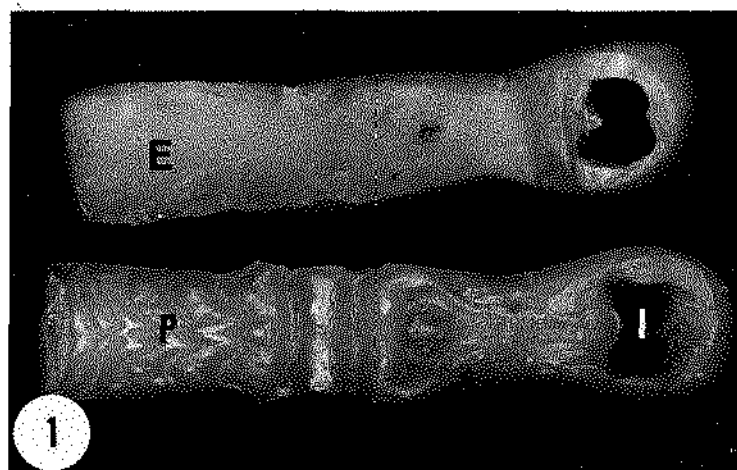


Fig. 1 - Placa de resina acrílica adaptada no palato de rato, feita de acordo com OLSEN e BONDEVICK (1978).
 P: superfície interna da placa em contato com o palato.
 E: superfície externa da placa.
 I: espaço que envolvia os incisivos superiores.
 Aumento: 4X.

8.2 Grupos de animais:

Placas acrílicas foram colocadas 10 dias após a sialoadenectomia, sendo a primeira inoculação de C.albicans feita imediatamente após a adaptação da placa no palato, e a seguir mais 2 inoculações em dias seguidos. Os ratos foram sacrificados 25 dias após a primeira inoculação de C.albicans, colocação da placa, ou ambos. Foram utilizados 48 ratos divididos em 6 grupos de 8, que receberam os seguintes tratamentos: a) apenas C.albicans; b) apenas placa acrílica; c) placa acrílica e C.albicans; d) sialoadenectomia e C.albicans; e) sialoadenectomia e placa acrílica; e, f) sialoadenectomia, placa acrílica e C.albicans.

9 CANDIDOSE NO DORSO DA LINGUA DE RATOS
NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Foram usados 50 ratos normais e 50 sialoadenectomizados que receberam injeções intraepiteliais de cerca de 25 μ l de suspensão contendo 10^6 células viáveis de C.albicans/ml. Após anestesia com éter etílico, 8 injeções foram feitas com auxílio de seringa de 1 ml e agulha 13X3,8 esterilizada, na região central do dorso da língua, imediatamente anterior às papilas gigantes e duas na região do tubérculo intermolar. Grupos com 5 ratos normais e 5 sialoadenectomizados foram sacrificados por deslocamento cervical após 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas, e 1, 2, 7 e 15 dias após as injeções. As línguas foram retiradas, observadas macroscopicamente, fixadas em formol a 10% por 24 horas e processadas em parafina. Foram utilizados para microscopia eletrônica, 3 ratos normais e 3 sialoadenectomizados após 1, 4 e 24 horas da inoculação. Foram também utilizados 5 animais controles e 5 sialoadenectomizados, que não receberam inoculações de C.albicans (mesmos controles usados no item 6).

10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do teste "t" de Student, para comparação entre duas médias, sendo fixado o nível de significância em 5 % (VIEIRA, 1983).

RESULTADOS

RESULTADOS

1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA LÍNGUA E DO PALATO DE RATOS NORMAIS

1.1 Língua:

A língua do rato é um órgão muscular revestido por epitélio queratinizado, formado de uma região superior, o dorso, e uma inferior, o ventre. O dorso apresenta uma porção bucal que se estende desde a ponta da língua até a papila valada e uma porção faríngea, posteriormente a esta papila. A porção bucal do dorso da língua divide-se em duas partes: os 2/3 anteriores que apresentam sulco mediano na direção do longo eixo, e o tubérculo intermolar que corresponde ao terço posterior (Fig.2).

O dorso da língua é revestido por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, formando interdigitações com o conjuntivo subjacente. Estão presentes projeções, as papilas filiformes, classificadas em três tipos: cônicas simples, nos 2/3 anteriores; verdadeiras, no tubérculo intermolar; e gigantes, na região que separa as cônicas simples das verdadeiras (Fig.3). Nos 2/3 anteriores estão presentes algumas papilas fungiformes. A porção faríngea e o ventre da língua são destituídos de papilas.

O ventre da língua é revestido por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado e conjuntivo rico em vasos sanguíneos e linfáticos. O epitélio apresenta camada basal formando poucas interdigitações com o conjuntivo, camada granulosa bem desenvolvida e camada de queratina plana e homogênea, sem evidências de bactérias aderidas à superfície (Fig.4).

Abaixo do conjuntivo subepitelial a língua é formada por músculo estriado, cujas fibras se encontram agrupadas em feixes dispostos em 3 planos, entrecortadas por conjuntivo rico em mastócitos. Abaixo da mucosa, no tubérculo intermolar, estão presentes glândulas salivares serosas e mucosas entre as fibras musculares.

As papilas filiformes apresentam duas superfícies; anterior que é convexa nas papilas cônicas simples e nas verdadeiras, porém concava nas gigantes; e posterior que é concava nas simples (Fig.5A) e verdadeiras (Fig.6A), e convexa na gigantes (Fig.7A). As papilas verdadeiras estão muito próximas uma das outras, com pouca superfície interpapilar entre elas. Ao contrário, as papilas cônicas simples estão distantes umas das outras com bastante superfície interpapilar. Isto pode ser observado não só na superfície do epitélio, como também no limite epitélio-conjuntivo.

A colonização de bactérias no dorso da língua ocorre na superfície convexa das papilas filiformes, geralmente não

ocorrendo nas superfícies concavas, regiões interpapilares e papilas fungiformes. As bactérias apresentam-se em várias camadas, predominantemente na forma de cocos, e em maior quantidade nas papilas verdadeiras (Figs.5B, 6B, 7B).

1.2 Palato duro:

O palato duro é formado de 4 porções distintas: Átrio bucal e regiões pré-molar, intermolar e retromolar (Fig.8). É revestido por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado.

O Átrio bucal se estende desde os incisivos até a porção posterior da papila incisiva, apresentando uma saliência em sua região central. O Átrio apresenta feixes de fibras musculares abaixo da lâmina própria, a qual é contínua com o periosteio nas demais regiões (Fig.9).

A região pré-molar ocupa a área anterior aos dentes molares, caracterizando-se pela presença da papila palatina e mais 2 rugas transversais (Fig.10). O Átrio e a região pré-molar fazem oposição às papilas cônicas simples e fungiformes da língua.

A região intermolar, entre os dentes molares, caracteriza-se pela presença de 5 rugas, sendo as 3 primeiras em forma de "M" e as 2 posteriores em forma de "V" com vértice para a região anterior da boca. Nesta região, o epitélio queratinizado é aderido ao osso pelo conjuntivo

subjacente (Fig.11). A região intermolar fica em oposição ao tubérculo intermolar da língua.

A região retromolar corresponde a uma concavidade, desde a última ruga palatina até a ponte transversal terminal. Constituída de numerosas papilas, esta região está em oposição às papilas filiformes verdadeiras da língua. A ponte transversal terminal apresenta epitélio com camada granulosa pronunciada e separa o palato duro do palato mole, estando em oposição à papila valada e aos botões gustativos da língua (Fig.12).

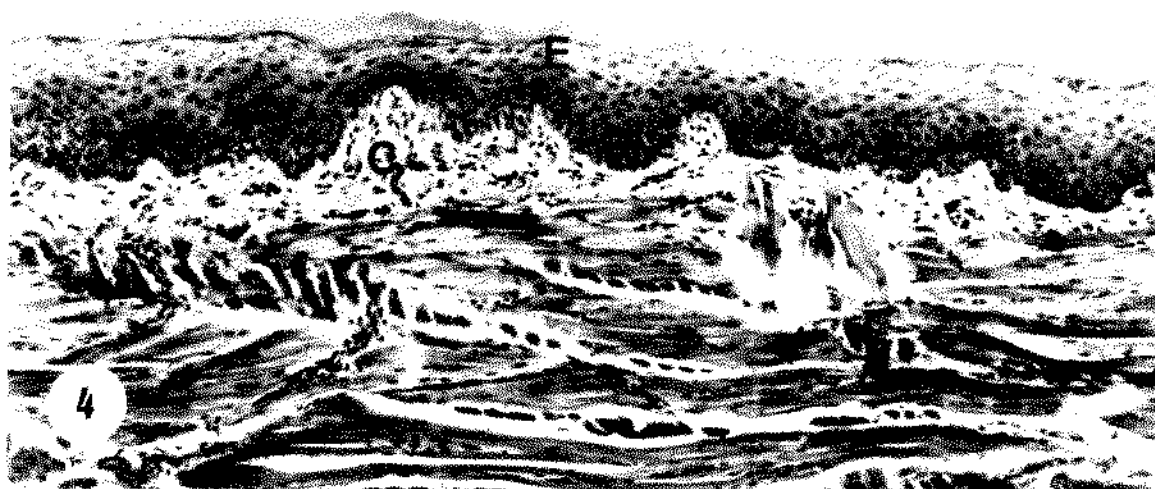
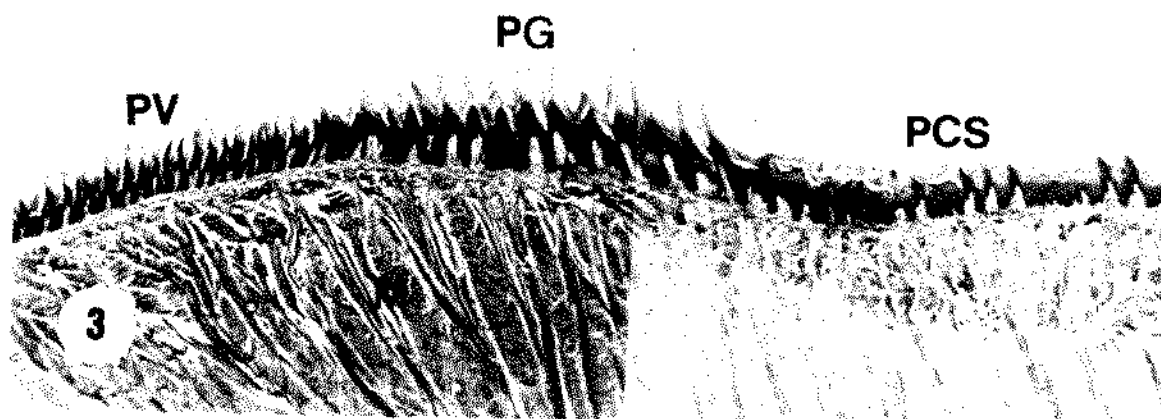
1.3 Palato mole:

O palato mole inicia-se na ponte transversal terminal e termina no hiato nasofaríngeo. Lateralmente está em continuidade com a bochecha e as paredes laterais da faringe. O palato mole é revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com delgada camada de conjuntivo separando o epitélio dos ácinos glandulares serosos (Fig.13). O rato não possui úvula, pilares ou amígdalas.

Fig. 2 - Aspecto macroscópico do dorso da língua de rato normal. A papila valada (seta) separa a porção faríngea (F) da bucal, e a região das papilas gigantes (PG), separa os 2/3 anteriores da porção bucal do tubérculo intermolar (TI).
Aumento: 4,5X.

Fig. 3 - Corte sagital do dorso da língua de rato normal. As papilas gigantes (PG) separam as papilas cônicas simples (PCS) das filiformes verdadeiras (PV). O conjuntivo, nas regiões interpapilares, segue o padrão morfológico da superfície, ou seja, onde há papila o conjuntivo projeta-se mais superficialmente. Abaixo do conjuntivo subepitelial (*) a língua é formada por tecido muscular estriado (M).
Coloração: HE; aumento: 25X.

Fig. 4 - Corte sagital do ventre da língua de rato normal. O epitélio (E) não forma papilas, apresentando camada basal com poucas interdigitações com o conjuntivo (C).
Coloração HE; aumento: 110X.



Figs. 5A e 5B - Corte sagital da região anterior da língua de rato normal mostrando na figura 5A as papilas cônicas simples (S) e uma papila fungiforme (F). Na figura 5B observa-se as papilas cônicas simples com bactérias (setas) aderidas na sua face anterior (convexa).

Fig. 5A - Coloração: HE; aumento: 80X.

Fig. 5B - Coloração: Gram; aumento 200X.

Fig. 6A e 6B - Corte sagital do dorso da língua de rato normal, mostrando na figura 6A as papilas gigantes (G). Na figura 6B observa-se as papilas gigantes com bactérias (setas) aderidas na sua face posterior (convexa).

Fig. 6A - Coloração: HE; aumento: 80X.

Fig. 6B - Coloração: Gram; aumento: 200X.

Fig. 7A e 7B - Corte sagital do dorso da língua de rato normal mostrando na figura 7A as papilas verdadeiras (V). Na figura 7B observa-se papilas verdadeiras com bactérias (setas) aderidas na sua face anterior (convexa).

Fig. 7A - Coloração: HE; aumento: 80X.

Fig. 7B - Coloração: Gram; aumento: 200X.

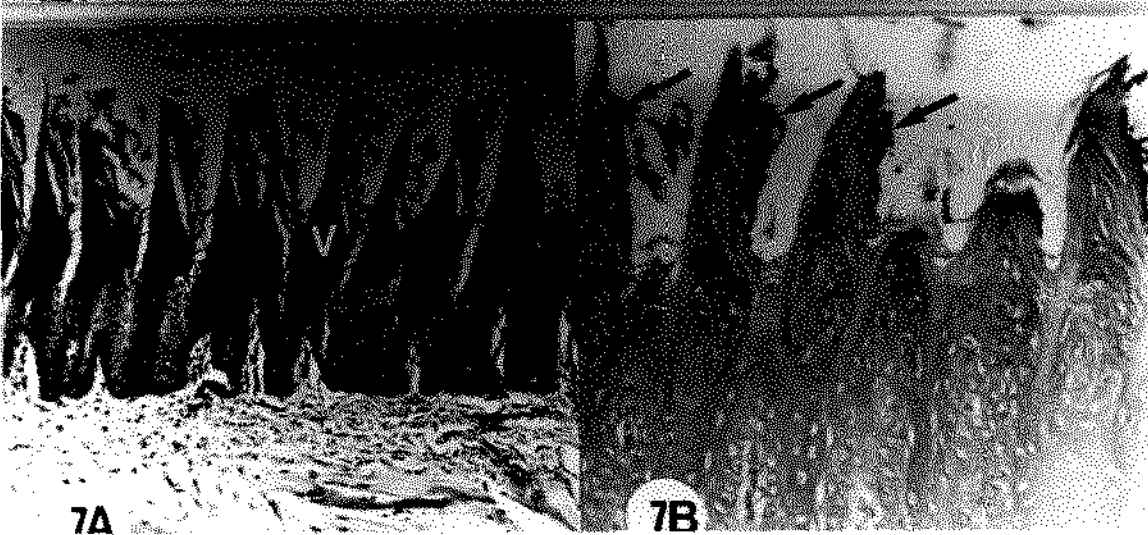
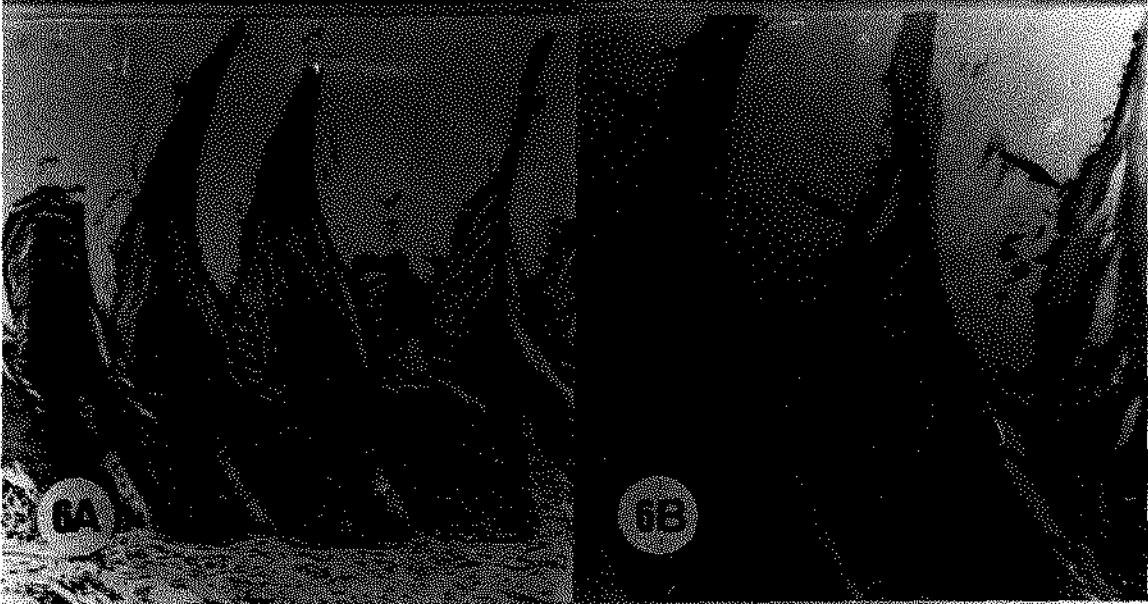
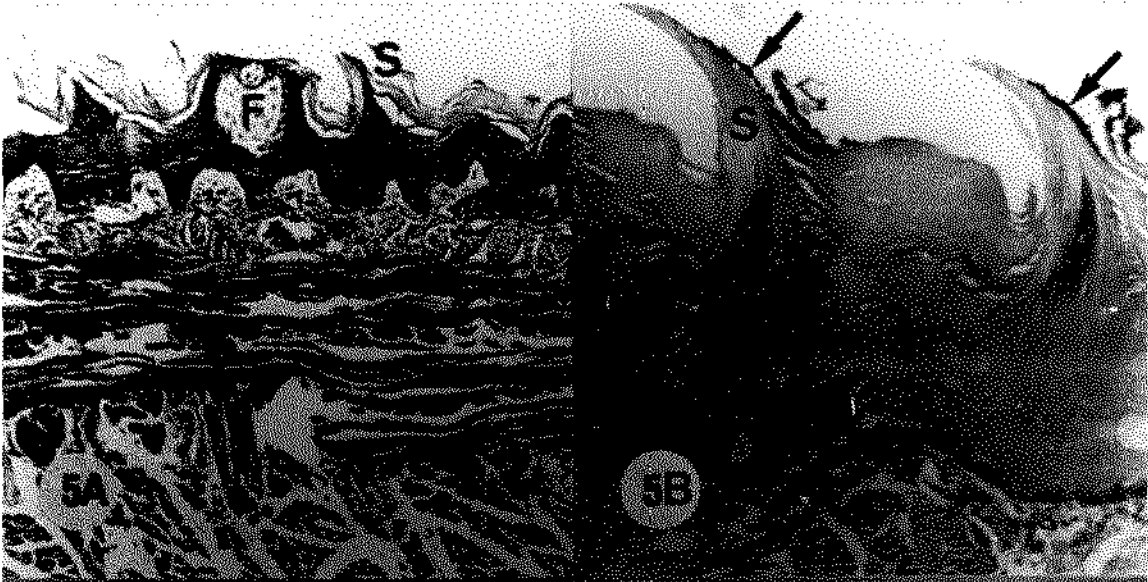


Fig. 8 - Aspecto macroscópico do palato de rato normal. O palato é dividido em: Atrio (A), desde os incisivos até a papila palatina (seta ); região prêmolar (P), da papila palatina até o início dos molares; região intermolar (I), entre os molares; região retromolar (*), desde a última ruga palatina até a ponte transversal terminal. A ponte transversal terminal (seta ) separa o palato duro do palato mole (M).
Aumento: 3,0X.

Fig. 9 - Corte sagital do Atrio do palato de rato normal. O conjuntivo (C) separa o epitélio (E) das fibras musculares (M).
Coloração HE; aumento: 80X.

Fig. 10 - Corte sagital da região prêmolar do palato duro de rato normal, mostrando uma ruga palatina transversal. O conjuntivo (C) contendo vasos (*) situa-se entre o epitélio (E) e o osso (O).
Coloração: HE; aumento: 80X.

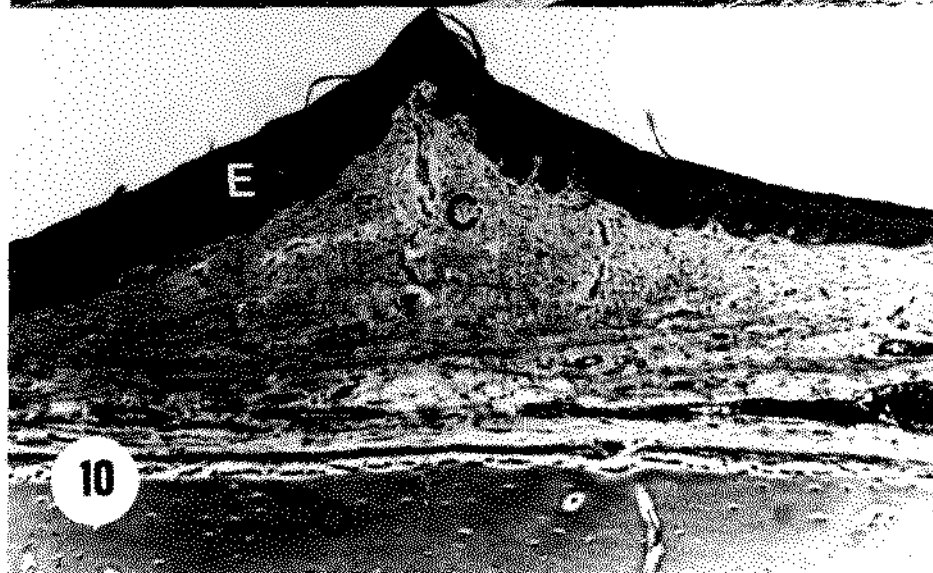
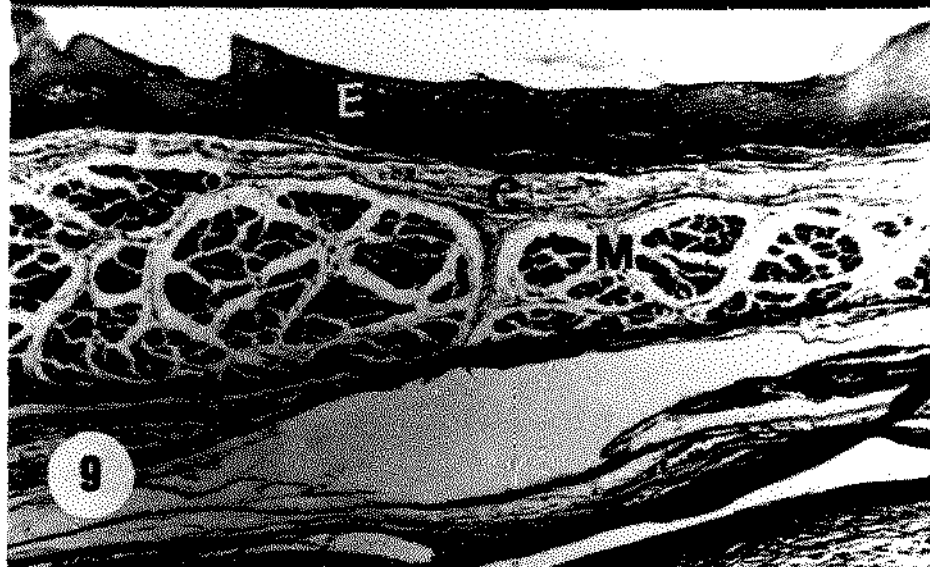
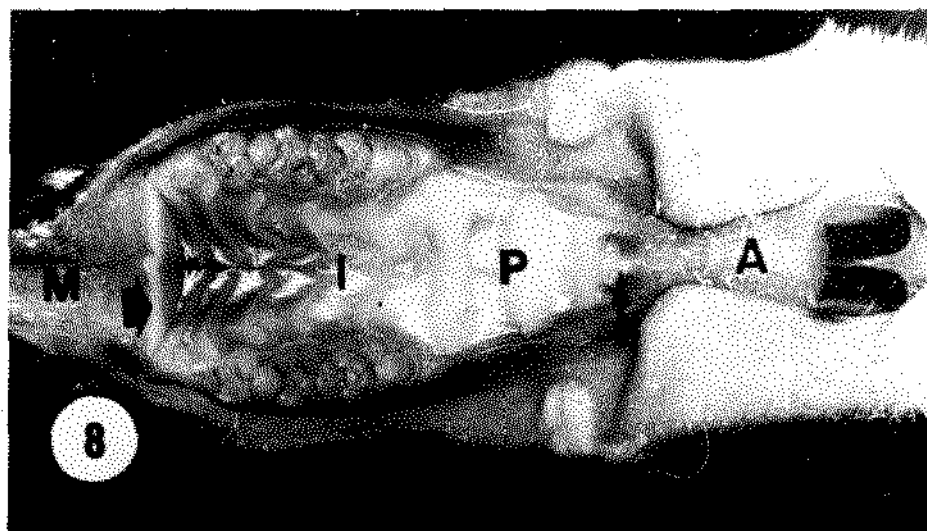
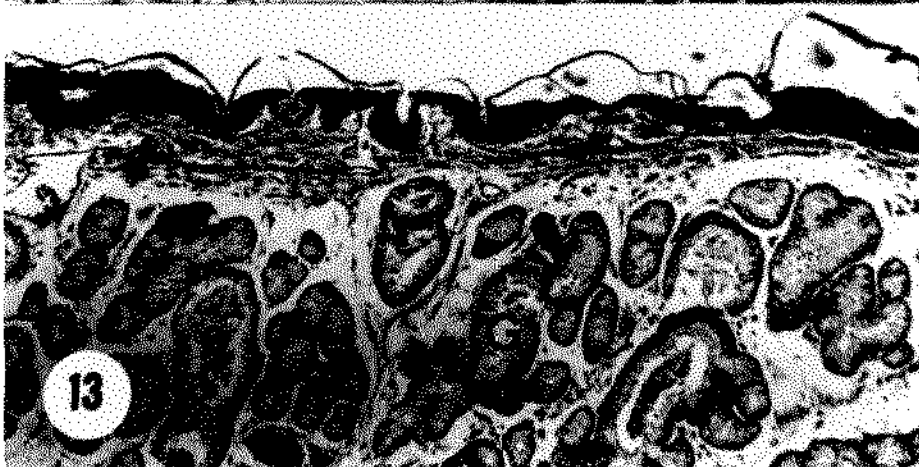
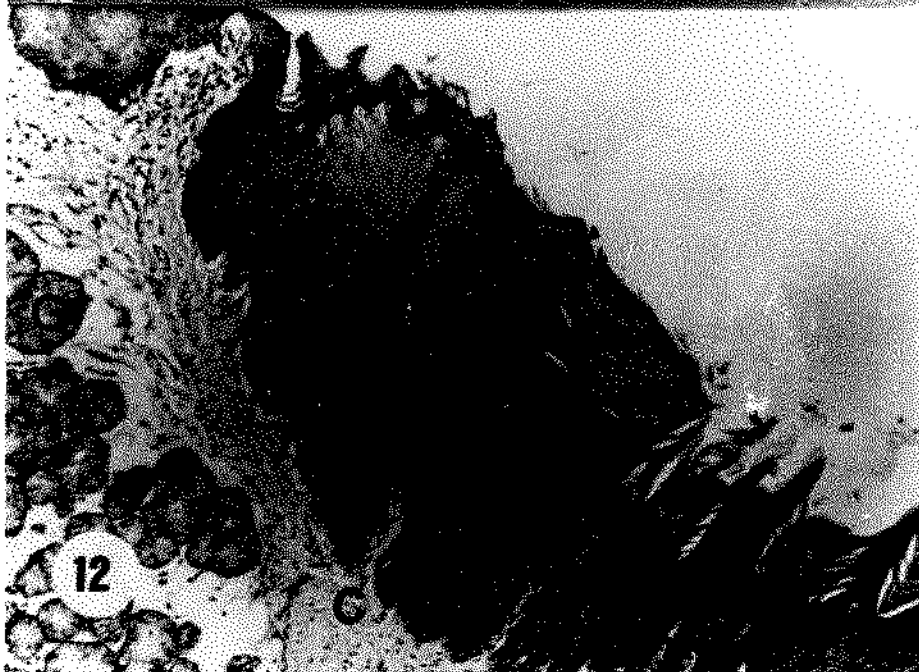
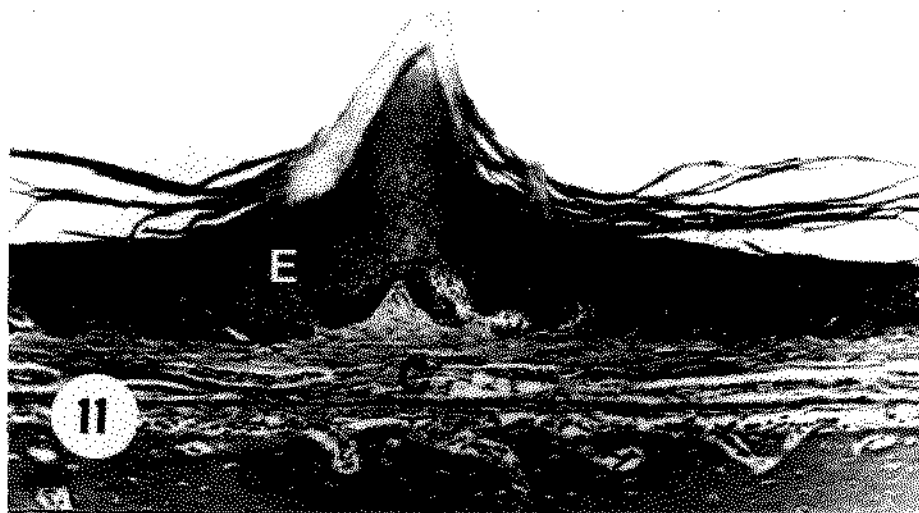


Fig. 11 - Corte sagital da região intermolar do palato duro de rato normal, mostrando uma rugosidade palatina.
E - epitélio.
C - conjuntivo.
O - osso.
Coloração: HE; aumento: 80X.

Fig. 12 - Corte sagital da ponte transversal terminal que separa o palato duro do palato mole. O epitélio (E) é espesso, com camada granulosa pronunciada, assim como a queratina (Q). Glândulas mucosas (G) estão presentes no conjuntivo subepitelial (C).
Coloração: HE; aumento: 80X.

Fig. 13 - Corte sagital do palato mole de ratos normais, mostrando numerosos ácinos de glândulas salivares mucosas (G).
Coloração: HE; aumento: 80X.



2 PRESENÇA DE Candida albicans
NA BOCA DE RATOS NORMAIS

Dos 381 ratos usados neste trabalho, foram isoladas leveduras em 65 animais (17,06%), sendo que 13 foram caracterizadas como C.albicans (20%), e as 52 restantes consideradas como Candida sp (80%). Os 65 animais que continham leveduras, não foram usados posteriormente neste trabalho. Animais que foram sialoadenectomizados, continuaram revelando resultados negativos para Candida após 15 dias da cirurgia, de forma que a retirada das glândulas salivares, por si só, não alterou o estado de não portador dos animais utilizados.

3 QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Ratos sialoadenectomizados mostraram intensa xerostomia durante todo o período experimental, com ressecamento da mucosa bucal e alta viscosidade da saliva presente.

Após 10, 50 e 120 dias os animais controles e sialoadenectomizados apresentaram semelhante aumento de peso, não havendo modificações na quantidade de saliva dos sialoadenectomizados nestes diferentes períodos.

Ratos sialoadenectomizados apresentaram quantidade de saliva cerca de 4 vezes menor que os normais nas medidas iniciais e após pilocarpina (Tab.2). O tratamento com pilocarpina provocou aumento de cerca de 25 vezes na quantidade de saliva dos animais normais e xerostômicos.

Tabela 2 - Média e desvio-padrão do peso corporal e da quantidade de saliva (mg/minuto), em ratos normais e sialoadenectomizados, antes e após a injeção intraperitoneal de 8 mg/Kg peso corporal de pilocarpina (n=10).

RATOS	DIAS APÓS SIALOADENECTOMIA		
	10	50	120

NORMAIS

Peso (g) 189,80 $\pm$ 11,32 214,00 $\pm$ 13,41 243,10 $\pm$ 15,65

Saliva (mg/min.):

Inicial 17,81 $\pm$ 6,81 15,72 $\pm$ 6,41 19,99 $\pm$ 13,22

Pilocarpina 359,10 $\pm$ 68,22 414,43 $\pm$ 57,12 399,61 $\pm$ 110,91

SIALOADENECTOMIZADOS

Peso (g) 185,00 $\pm$ 10,50 212,10 $\pm$ 12,41 236,00 $\pm$ 6,52

Saliva (mg/min.):

Inicial 3,51 $\pm$ 2,32* 2,82 $\pm$ 1,69* 3,21 $\pm$ 0,61*

Pilocarpina 103,83 $\pm$ 24,91* 103,16 $\pm$ 1,58* 96,52 $\pm$ 16,38*

* Diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em relação aos normais.

4 PERSISTÊNCIA DE Candida albicans NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Os ratos normais que receberam inoculações da amostra F72 de C.albicans, apresentaram após 2 dias da última inoculação $3,35 \times 10^4$ UFC/ml da levedura. No terceiro dia em um dos animais, e no quarto dia em 3 (50%), não se recuperou mais a levedura. Após 7 semanas, apenas um animal apresentou C.albicans, e na oitava semana não se recuperou a levedura da boca de nenhum dos animais (Tab.3).

Nos sialoadenectomizados, a quantidade de C.albicans (UFC/ml) foi sempre significativamente superior que nos normais (Tab.4), persistindo em 100% dos animais até a sétima e em 83,3% na oitava semana após a inoculação da levedura. Depois de 18 semanas (último período estudado), a C.albicans estava presente em 66,6% dos ratos sialoadenectomizados.

Tabela 3 - Número (num.) e porcentual (%) de ratos normais e sialoadenectomizados que apresentaram C.albicans na cavidade bucal até 126 dias (18 semanas), após 3 inoculações da levedura (n=6).

DIAS/SEMANAS	NORMAIS		SIALOADENECTOMIZADOS	
	num.	%	num.	%
1 / 0	6	100,00	6	100,00
2 / 0	6	100,00	6	100,00
3 / 0	5	83,33	6	100,00
7 / 1	5	83,33	6	100,00
14 / 2	5	83,33	6	100,00
21 / 3	5	83,33	6	100,00
28 / 4	4	66,66	6	100,00
35 / 5	3	50,00	6	100,00
42 / 6	2	33,33	6	100,00
49 / 7	1	16,66	6	100,00
56 / 8	0	0,00	5	83,33
63 / 9 *	0	0,00	4	66,66
.				
.				
.				
126 / 18	0	0,00	4	66,66

* Os valores da 9ª até 18ª semanas foram iguais.

Tabela 4 - Média e desvio-padrão de UFC/ml de *C.albicans* recuperadas da cavidade bucal de ratos normais e sialoadenectomizados até 126 dias (18 semanas) após 3 inoculações da levedura (n=6).

DIAS/SEMANAS	NORMAIS		SIALOADENECTOMIZADOS*
1 / 0	$6,08 \times 10^4 \pm 5,10$		$51,80 \times 10^4 \pm 15,10$
2 / 0	$3,35 \times 10^4 \pm 2,71$		$63,21 \times 10^4 \pm 11,61$
3 / 0	$0,35 \times 10^4 \pm 0,17$		$6,33 \times 10^4 \pm 7,37$
7 / 1	$0,52 \times 10^4 \pm 0,88$		$4,73 \times 10^4 \pm 3,14$
14 / 2	$0,12 \times 10^4 \pm 0,17$		$4,95 \times 10^4 \pm 3,71$
21 / 3	$0,83 \times 10^2 \pm 0,41$		$34,60 \times 10^2 \pm 10,02$
28 / 4	$0,66 \times 10^2 \pm 0,51$		$33,50 \times 10^2 \pm 12,80$
35 / 5	$0,50 \times 10^2 \pm 0,54$		$16,60 \times 10^2 \pm 12,20$
42 / 6	$0,33 \times 10^2 \pm 0,51$		$1,39 \times 10^2 \pm 1,02$
49 / 7	$0,16 \times 10^2 \pm 0,41$		$1,00 \times 10^2 \pm 0,00$
56 / 8	0	0	$8,30 \times 10^1 \pm 4,10$
63 / 9**	0	0	$6,66 \times 10^1 \pm 5,16$
.			
.			
.			
126 / 18	0	0	$6,66 \times 10^1 \pm 5,16$

* Quantidades de *C.albicans* significativamente maior, ao nível de 5%, em relação aos normais.

** Os valores da 9ª à 18ª semanas foram iguais.

5 MORFOLOGIA DE Candida albicans
(AMOSTRA F72) "IN VITRO"

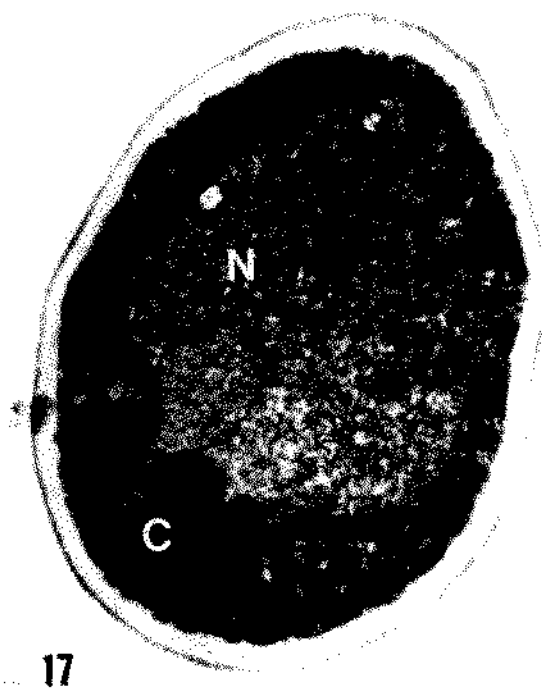
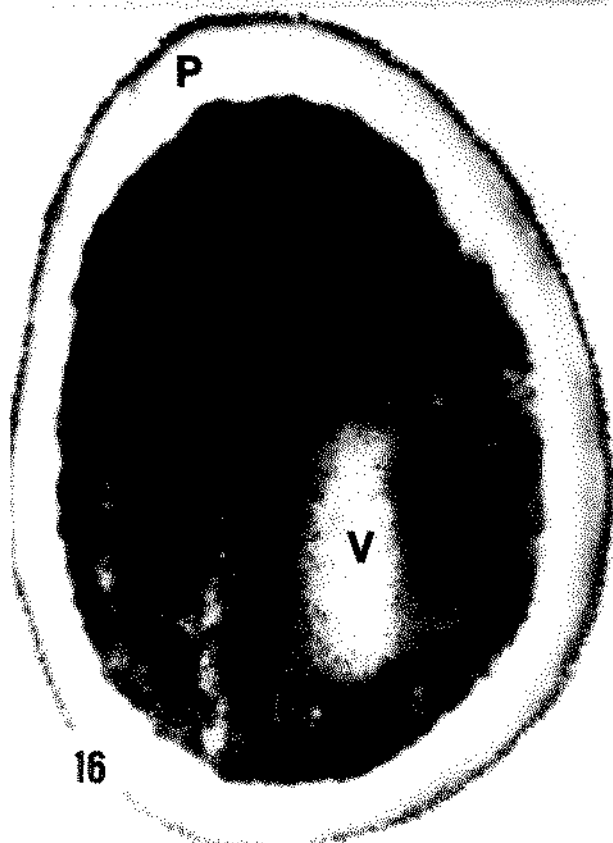
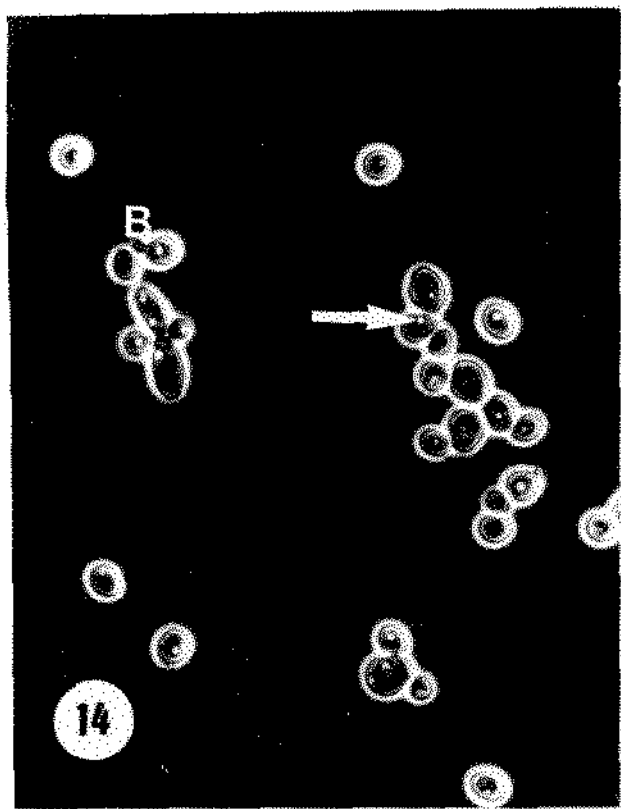
A amostra F72 de C.albicans, cultivada em ágar Sabouraud dextrose a 37°C/24 horas, apresentou-se em esfregaços corados pelo Gram, na microscopia de luz, como células globosas, Gram-positivas, ovulares ou alongadas, algumas com formação de blastoconídeos. Em microscopia de contraste de fase, evidenciou-se a parede celular e vacúolos citoplasmáticos não visíveis nos esfregaços corados pelo Gram (Fig.14).

Na microscopia eletrônica de transmissão, as leveduras apresentaram parede celular formada por porção externa eletrondensa e delgada, e interna homogênea e eletronlúcida (Fig.15). Em algumas regiões da célula, a membrana citoplasmática apresentou sinuosidade definida. O citoplasma apresentou-se geralmente homogêneo, sem permitir visualização de organelas, exceto em alguns casos, a presença de vacúolo (Fig.16). Em alguns cortes o núcleo pode ser visualizado (Fig.17).

Fig. 14 - Microscopia de contraste de fase de suspensão de C.albicans, em salina fisiológica, cultivada em agar Sabouraud dextrose a 37°C/24 horas. As leveduras mostram parede celular e vacúolos citoplasmáticos (setas) no interior do citoplasma. Observa-se também uma levedura com brotamento de blastoconídeo (B).
Aumento: 2500X.

Fig. 15 - Microscopia eletrônica de transmissão de C.albicans cultivada em agar Sabouraud dextrose a 37°C/24 horas. As leveduras apresentam parede celular (seta) formada de porção externa eletrondensa e delgada e interna homogênea e eletrônica. O material nuclear e citoplasmático são eletrondensos e não distintos.
MET; aumento: 15000X.

Fig. 16 e 17 - Maior aumento de leveduras de C.albicans cultivadas em agar Sabouraud dextrose a 37°C/24 horas. Na figura 16, a parede celular (PC) e o vacúolo citoplasmático (V) são evidentes, porém as demais estruturas não podem ser visualizadas. Na figura 17, o material nuclear (N) pode ser distinguido do citoplasma (C).
MET; aumento: 50000X.



6 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE Candida albicans
COM "SWAB" NA LINGUA DE RATOS NORMAIS
E SIALOADENECTOMIZADOS

Suspensão com 10^6 células viáveis de C.albicans/ml foi espalhada uniformemente com um "swab", no dorso e no ventre da língua de ratos normais e sialoadenectomizados. Em períodos de 1 hora a 15 dias após a inoculação, a presença de C.albicans foi analisada em 16 cortes histológicos de cada animal, corados pelo HE, PAS, Gram e Gomori-Grocott. Nos 50 animais observados para cada grupo, ocorreu penetração de pseudohifas no epitélio do dorso da língua, caracterizando candidose, em 8% dos normais e em 66% dos sialoadenectomizados (Tab.5).

- 1 hora:

Nos dois grupos estudados, a presença de C.albicans na superfície do epitélio foi semelhante, com as leveduras presentes na superfície das papilas filiformes (Fig.18). Nas papilas cônicas simples e nas gigantes, as leveduras apresentaram-se em toda a superfície das papilas e nas regiões interpapilares. Nas papilas verdadeiras, as leveduras predominaram nas superfícies convexas, usualmente recobertas por bactérias, inclusive sobre as mesmas, porém células de C.albicans também estavam presentes nas regiões concavas destas papilas. Observou-se também, grande número de leveduras livres e algumas na superfície da queratina do

epitêlio do ventre da língua. Em nenhum caso houve penetração de Candida no epitêlio.

- 2 horas:

Após 2 horas da aplicação, 3 ratos normais e 3 sialoadenectomizados tinham C.albicans na superfície do epitêlio, em quantidades semelhantes nos dois grupos, porém em menor número que após 1 hora, principalmente com relação às leveduras livres. Não foi observada Candida no interior do epitêlio.

- 4 horas:

No período de 4 horas, foram observadas poucas leveduras na superfície da queratina de 2 ratos normais e 3 sialoadenectomizados. Dois xerostômicos apresentaram leveduras com filamentação e formação de pseudohifas no interior da queratina, o que foi considerado como candidose (Fig.19). Num dos ratos a candidose ocorreu no dorso e ventre da língua; no outro animal apenas no ventre da língua (Fig.20).

- 6 horas:

Após 6 horas da aplicação da levedura, as línguas dos ratos normais não apresentaram C.albicans nos cortes histológicos, enquanto nos sialoadenectomizados houve candidose no dorso em 1 animal, no dorso e no ventre em 2, e apenas no ventre em 1.

No dorso da língua, a candidose apresentou-se em pequenas áreas, com leveduras e pseudohifas no interior da queratina (Fig.21). A camada espinhosa estava infiltrada por leucócitos polimorfonucleares e a camada basal e o conjuntivo subjacente normais. Em um rato sialoadenectomizado, observou-se pseudomembrana de aspecto eosinofílica e PAS positiva, com muitas leveduras, algumas com tubo germinativo e pseudohifas, na região das papilas cônicas simples. A queratina abaixo da pseudomembrana, apresentou áreas de descamação e continha leveduras e pseudohifas.

No ventre da língua, havia nas áreas de candidose, descamação da queratina, com pseudohifas infiltradas tanto nas porções descamadas, como na queratina aderida ao epitélio. Em algumas áreas as pseudohifas penetraram profundamente no epitélio, atingindo as camadas espinhosa e basal (Fig.22). Em alguns animais, quando as pseudohifas penetraram nas camadas mais profundas, houve formação de microabscessos intraepiteliais.

- 8 horas:

Neste período, nenhum animal normal demonstrou Candida nos cortes histológicos, enquanto que 4 dos 5 ratos sialoadenectomizados apresentaram candidose; 3 no dorso e ventre da língua, e 1 no ventre.

No dorso da língua, ocorreram pequenas áreas de implantação de C.albicans na queratina, com formação de pseudohifas e presença de leveduras, principalmente na região das papilas cônicas simples. Em algumas destas áreas, formaram-se microabscessos intraepiteliais (Fig.23).

No ventre da língua, a superfície da queratina mostrou numerosas leveduras, que filamentaram-se, originando pseudohifas que penetraram perpendicularmente à camada de queratina. As pseudohifas geralmente estavam paralelas entre si.

- 12 horas:

Doze horas após a aplicação de C.albicans nenhum animal normal apresentou o fungo nos cortes histológicos, enquanto todos sialoadenectomizados (n=5) tinham candidose. Um animal xerostômico apresentou candidose no dorso, 3 no dorso e no ventre, e 1 no ventre da língua.

No dorso da língua, um animal apresentou B, enquanto os demais, duas a três áreas diferentes de candidose nos 16 cortes examinados. Nestas áreas, localizadas principalmente nos espaços interpapilares, as leveduras estavam na superfície da queratina, formando pseudohifas para o interior do epitélio. Pequeno número de leucócitos polimorfonucleares localizavam-se entre a queratina e a camada espinhosa do epitélio. O conjuntivo subjacente não apresentou alterações (Fig.24).

No ventre da língua, as leveduras da superfície da queratina filamentaram-se e as pseudohifas penetraram no epitélio, geralmente paralelas entre si e perpendiculares à queratina. Porções de queratina contendo Candida descamavam-se do epitélio. Na camada espinhosa polimorfonucleares formavam microabcessos (Fig.25).

- 1 dia:

Neste período, um rato normal apresentou candidose no ventre da língua, 3 sialoadenectomizados no dorso e 2 no ventre. A candidose no dorso da língua apresentava pseudohifas maiores e leveduras em maior quantidade que nos grupos de 8 e 12 horas (Fig.26). Em alguns locais, a queratina apresentou espaço preenchido por pseudohifas, restos de epitélio, leveduras e alguns leucócitos em degeneração. As camadas espinhosa e basal estavam integras, apenas com infiltração de poucos polimorfonucleares. Em dois animais haviam microabcessos intraepiteliais. No conjuntivo subjacente, observou-se discreto infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares.

No ventre da língua, tanto no rato normal como nos sialoadenectomizados, a queratina contendo pseudohifas e leveduras estava em descamação e a camada espinhosa apresentou infiltrado moderado de polimorfonucleares. As pseudohifas eram maiores que nos períodos de 8 e 12 horas.

- 2 dias:

Após 48 horas da aplicação de C.albicans, 1 rato normal apresentou candidose no dorso e 1 no dorso e ventre da língua. Todos os sialoadenectomizados (n=5) apresentavam candidose: 4 no dorso, e 1 no dorso e ventre da língua.

No dorso, os animais evidenciaram 4 a 5 pontos de candidose na região das papilas cônicas simples. As pseudohifas penetraram na queratina, principalmente nas regiões interpapilares, geralmente não atingindo as camadas mais internas do epitélio (Fig.27). Na camada espinhosa, observou-se presença de polimorfonucleares esparsos pelo epitélio. A camada basal mostrou-se infiltrada por quantidade moderada de leucócitos, que também estão presentes no conjuntivo subjacente.

No ventre da língua, a candidose apresentou-se em pequena área, com leveduras e pseudohifas na queratina. As demais camadas do epitélio e conjuntivo subjacente não apresentaram alterações.

- 7 dias:

Após 1 semana da inoculação de C.albicans, todos os ratos sialoadenectomizados e 2 normais apresentaram leveduras na superfície da queratina. Quatro animais sialoadenectomizados e 2 normais mostraram áreas restritas de candidose no dorso da língua, com leveduras e pseudohifas

na queratina e demais camadas do epitélio e conjuntivo subjacente normais (Fig.28).

Em 2 ratos sialoadenectomizados, observou-se região com perda das papilas gigantes e algumas verdadeiras. Nesta região, o epitélio apresentou-se hiperqueratótico com polimorfonucleares na queratina e ausência de pseudohifas e leveduras. Observou-se ainda área de acantose e hiperplasia da camada basal. No conjuntivo subjacente, infiltrado de células inflamatórias mononucleares, que por vezes se confundem com as células da camada basal do epitélio. Outro animal sialoadenectomizado, apresentou lesão semelhante, porém localizada na região das papilas cônicas simples, com presença de poucas pseudohifas e leveduras.

- 15 dias:

Neste período, 2 ratos sialoadenectomizados apresentaram leveduras e candidose no dorso, e 1 no dorso e ventre da língua. Os animais normais não apresentaram Candida nos cortes histológicos. Além de áreas de candidose, com presença de leveduras e pseudohifas na queratina do epitélio no dorso da língua (Fig.29), 2 animais apresentaram na região das papilas cônicas simples, anteriormente às gigantes, epitélio hiperqueratótico com presença de número reduzido de pseudohifas implantadas na queratina. O epitélio estava acantótico, com polimorfonucleares espalhados por toda a região, e o conjuntivo

subjacente mostrava discreto infiltrado de células inflamatórias com predomínio de polimorfonucleares. Um dos animais apresentou intensa candidose no ventre da língua, com hiperqueratose, acantose e hiperplasia da camada basal do epitélio. O conjuntivo estava infiltrado com células inflamatórias predominando polimorfonucleares e mononucleares.

Tabela 5 - Número de ratos normais e sialoadenectomizados que apresentaram leveduras na superfície ou pseudohifas no interior (candidose) do epitélio na língua, após aplicação de 10^6 células de C.albicans/ml na boca, com auxílio de "swab". Foram usados 5 ratos normais e 5 sialoadenectomizados para cada período, num total de 100 animais.

PERÍODOS	NORMAIS		SIALOADENECTOMIZADOS	
	Leveduras na superfície do epitélio	Pseudohifas no interior do epitélio (candidose)	Leveduras na superfície do epitélio	Pseudohifas no interior do epitélio (candidose)
1 hora	5	0	5	0
2 horas	3	0	3	0
4 horas	2	0	3	2
6 horas	0	0	4	4
8 horas	0	0	5	5
12 horas	0	0	5	5
1 dia	1	1	5	5
2 dias	2	2	5	5
7 dias	2	1	5	4
15 dias	0	0	3	3

Fig. 18 - Corte sagital da língua de rato sialoadenectomizado, 1 hora após a inoculação da levedura com "swab", mostrando C.albicans (setas) aderidas à queratina (Q) das papilas cônicas simples. Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 19 - Corte sagital da região das papilas verdadeiras da língua de rato sialoadenectomizado, 4 horas após a inoculação de C.albicans. As leveduras e pseudohifas (setas) penetraram na queratina das papilas verdadeiras (candidose). O material escuro e homogêneo na superfície da queratina na face convexa das papilas, corresponde à camada de bactérias (*). Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 20 - Corte sagital do ventre da língua de rato sialoadenectomizado, 4 horas após a aplicação de C.albicans. As leveduras sobre a superfície do epitélio filamentaram-se, e as pseudohifas penetraram na queratina. Coloração: PASH; aumento: 100X.

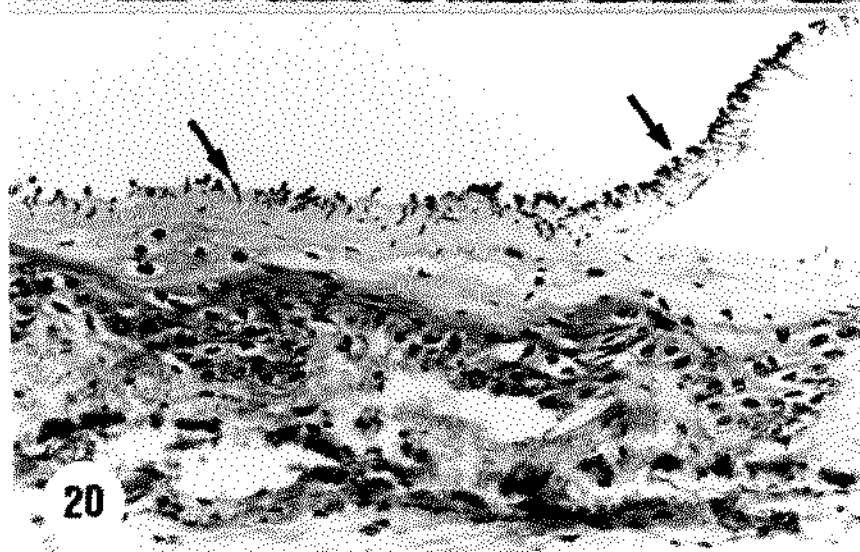
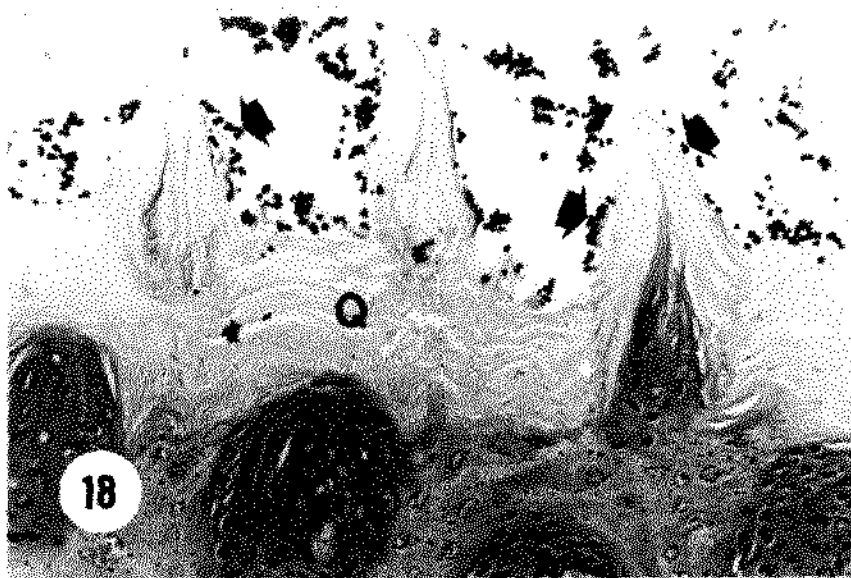


Fig. 21 - Corte sagital da região das papilas cónicas simples da língua de rato sialoadenectomizado, 6 horas após aplicação de C.albicans. Leveduras estão aderidas na superfície e pseudohifas (setas) penetraram na queratina, caracterizando candidose. A camada espinhosa do epitélio não apresenta pseudohifas e a basal está íntegra. Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 22 - Corte sagital da região do ventre da língua de rato sialoadenectomizado, 6 horas após aplicação de C.albicans. A queratina (Q) apresenta descamação, com leveduras e pseudohifas na porção descamada e no epitélio remanescente. A seta mostra área sugestiva de microabcesso intraepitelial. Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 23 - Corte sagital das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato sialoadenectomizado, 8 horas após aplicação de C.albicans. As leveduras estão aderidas e as pseudohifas (setas) penetraram na queratina (candidose). Formou-se microabcesso (*) entre a queratina e a camada espinhosa do epitélio. Coloração: PASH; aumento: 200X.

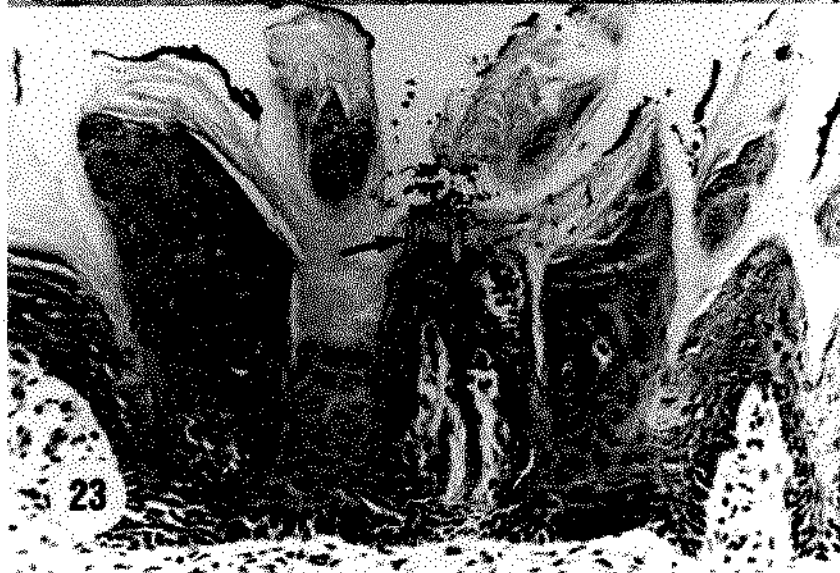
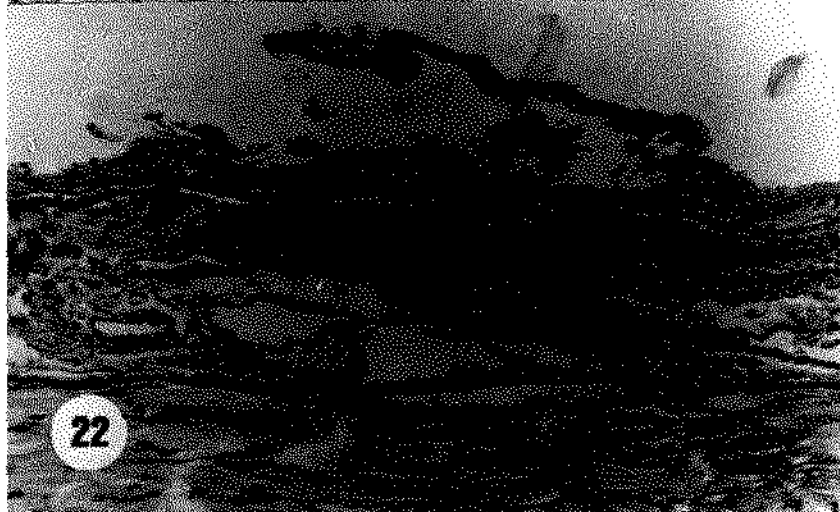
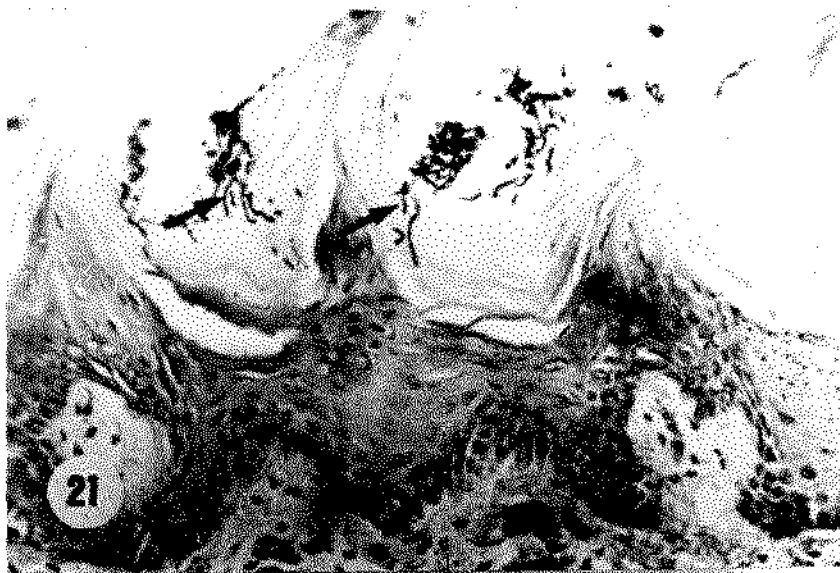


Fig. 24 - Corte sagital das papilas cônicas simples da língua de rato sialoadenectomizado, 12 horas após aplicação de C.albicans. Observa-se leveduras aderidas na superfície e grande quantidade de pseudohifas (setas) na queratina (candidose). Em algumas regiões a queratina parece estar descamando-se.
Coloração: PASH; aumento 200X.

Fig. 25 - Corte sagital da região do ventre da língua de rato sialoadenectomizado, 12 horas após aplicação de C.albicans. As leveduras sobre a queratina filamentaram-se e as pseudohifas invadiram o epitélio. Houve formação de microabscessos intraepiteliais (setas).
Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 26 - Corte sagital das papilas cônicas simples da língua de rato sialoadenectomizado, 24 horas após aplicação de C.albicans. Leveduras e pseudohifas estão na queratina, que parece estar descamando-se na superfície, liberando leveduras (setas).
Coloração: PASH; aumento: 200X.

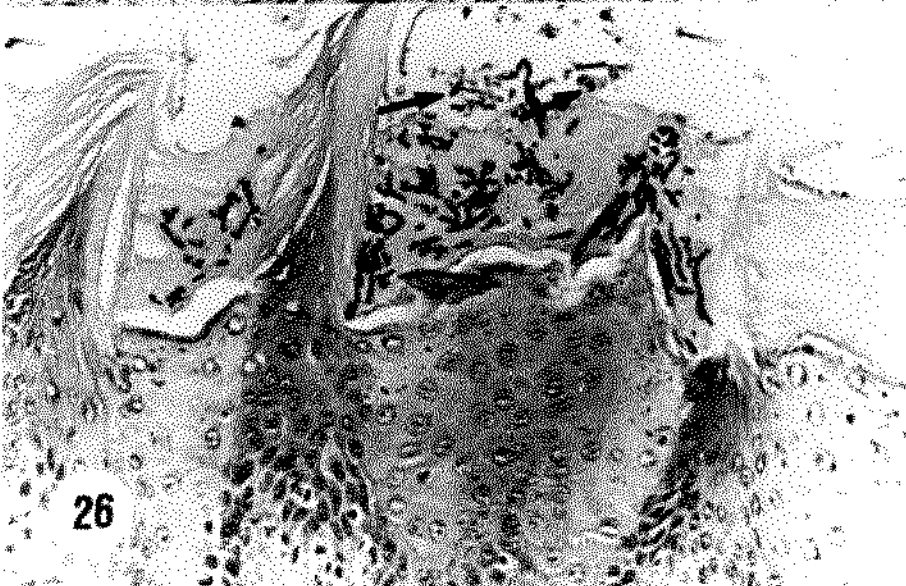
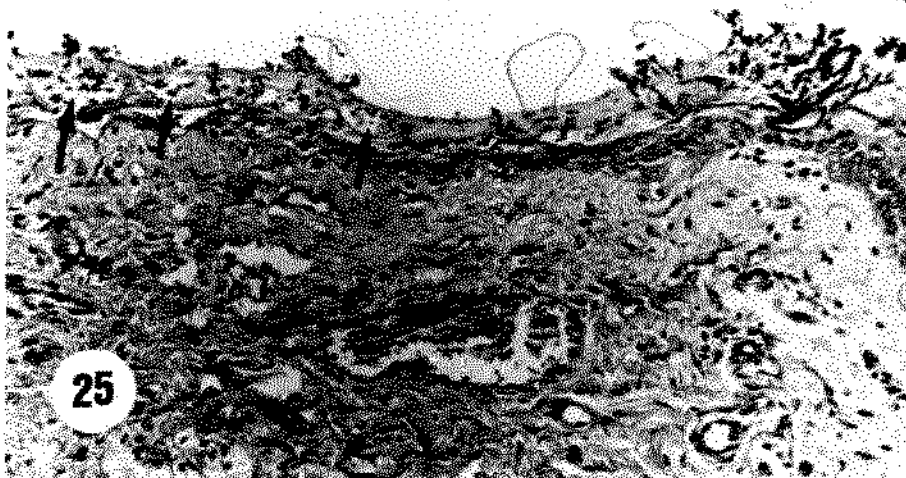
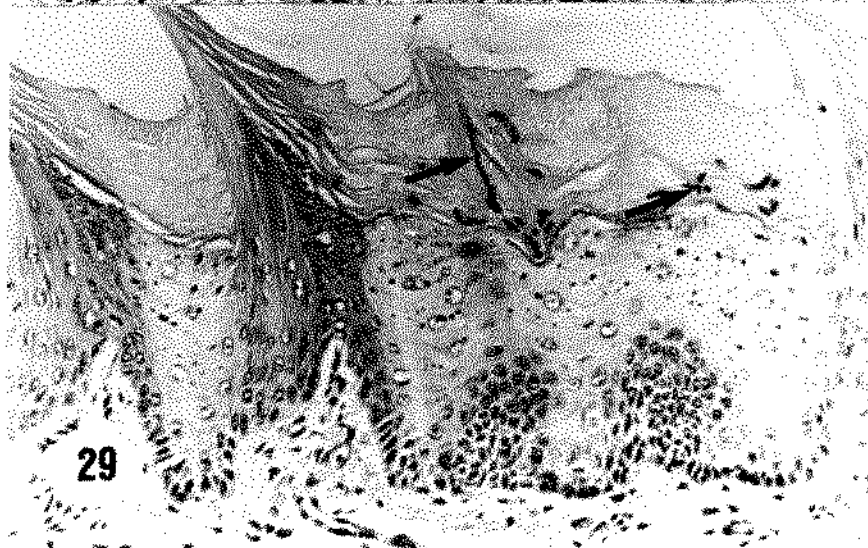
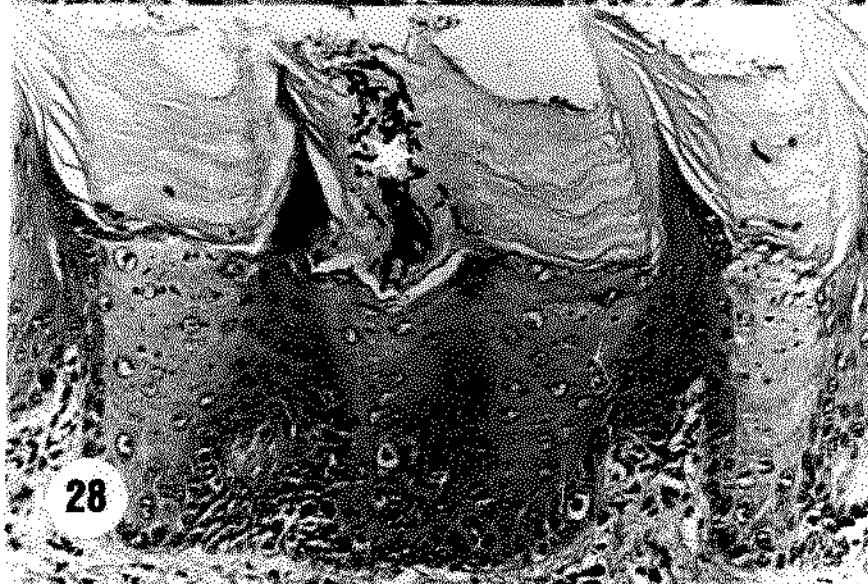
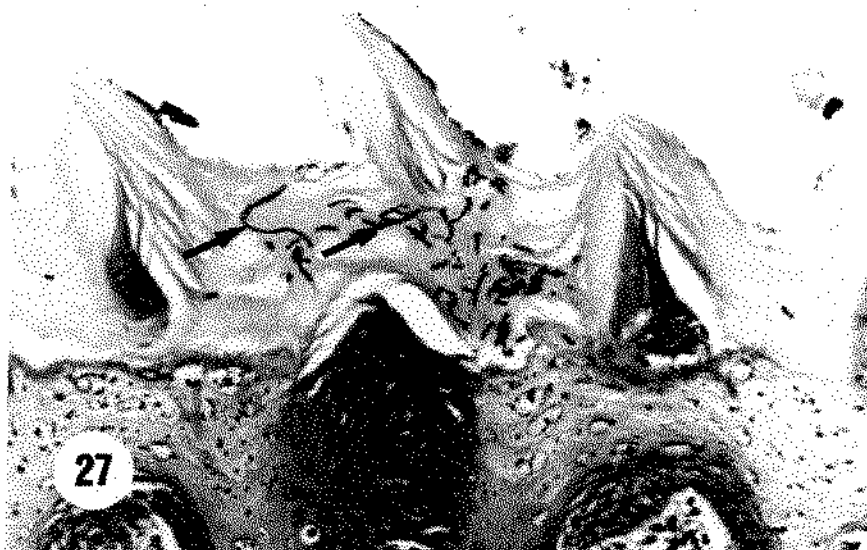


Fig. 27 - Corte sagital das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato sialoadenectomizado, 48 horas após aplicação de C.albicans. Observa-se leveduras e pseudohifas (setas) no interior da queratina (candidose).
Coloração: PASH; 200X.

Fig. 28 - Corte sagital das papilas cônicas simples da língua de rato sialoadenectomizado, 7 dias após aplicação de C.albicans. A área de candidose (*) é bem localizada, com leveduras e pseudohifas atingindo a camada granulosa.
Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 29 - Corte sagital das papilas cônicas simples da língua de rato sialoadenectomizado, 15 dias após aplicação de C.albicans. Algumas leveduras e pseudohifas (setas) são visíveis na queratina.
Coloração: PASH; aumento: 200X.



7 EFEITOS DA INOCULAÇÃO PROLONGADA DE
 Candida albicans NA BOCA DE RATOS
 NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Após receberem 3 inoculações semanais de suspensão contendo 10^6 células de C. albicans durante 32 semanas, os ratos normais e sialoadenectomizados foram sacrificados 24 horas após a última inoculação. Durante o período experimental, os 10 ratos normais e os 10 sialoadenectomizados desenvolveram-se bem e não mostraram sinais clínicos de alterações sistêmicas que pudessem interferir nos resultados. A média do peso inicial dos ratos foi de $181,30 \pm 9,33$ gramas para os normais e $179,60 \pm 5,83$ para os sialoadenectomizados, atingindo após as 32 semanas média de $451,60 \pm 33,39$ gramas nos normais e $462,10 \pm 38,78$ nos xerostômicos.

Macroscopicamente, três ratos sialoadenectomizados apresentaram perda de papilas gigantes, ficando com a região da língua lisa e brilhante, e apenas um animal normal apresentou aplainamento das papilas gigantes. O palato dos ratos normais e sialoadenectomizados apresentaram-se sem alterações macroscópicas.

Nos preparados histológicos corados pelo HE, PASH, Gram e Gomori-Grocott dos animais, a presença de leveduras no epitélio do dorso da língua, foi mais intensa e mais frequente nos ratos sialoadenectomizados do que nos normais.

Na região das papilas cônicas simples, C.albicans estava presente em 8 animais, enquanto que nas gigantes e verdadeiras em todos os ratos sialoadenectomizados. A presença de pseudohifas no interior do epitélio, caracterizando candidose, foi observada em 7 animais sialoadenectomizados (70%). A candidose ocorreu em uma região do dorso da língua em 4 animais, em 2 regiões em 2 e em 3 regiões em 1 animal. A candidose ocorreu na região das papilas cônicas simples em 4 ratos, nas gigantes em 3 e nas verdadeiras em 2 (Tab.6).

Em 2 ratos sialoadenectomizados a candidose da região das papilas cônicas simples caracterizou-se por pequeno número de leveduras e pseudohifas na queratina, sem alterações das camadas celularizadas do epitélio, exceção à infiltração de poucos polimorfonucleares. Na candidose das papilas gigantes, o epitélio apresentou-se com intensa acantose, e a camada basal exibiu hiperplasia e vacuolizações celulares. Polimorfonucleares estavam presentes na camada queratinizada, além de grande número de pseudohifas e leveduras. As papilas gigantes estavam ausentes na região acima descrita e a lâmina própria mostrou infiltrado inflamatório de intensidade moderada com predominância de mononucleares (Figs. 30A e 30B). Em outros dois animais, a candidose na região das papilas cônicas simples, mostrou área de hiperqueratose, discreta acantose e hiperplasia da camada basal do epitélio. As

papilas filiformes estavam presentes, e material eosinofílico PAS positivo, recobria a superfície do epitélio, contendo pseudohifas e leveduras no seu interior. Leveduras e pseudohifas estavam também presentes sobre a camada de queratina (Figs.31A e 31B).

Nos ratos normais, leveduras estavam presentes no epitélio do dorso da língua de 2 animais na região das papilas cônicas simples e nas gigantes, e em 4 nas papilas verdadeiras. A presença de pseudohifas no interior do epitélio foi detectada no dorso da língua de 2 animais normais; um deles apresentou apenas um pequeno ponto de candidose na região das papilas cônicas simples, enquanto o outro apresentou 2 pontos de candidose a saber: um na região das papilas cônicas simples, e outro, mais extenso, nas papilas gigantes. Os pontos de candidose na região das papilas cônicas simples caracterizaram-se pela presença de leveduras e pequeno número de pseudohifas no interior da queratina, sem envolvimento das camadas espinhosa e basal do epitélio. A candidose que ocorreu na região das papilas gigantes nos ratos normais, foi semelhante à descrita para o animal sialoadenectomizado, com presença de leveduras e pseudohifas, alterações no epitélio e perda de papilas.

No ventre da língua, 3 ratos sialoadenectomizados exibiam leveduras na superfície da queratina e um animal apresentou candidose (Figs.32A e 32B). Em dois ratos normais, leveduras estavam presentes sobre a queratina, com

formação de pseudohifas no interior do epitélio, caracterizando candidose em um animal (Fig.33).

Na região faríngea da língua, 3 ratos sialoadenectomizados apresentaram candidose, pseudohifas e leveduras no interior da queratina, com a camada espinhosa mostrando microabcessos intraepiteliais e infiltração mononuclear no conjuntivo subjacente (Figs.34 e 35). Os ratos normais não tinham alterações na região faríngea da língua.

No palato, tanto os ratos normais como os sialoadenectomizados, não apresentaram alterações ou presença de candidose. Entretanto, leveduras foram encontradas na superfície do epitélio, em 1 animal normal e em 4 sialoadenectomizados.

Tabela 6 - Número de ratos normais e sialoadenectomizados que apresentaram Candida albicans na superfície ou no interior do epitélio da língua, após 32 semanas de inoculações de 10^6 células da levedura. Os dados estão apresentados de acordo com a região da língua (n=10).

REGIÕES DA LÍNGUA	NORMAIS		SIALOADENECTOMIZADOS	
	Leveduras na superfície do epitélio	Pseudohifas no interior do epitélio (candidose)	Leveduras na superfície do epitélio	Pseudohifas no interior do epitélio (candidose)
Papilas cônicas	2	2	8	5
Papilas gigantes	2	1	10	3
Papilas verdadeiras	4	0	10	2
Ventre	2	1	3	1
Região faringea	0	0	3	3

Fig. 30A e 30B - Corte sagital das papilas gigantes do dorso da língua de rato sialoadenectomizado, após inoculação de C.albicans por 32 semanas. Na figura 30A, epitélio acantótico com pseudohifas (setas) na queratina. Na figura 30B, maior aumento do epitélio com pseudohifas na queratina (setas).

30A - Coloração: PASH; aumento: 80X.

30B - Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 31A e 31B - Corte sagital das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato sialoadenectomizado, após inoculação de C.albicans por 32 semanas. Na figura 31A, pseudomembrana (PM) aderida sobre as papilas. Em 31B, maior detalhe, mostrando pseudomembrana (PM) contendo leveduras e pseudohifas (setas).

31A - Coloração: HE; aumento: 80X.

31B - Coloração: PASH, aumento: 200X.

Fig. 32A e 32B - Corte sagital do epitélio do ventre da língua de rato sialoadenectomizado, após inoculação de C.albicans por 32 semanas. Na figura 32A, o epitélio está acantótico e a queratina infiltrada por polimorfonucleares. No conjuntivo (C) presença de infiltrado inflamatório. Na figura 32B, maior aumento do epitélio (E), mostrando acantose e infiltrado de mononucleares na queratina (Q).

32A - Coloração: HE; aumento: 80X.

32B - Coloração: HE; aumento: 200X.

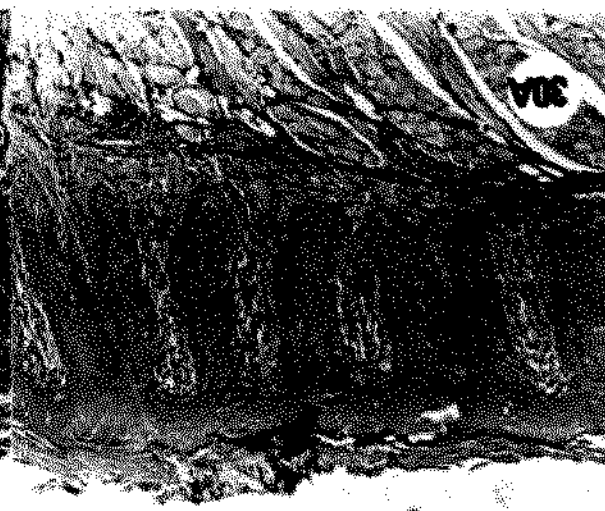
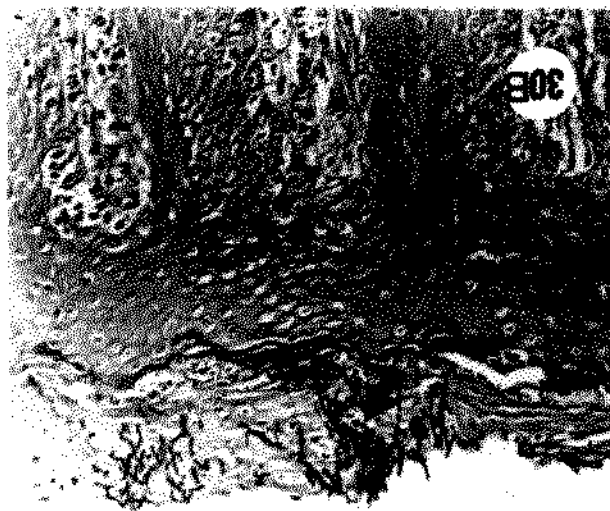
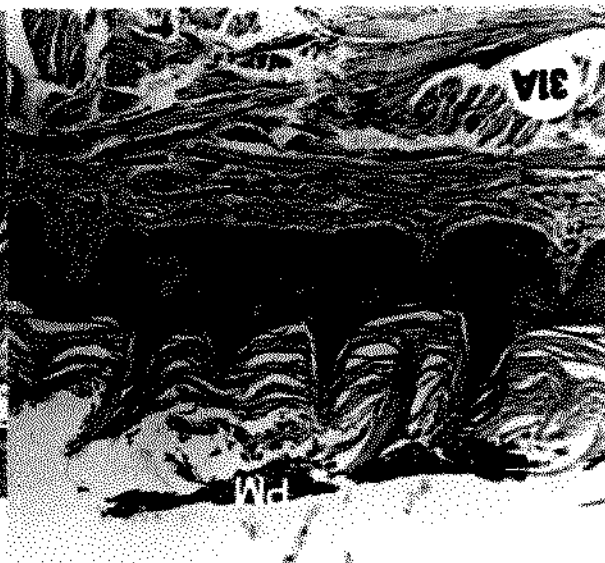
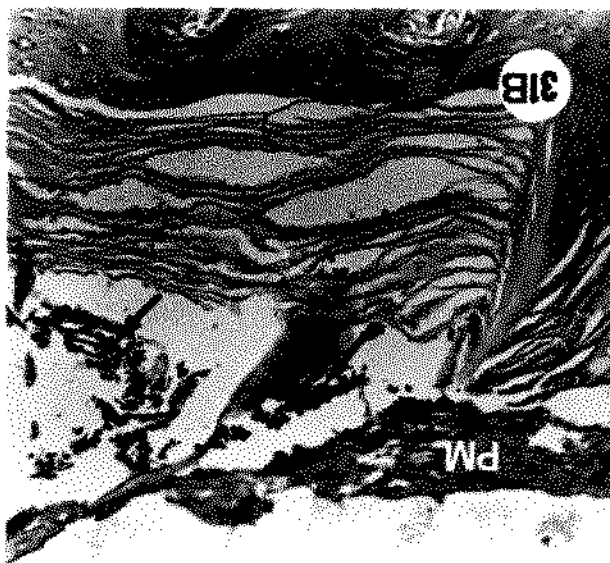
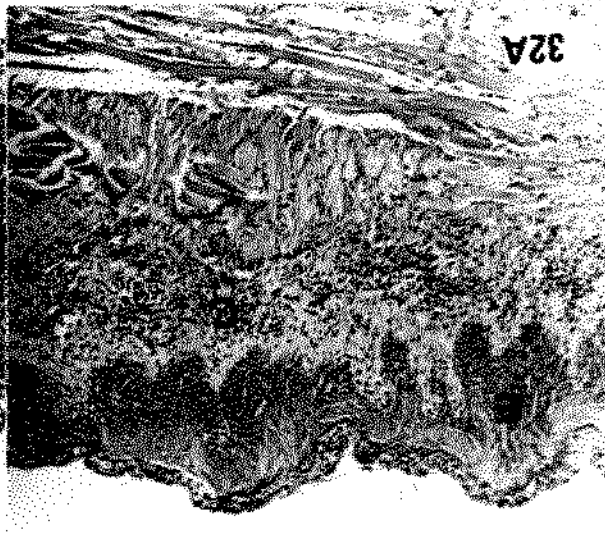
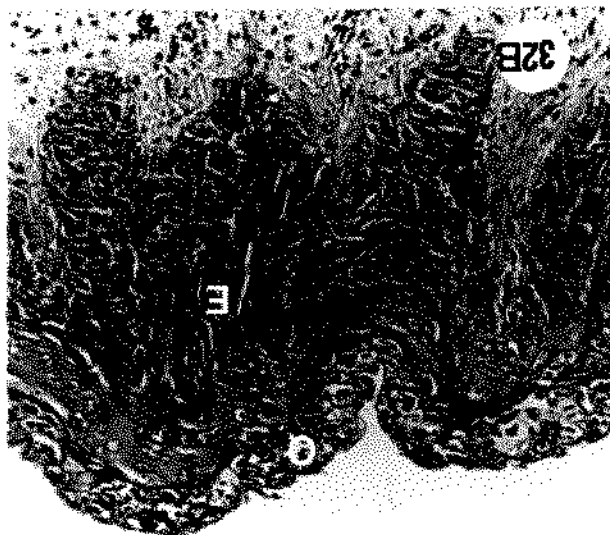
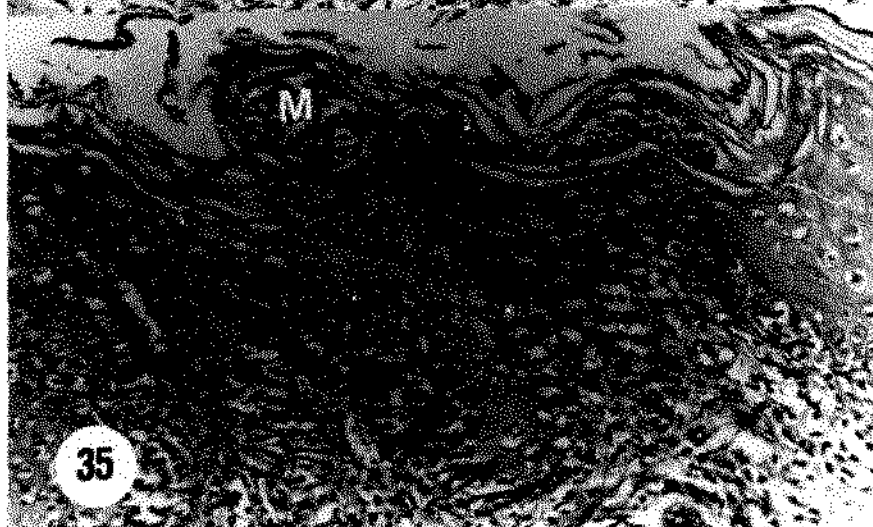
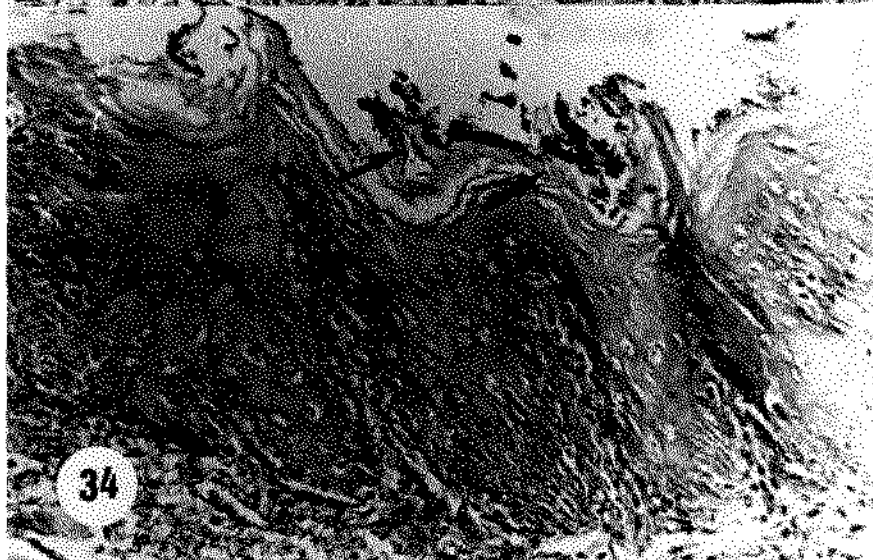


Fig. 33 - Corte sagital do dorso da língua de rato normal, após inoculação prolongada de C.albicans por 32 semanas. O epitélio acantótico (E) apresenta infiltração de polimorfonucleares (seta) na queratina, que apresenta-se em descamação. Pseudohifas não são visíveis. Coloração: HE; aumento: 200X.

Fig. 34 e 35 - Corte sagital do epitélio da região faríngea da língua de rato sialoadenectomizado, após inoculação de C.albicans por 32 semanas. Na figura 34, região na queratina contendo leveduras e pseudohifas (setas); o epitélio apresenta-se acantótico e na superfície da queratina observa-se bactérias. Na figura 35, pseudohifas e leveduras (setas), com formação de microabscesso intraepitelial (M).

Fig. 34 - Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 35 - Coloração: PASH; aumento: 200X.



B EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE Candida albicans
EM RATOS PORTADORES DE PLACA ACRILICA NO PALATO

8.1 Candida:

Ratos normais receberam 3 inoculações de 10^6 células C.albicans, e após 25 dias apresentavam ganho de peso compatível com a idade (Tab.7). Macroscopicamente, a cavidade bucal não apresentou alterações e fungos não foram observados nos esfregaços. Nos cortes histológicos corados pelo HE e pelas técnicas do PASH, Gram para tecidos e Gomori-Grocott, a língua e o palato dos ratos estavam normais, sendo observadas leveduras na superfície do epitélio do palato de 1 (12,5%) e na língua de 2 (25%) animais (Tab.8).

8.2 Placa acrílica:

A permanência da placa acrílica no palato durante 25 dias provocou perda de peso e os animais estavam clinicamente abatidos (Tab.7). O palato mostrava diminuição das rugosidades palatinas nas regiões pré-molar e intermolar, e retração da gengiva palatina em 5 dos 8 animais. Nos esfregaços feitos do material presente entre a placa e o palato, corados pelo Gram, observou-se grande quantidade de resíduos alimentares, pelos, células descamadas, cocos e bacilos Gram-positivos e negativos, porém leveduras não foram encontradas.

Histologicamente o epitélio do palato apresentou-se hiperqueratótico, com áreas de acantose e material amorfo com numerosas bactérias na superfície. Os tecidos conjuntivo e muscular não apresentaram alterações.

8.3 Placa acrílica e Candida:

Os animais que receberam inoculações de C.albicans e usaram placa acrílica no palato durante 25 dias, perderam peso e estavam abatidos. O palato perdeu as rugosidades palatinas com aplainamento das regiões pré-molar e intermolar. Apenas um animal não perdeu totalmente as rugosidades palatinas. Todos os animais apresentaram retração da gengiva palatina, principalmente ao nível do primeiro molar. Em dois animais, extensa lesão periodontal com perda de osso alveolar foi observada.

Entre a placa acrílica e o palato havia material semelhante à placa bacteriana que, nos esfregaços mostraram presença de resíduos alimentares, células descamadas, alguns leucócitos e muitas bactérias, principalmente cocos Gram-positivos, aderidas às células descamadas ou livres. Fungos foram observados em 3 dos 8 ratos examinados.

As alterações histológicas foram semelhantes às observadas no grupo placa acrílica, com hiperqueratose e acantose em algumas áreas. Dois animais apresentaram leveduras; um no epitélio da língua, na região das papilas verdadeiras; e o outro, na região intermolar do palato.

8.4 Sialoadenectomia e Candida:

Após sialoadenectomia, os animais receberam 3 inoculações de C.albicans, e 25 dias após a primeira inoculação, o desenvolvimento dos ratos como ganho de peso e aparência estavam normais. Macroscopicamente a boca apresentou-se seca, com resíduos alimentares aderidos aos dentes e mucosas, mas o palato e o dorso da língua estavam normais. Nos esfregaços observou-se bactérias e células descamadas, e em apenas 1 animal leveduras estavam presentes. Não foram observadas alterações histológicas neste grupo, e as leveduras foram observadas em 2 animais na superfície do epitélio do palato e da língua.

8.5 Sialoadenectomia e placa acrílica:

Após sialoadenectomia e 25 dias da permanência de placa acrílica no palato, os ratos perderam peso e estavam abatidos, com perda de pelos nas regiões abdominal e cervical.

A mucosa bucal apresentou-se ressecada, com resíduos de alimentos aderidos aos dentes e na placa acrílica. No palato houve perda das rugosidades na região pré-molar e intermolar, com a mucosa irregular e resíduos aderidos na superfície.

Os animais apresentaram retração da gengiva palatina, principalmente ao nível do primeiro molar. Dois animais tinham lesão periodontal avançada, com exposição radicular,

e em um deles a reabsorção atingiu a bifurcação. Um rato apresentou fenda profunda no palato, preenchida por placa bacteriana e com comunicação com a cavidade nasal. Outro animal apresentou ulceração no tubérculo intermolar da língua.

Nos esfregaços do material entre a placa acrílica e o palato, muitas células descamadas e grande quantidade de bactérias isoladas ou aderidas às células, e alguns leucócitos foram observados. Histologicamente, o epitélio do palato apresentava-se acantótico, com difícil diferenciação entre as camadas granulosa e espinhosa. A camada basal mostrou-se irregular e hiperplásica, com perda de definição das rugosidades palatinas e presença de bactérias, inclusive entre as camadas irregulares da queratina.

8.6 Sialoadenectomia, placa acrílica e Candida:

Após sialoadenectomia, 3 inoculações de C.albicans e permanência de placas acrílicas no palato durante 25 dias, os ratos estavam muito debilitados, com acentuada perda de peso e ausência de pelos nas regiões dorsal, abdominal e cervical; mucosa bucal ressecada, com presença de resíduos alimentares. No palato houve perda das rugosidades e dois animais apresentaram destruição periodontal extensa na região palatina do primeiro molar. Nos esfregaços, leveduras estavam presentes em 5 animais.

Microscopicamente o palato e a língua tinham alterações como no grupo sialoadenectomia e placa acrílica, sendo encontradas leveduras no palato de 6 animais (75%) e na língua de 4 (50%). O epitélio apresentou acantose acentuada, hiperqueratose e hiperplasia da camada basal. Na superfície da queratina, bactérias, principalmente cocos Gram-positivos, células epiteliais descamadas e restos de queratina estavam presentes.

Tabela 7 - Médias e desvio-padrão do peso em gramas de ratos normais e sialoadenectomizados, imediatamente antes da sialoadenectomia; após 10 dias (inoculação de C.albicans e/ou adaptação de placa acrílica) e depois de 25 dias dos tratamentos (n=8).

GRUPOS	INICIAL	10 DIAS	25 DIAS
<u>Candida</u>	185,6±20,1	194,8±32,4	209,2± 7,8
Placa acrílica	187,3± 9,4	192,8± 7,3	183,3± 5,4*
Placa acrílica e <u>Candida</u>	180,3±11,6	185,4± 8,5	174,0± 7,3*
Sialoadenectomia e <u>Candida</u>	186,3±17,7	179,8±11,8	206,6±17,8
Sialoadenectomia e placa acrílica	184,1±17,1	178,9±14,7	140,8±22,9** ***
Sialoadenectomia, Placa acrílica e <u>Candida</u>	192,6±20,4	186,0±19,3	132,4±21,2** ***

Diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%:

- * em relação ao grupo Candida;
- ** em relação ao peso inicial;
- *** em relação ao grupo placa acrílica.

Tabela 8 - Número de ratos normais e sialoadenectomizados que apresentaram Candida em esfregaços do palato e na superfície da língua e do palato em preparados histológicos, após inoculação de C.albicans e/ou adaptação de placa acrílica no palato (n=8).

GRUPOS	ESFREGAÇO	CORTES HISTOLÓGICOS	
		PALATO	LÍNGUA
<u>Candida</u>	0	1	2
Placa acrílica	0	0	0
Placa acrílica e <u>Candida</u>	3	1	1
Sialoadenectomia e <u>Candida</u>	1	2	2
Sialoadenectomia e placa acrílica	0	0	0
Sialoadenectomia, placa acrílica e <u>Candida</u>	5	6	4

9 CANDIDOSE NO DORSO DA LINGUA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

A candidose produzida pela injeção intraepitelial da amostra F72 de C.albicans, na forma de leveduras, no dorso da língua de ratos normais e sialoadenectomizados, apresentou resultados macro e microscopicamente semelhantes. Desta forma, as descrições que se seguem correspondem aos dois grupos (n=10).

9.1 Aspectos macroscópicos:

Após receberem injeções intraepiteliais de suspensão contendo 10^6 células de C.albicans/ml no dorso da língua, os ratos normais e sialoadenectomizados foram sacrificados em períodos de 1 hora a 15 dias.

Uma hora após as injeções, apenas os pontos de inoculação eram visíveis macroscopicamente como discretas linhas, ligeiramente salientes e esbranquiçadas (Fig.37). Após 2 horas, os locais injetados tornaram-se praticamente imperceptíveis.

As áreas inoculadas tornaram-se visíveis novamente após 6 horas, como regiões esbranquiçadas, formando saliência no epitélio, geralmente em forma de linhas retas, com aproximadamente 5 a 7 mm de comprimento (Fig.38). Após 8 horas, o aspecto macroscópico continuou semelhante ao período de 6 horas.

Após 12 horas, as lesões no dorso da língua tornaram-se evidentes, com depressão central avermelhada e brilhante, circundada por bordos elevados e esbranquiçados (Fig.39). No período de 24 horas, o dorso da língua apresentou pequenas áreas despapiladas de aspecto liso e eritematoso nos locais das injeções (Fig.40). Estas áreas de perda de papilas coalesceram, formando área eritematosa mais extensa após 7 dias (Fig.41). Depois de 15 dias, a mucosa da língua estava praticamente normal, exibindo em pequenas áreas, perda de papilas.

10.2 Aspectos microscópicos:

Após a análise histológica dos locais injetados com C.albicans no dorso da língua nos períodos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 horas, 1, 2, 7 e 15 dias, selecionou-se os tempos de 1, 4 e 24 horas para observações adicionais em microscopia eletrônica.

- 1 hora:

A injeção intraepitelial de C.albicans rompeu o epitélio na região da camada espinhosa, formando um fenda no interior do mesmo. Nos cortes corados pelo HE, as leveduras geralmente não eram visíveis e o epitélio não apresentou alterações morfológicas além daquelas devidas ao trauma mecânico da agulha, com presença de fibrina, hemácias e eventuais leucócitos polimorfonucleares no interior da fenda (Figs.42A e 42B). As partículas de C.albicans foram

observadas pelo PASH, Gomori-Grocott e Gram, aderidas às células epiteliais ou soltas no interior da fenda (Figs.43A, 43B e 44A). Algumas leveduras mostravam brotamento de tubo germinativo, com tamanho equivalente ao da própria levedura (Fig.44B). Em alguns animais, o brotamento atingiu comprimento de 2 a 4 vezes maior que o tamanho da levedura. Aproximadamente, para cada 8 leveduras, uma formava tubo germinativo.

Na superfície do epitélio da dorso da língua, todos os animais (n=10) apresentavam leveduras sobre as papilas cônicas simples e verdadeiras e 9 sobre as gigantes. Na superfície ventral, apenas 1 rato mostrou C.albicans. As leveduras da superfície do epitélio não apresentavam tubo germinativo.

A microscopia eletrônica de transmissão, mostrou a fenda produzida pelo trauma mecânico da agulha, contendo leveduras e células epiteliais alteradas (Fig.45). As leveduras encontravam-se livres no interior da fenda e também aderidas às células epiteliais (Fig.46). A camada eletrondensa mais externa da parede celular das leveduras formava depressões na superfície das células epiteliais (Fig.47). Em alguns casos, entretanto, a levedura parecia estar penetrando na célula epitelial com pequeno espaço entre a camada mais externa da levedura e a membrana celular (Fig.48). Algumas células de C.albicans apresentavam brotamento de tubo germinativo livre no interior da fenda ou

com sua extremidade em contato com as células epiteliais (Figs.49 e 50).

- 2 horas:

No período de 2 horas, a fenda apresentava leveduras livres e aderidas às células epiteliais. Mais da metade das leveduras evidenciavam brotamentos de comprimento maior do que 1 hora após a injeção (Fig.51).

Em alguns casos houve infiltração de polimorfonucleares na fenda, mas a camada basal não mostrava alterações (Fig.52). Por outro lado, quando a migração de polimorfonucleares foi maior, houve desorganização tecidual, com difícil diferenciação entre a região de inoculação e o conjuntivo subjacente.

Na superfície do epitélio do dorso da língua, todos os animais apresentaram leveduras, sem brotamento de tubo germinativo, nas papilas filiformes. No ventre, 4 animais mostraram leveduras sobre o epitélio.

- 4 horas:

A fenda estava praticamente preenchida por leveduras, pseudohifas e leucócitos polimorfonucleares. A partir da filamentação das leveduras mais próximas às células epiteliais, as pseudohifas invadiram a queratina (Fig. 53).

De acordo com a região, observava-se duas situações: intenso infiltrado de polimorfonucleares na camada basal com desorganização tecidual; ou, formação de microabscessos

intraepiteliais suprabasais. O conjuntivo abaixo das regiões epiteliais inoculadas apresentou infiltrado inflamatório discreto, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares e eventuais mononucleares.

Na superfície do epitélio, todos os animais (n=10) apresentaram leveduras aderidas ao dorso da língua, e 5 também no ventre. Um rato teve levedura com filamentação no ventre da língua.

Na microscopia eletrônica, após 4 horas, grande quantidade de polimorfonucleares e alguns com leveduras no seu interior estavam presentes na fenda (Fig.54). O epitélio que circundava a fenda também apresentou infiltração de polimorfonucleares e leveduras no interior das células epiteliais (Fig.55). Pseudohifas presentes entre as células epiteliais, dentro das mesmas e inclusive nas proximidades do núcleo destas células foram observadas (Figs.56 e 57).

No interior da fenda, foram observadas leveduras envolvidas por 2 ou 3 neutrófilos (Figs.58 e 59). Algumas leveduras apresentavam, quando dentro do polimorfonuclear (Fig.60) ou entre eles (Fig.61), vacuolização do citoplasma e alterações da parede celular, sugestivas de necrose da levedura.

- 6 horas:

Em algumas situações, 6 horas após a injeção de C.albicans, observou-se filamentação das leveduras aderidas às células epiteliais, com pseudohifas penetrando na queratina e nas células mais superficiais da camada espinhosa, porém sem a formação de microabscessos (Figs.62 e 63). Por outro lado, observou-se também áreas com leveduras, pseudohifas e intenso infiltrado de polimorfonucleares, com leucócitos degenerados e restos de células epiteliais, caracterizando microabscessos (Fig.64). O conjuntivo subepitelial apresentou discreto infiltrado de polimorfonucleares, com eventuais mononucleares. Na superfície do epitélio, todos os animais (n=10) apresentavam leveduras sobre a queratina. No ventre da língua, 8 ratos mostraram leveduras e 7 pseudohifas penetrando na queratina.

- 8 horas:

As injeções de C.albicans produziram extensos abscessos intraepiteliais contendo leveduras, pseudohifas, restos epiteliais e grande quantidade de polimorfonucleares (Figs.65 e 66). As regiões circunvizinhas ao abscesso, mostraram pseudohifas na queratina ou entre as células epiteliais da camada espinhosa (Figs.66 e 67). Em alguns locais, a camada basal do epitélio permaneceu íntegra (Fig.65), porém em outros, apresentou-se desorganizada, com suas células confundindo-se com o infiltrado leucocitário

(Fig.66). A lâmina própria estava moderadamente infiltrada de polimorfonucleares e alguns mononucleares.

Todos os ratos (n=10) apresentavam C.albicans na superfície das papilas cônicas simples e verdadeiras no dorso da língua. Nas papilas gigantes, 6 animais tinham leveduras aderidas. Na superfície ventral, 8 animais apresentavam leveduras e 6 mostravam pseudohifas na queratina.

- 12 horas:

Após 12 horas da inoculação de C.albicans, abscessos intraepiteliais com leveduras e pseudohifas eram visíveis, porém a camada basal do epitélio permaneceu íntegra (Figs.68 e 69). Pseudohifas estavam presentes também nas células epiteliais que circundavam os microabscessos (Figs.70 e 71).

Nos cortes corados pelo HE, como as pseudohifas não eram facilmente observadas, os polimorfonucleares e restos epiteliais no interior dos microabscessos se destacavam (Fig.72). Alguns microabscessos projetavam-se para a superfície epitelial, com camadas de queratina destacando-se da superfície (Figs.73 e 74). Nos cortes corados pelo Gram, observou-se bactérias, predominando cocos positivos, principalmente nas regiões do microabscesso mais próximas à superfície. No conjuntivo subepitelial havia discreto infiltrado de polimorfonucleares e alguns mononucleares.

Na superfície do epitélio, todos os animais (n=10) apresentavam leveduras na região das papilas cônicas simples e verdadeiras, porém apenas 2 nas gigantes. No ventre da língua, as leveduras estavam presentes em 6 animais e pseudohifas em 3.

- 24 horas:

Após 24 horas das injeções de C.albicans, poucas leveduras e pseudohifas eram visíveis na queratina em relação ao período anterior (12 horas).

O epitélio apresentou regiões de descamação, com pedaços de queratina e massas de pseudohifas destacando-se da superfície (Figs.75 e 76). Cavidades na queratina, contendo restos epiteliais, cocos Gram-positivos, eventuais leveduras, fragmentos de pseudohifas e leucócitos também foram visualizadas (Fig.77). A camada basal correspondente a estas áreas, mostrou hiperplasia, e a lâmina própria subjacente discreto infiltrado inflamatório, com polimorfonucleares e algumas células mononucleares.

Na superfície da queratina, todos animais (n=10) apresentavam leveduras nas papilas cônicas simples e verdadeiras, e 4 nas gigantes. No ventre, 8 ratos apresentaram leveduras e pseudohifas penetrando na queratina.

Na microscopia eletrônica, observou-se 24 horas após as injeções de C.albicans, leveduras e bactérias nas fendas e

dentro das células epiteliais (Figs.78, 79 e 80). As pseudohifas pareciam seguir o longo eixo da célula (Fig.81). As leveduras envolvidas pelas células epiteliais estavam aparentemente íntegras (Fig.82), observando-se a parede celular com camada externa delgada e eletrólúcida e camada interna mais espessa eletrondensa; membrana citoplasmática com invaginações de periodicidade definida; citoplasma com estruturas membranosas em seu interior; núcleo e membrana nuclear (Figs.83 e 84). A camada basal do epitélio, abaixo dos locais da injeção permaneceu íntegra e o conjuntivo subepitelial estava infiltrado por polimorfonucleares e mononucleares (Fig.85).

- 48 horas:

Após 48 horas das injeções de C.albicans, as leveduras e pseudohifas estavam dispersas pela camada de queratina, além de discreto acúmulo de polimorfonucleares entre a queratina e a camada espinhosa, alguns em degeneração. Notou-se também esfoliamento da queratina, com fragmentos de pseudohifas e leveduras (Figs.86 e 87). Algumas áreas mostraram acantose, perda das papilas filiformes e eventual hiperqueratose e hiperplasia da camada basal (Fig.88). A lâmina própria exibiu moderado infiltrado inflamatório mononuclear.

As leveduras estavam presentes na superfície da queratina de 4 ratos no ventre da língua, com filamentação

de pseudohifas. No dorso, todos os animais apresentaram leveduras.

- 7 dias:

Após 7 dias da injeção de C.albicans, observou-se em alguns locais persistência de poucas pseudohifas e leveduras na queratina (Fig.89). O epitélio apresentou perda das papilas filiformes, hiperqueratose, acantose, e por vezes, neutrófilos esparsos pela camada de queratina. No conjuntivo subepitelial predominava infiltrado inflamatório mononuclear intenso.

- 15 dias:

No período de 15 dias o epitélio apresentou discreta acantose e perda de papilas em algumas áreas, principalmente na região anterior às gigantes (Figs.90 e 91). As áreas de acantose eram menos acentuadas que nos períodos de 48 horas e 1 semana. O conjuntivo subepitelial mostrou infiltrado inflamatório mononuclear discreto. Raramente, leveduras ou pseudohifas foram observadas neste período.

Fig. 36 - Aspecto macroscópico do dorso da língua de rato normal. A região das papilas gigantes (G), separa os 2/3 anteriores da língua do tubérculo intermolar (T).
Aumento: 5X.

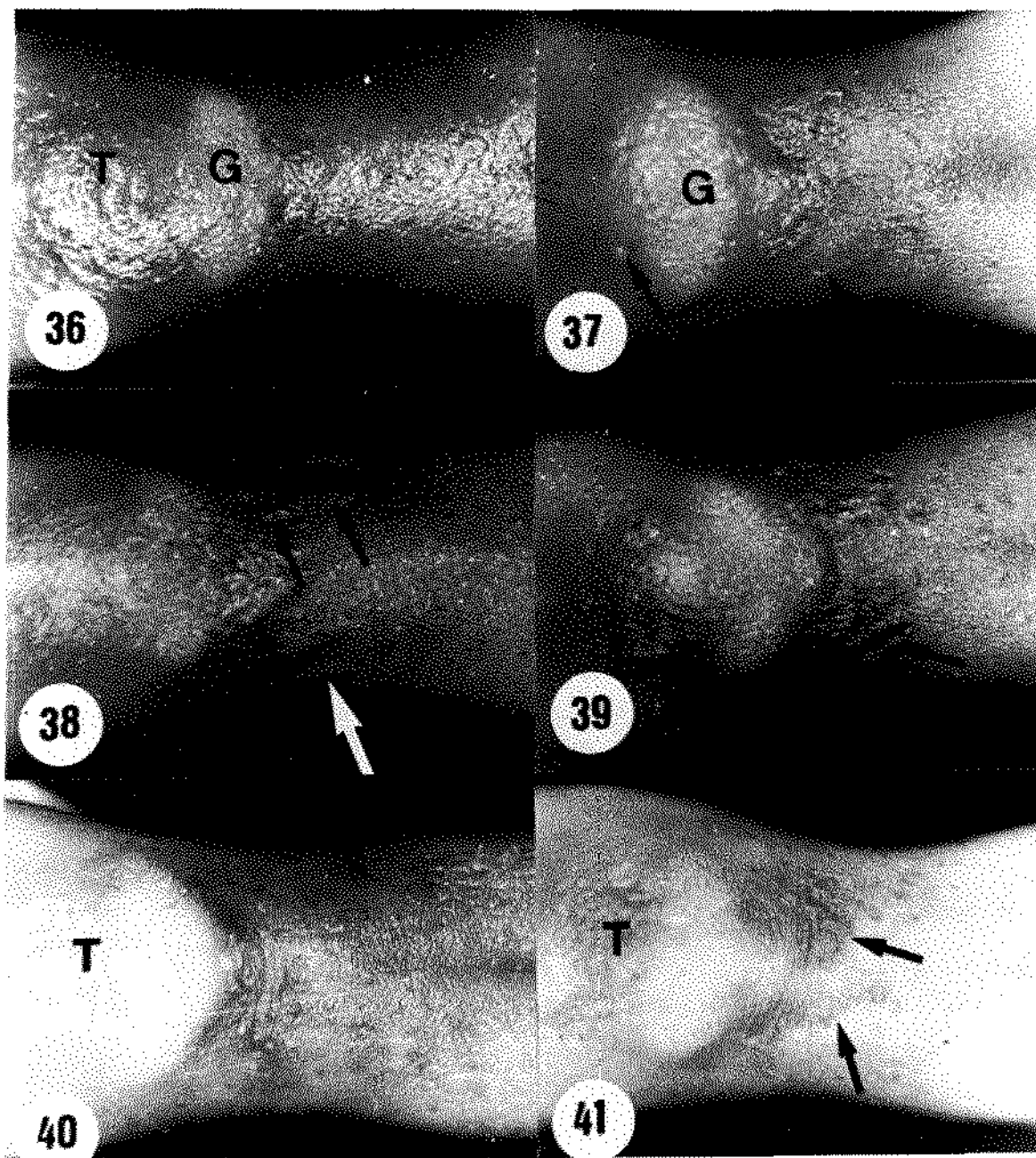
Fig. 37 - Aspecto macroscópico do dorso da língua de rato normal, 1 hora após injeções intraepiteliais de C.albicans na região anterior às papilas gigantes (G) e na região do tubérculo intermolar. Os locais injetados aparecem como discretas linhas, ligeiramente salientes e esbranquiçadas (setas).
Aumento: 5X.

Fig. 38 - Dorso da língua de rato normal, 6 horas após injeções de C.albicans. Os locais injetados apresentam-se como áreas esbranquiçadas e salientes na superfície do dorso da língua (setas).
Aumento: 5X.

Fig. 39 - Dorso da língua de rato normal, 12 horas após injeções de C.albicans. As lesões são evidentes, com depressão central avermelhada e brilhante, circundada por bordos elevados e ligeiramente esbranquiçados (setas).
Aumento: 5X.

Fig. 40 - Dorso da língua de rato normal, 24 horas após injeções de C.albicans. Houve perda de papilas na região anterior ao tubérculo intermolar (T), adquirindo aspecto liso e eritematoso.
Aumento: 5X.

Fig. 41 - Dorso da língua de rato normal, 7 dias após injeções de C.albicans. Algumas áreas despapiladas (setas) estão presentes, anteriormente ao tubérculo intermolar (T).
Aumento: 5X.



Figs. 42A e 42B - Corte sagital da região das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato, 1 hora após a injeção de suspensão de C.albicans. Na figura 42A, observa-se a fenda (*) produzida pela injeção no epitélio, porém os fungos não são visíveis em HE. A figura 42B é maior aumento da anterior, mostrando a fenda (*) produzida pelo trauma da agulha, contendo fibrina e hemácias no seu interior. As leveduras não estão visíveis.
Fig. 42A - Coloração: HE; aumento: 80X.
Fig. 42B - Coloração: HE; aumento: 200X.

Fig. 43A e 43B - Corte sagital da região das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato, 1 hora após a injeção de suspensão de C.albicans. Na figura 43A, os pontos escuros no interior da fenda, representam as leveduras injetadas (setas). Na figura 43B, as leveduras são observadas mais facilmente, algumas produzindo pseudohifas (setas).
Fig. 43A - Coloração: PASH; aumento: 80X.
Fig. 44B - Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 44A e 44B - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 1 hora após inoculação de C.albicans. Na figura 43A, espaço produzido pela suspensão (*), contendo muitas leveduras (setas). Na figura 43B, maior aumento da fenda, mostrando leveduras com brotamento de tubo germinativo (setas).
Fig. 44A - Coloração: PASH; aumento: 200X.
Fig. 44B - Coloração: PASH; aumento: 400X.

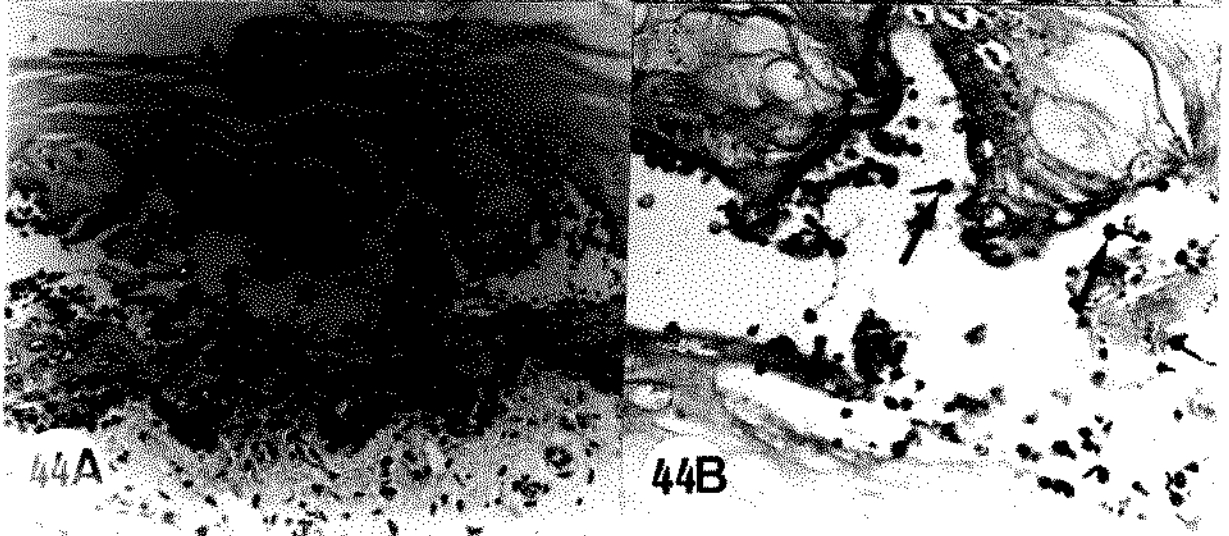
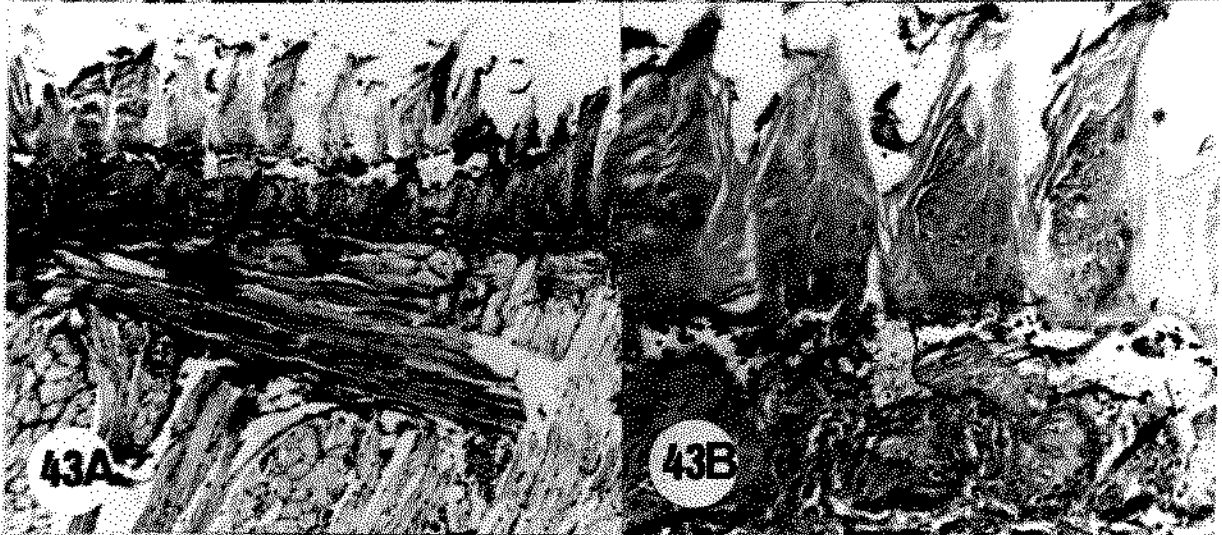
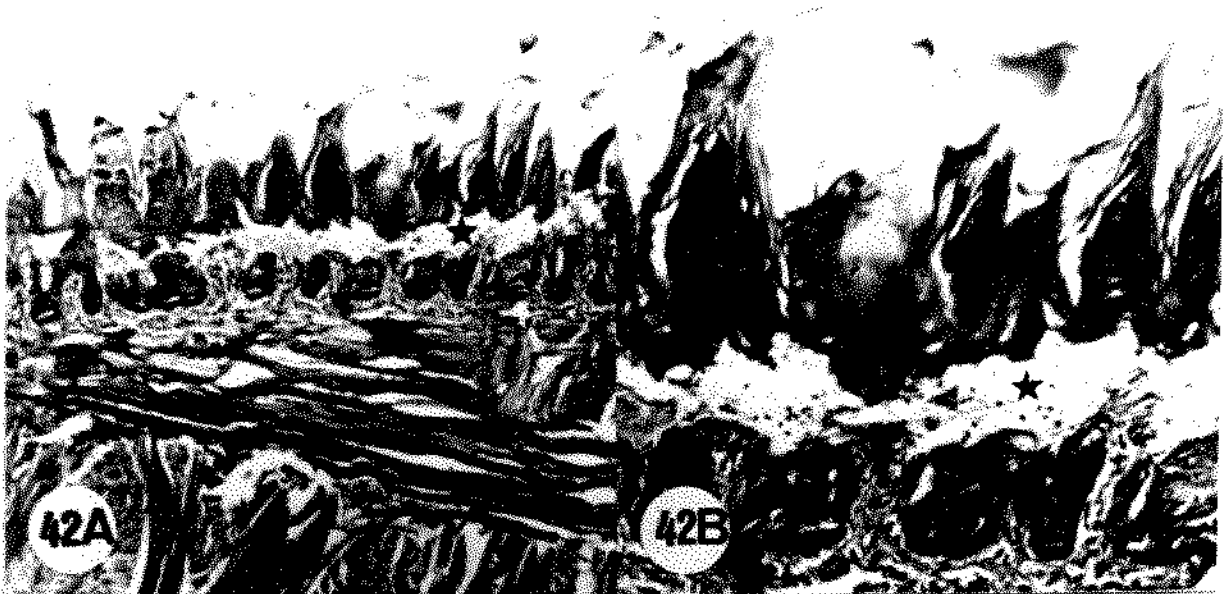


Fig. 45 - Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio do dorso da língua de rato, 1 hora após a inoculação intraepitelial de C. albicans. No espaço (*) produzido pela injeção da suspensão, observa-se células epiteliais alteradas e leveduras (L), uma das quais com formação de tubo germinativo (seta). MET, aumento: 8000X.

Fig. 46 - Fenda (*) produzida pela injeção intraepitelial de C. albicans, mostrando uma levedura (L) sobre a superfície de uma célula epitelial (E). A camada eletrondensa mais externa da parede celular da levedura está em contato com a superfície da célula epitelial, formando uma pequena depressão na mesma. MET, aumento: 8000X.

Fig. 47 - Leveduras (L) aderidas através da camada eletrondensa mais externa da parede celular à célula epitelial (E), formando depressões na mesma, uma hora após inoculação de C. albicans. MET, aumento: 10000X.

Fig. 48 - Célula epitelial (E) da língua de rato, 1 hora após inoculação de C. albicans, envolvendo levedura (L). Há pequeno espaço (*) entre a camada mais externa da levedura e a célula epitelial. MET, aumento: 10000X.

Fig. 49 - Célula epitelial (E) da língua de rato, 1 hora após inoculação de C. albicans. Observa-se levedura com tubo germinativo (G), com extremidade do brotamento em contato com a superfície da célula epitelial (seta). MET, aumento: 10000X.

Fig. 50 - Fenda produzida no epitélio da língua de rato, 1 hora após inoculação de C. albicans. Uma levedura (L) tem o tubo germinativo (*) envolvido parcialmente pela célula epitelial (E). MET, aumento: 10000X.

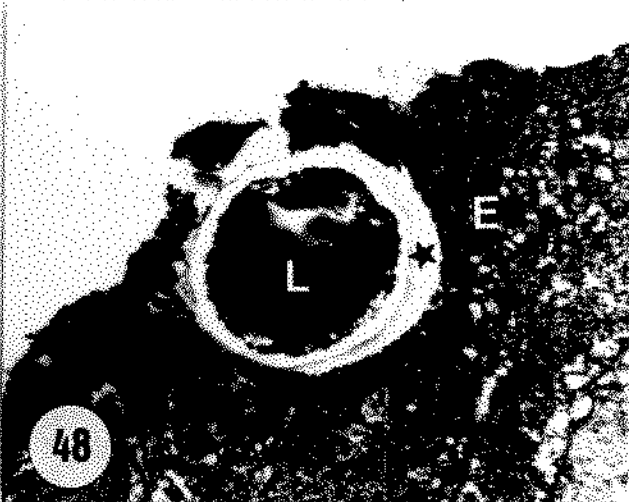
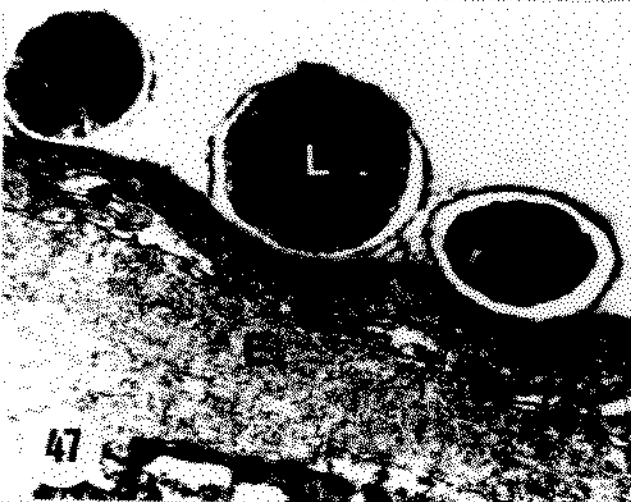
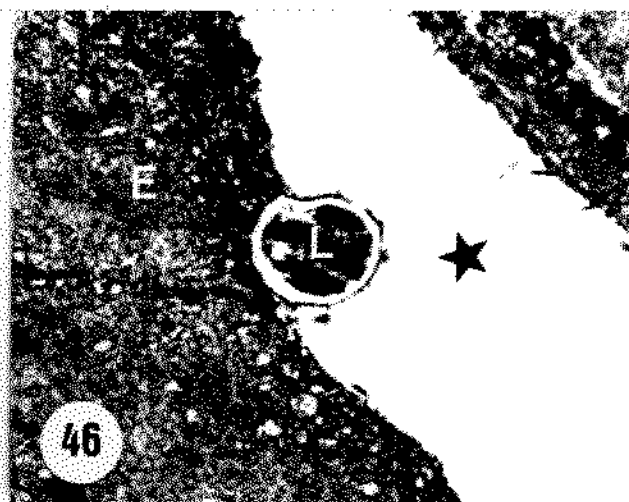
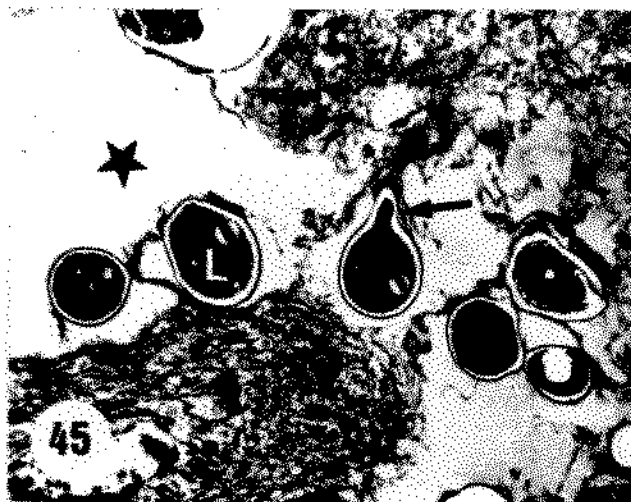


Fig. 51 - Corte sagital das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 2 horas após a injeção de C.albicans. A fenda (*) produzida pela suspensão contém leveduras.
Coloração: Gomori-Grocott; aumento 120X.

Fig. 52 - Corte sagital das papilas cônicas simples do dorso da língua de ratos, 2 horas após a inoculação de C.albicans. Nos locais da injeção (*), observa-se leveduras livres e próximas às células epiteliais. Pseudohifas são visíveis na queratina (setas). Leveduras (L) estão presentes também na superfície da queratina.
Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 53 - Corte sagital das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 4 horas após a inoculação de C.albicans. O espaço produzido pela injeção (*) contém leveduras e pseudohifas (setas) penetrando no epitélio. Entre a fenda e a camada basal do epitélio há 2 microabscessos intraepiteliais (M).
Coloração: PASH; aumento: 200X.

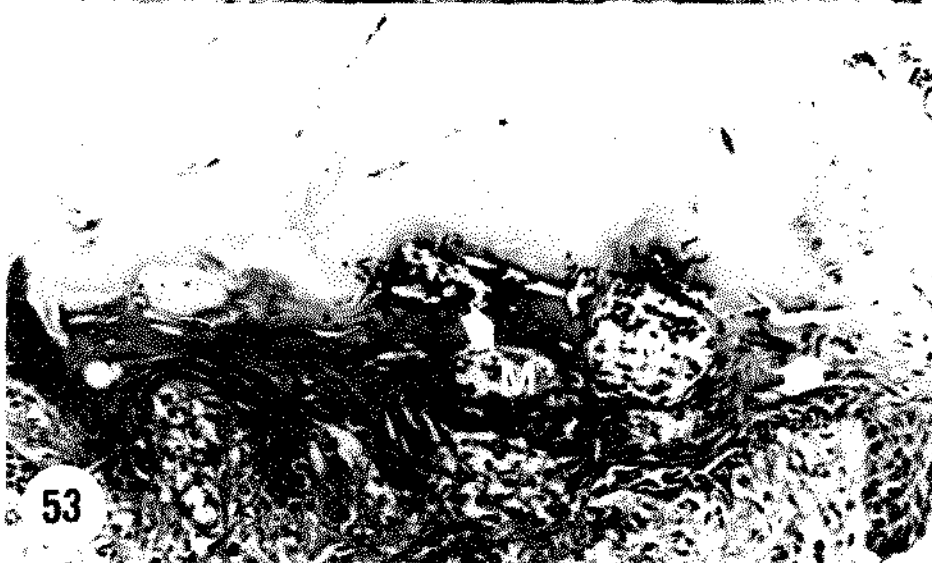
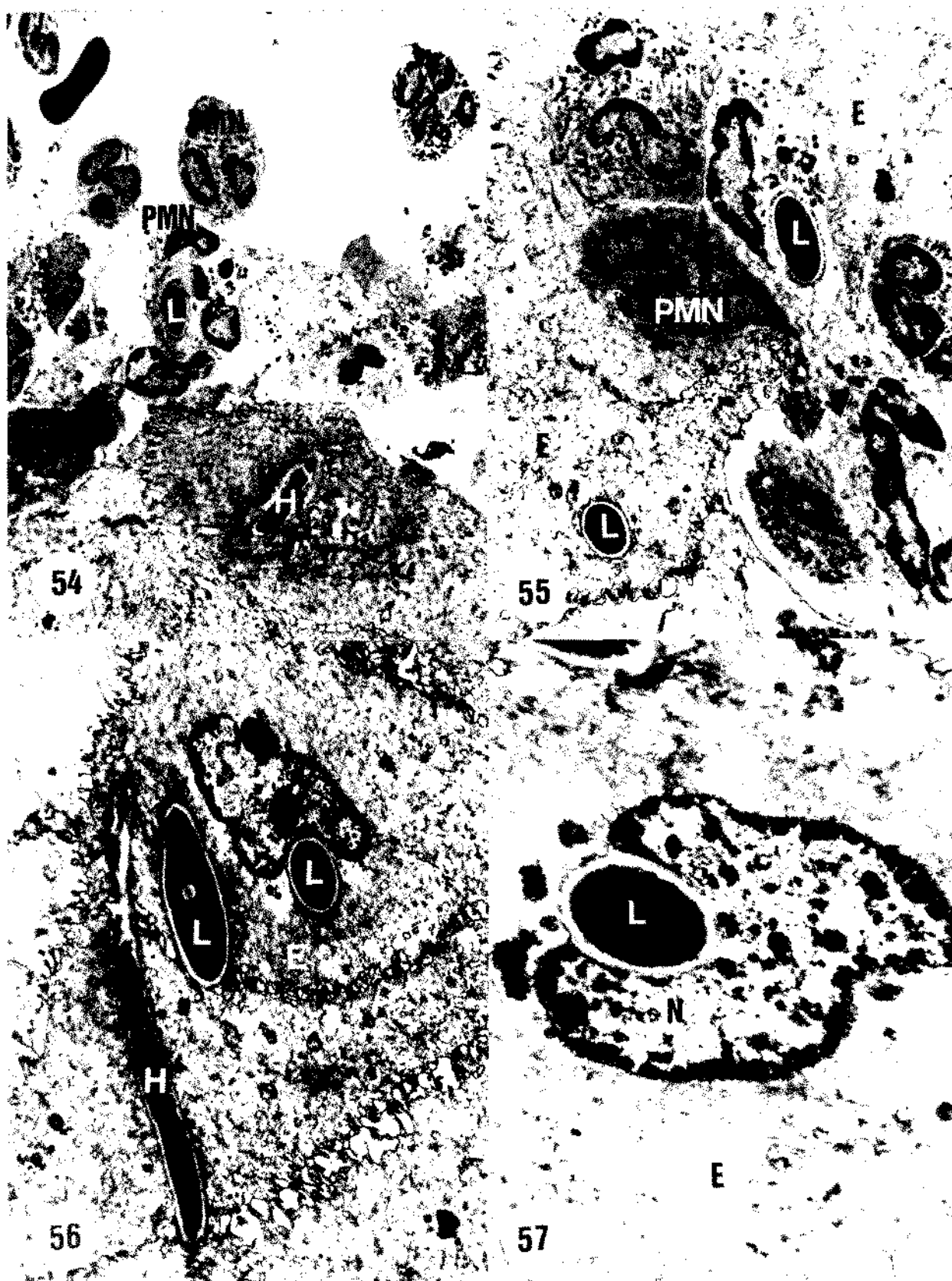


Fig. 54 - Microscopia eletrônica de transmissão do dorso da língua de rato, 4 horas após a injeção intraepitelial de suspensão de C.albicans. Observa-se células epiteliais (E), uma das quais com pseudohifa (H) no seu interior e acúmulo de polimorfonucleares (PMN), alguns contendo Candida no interior (L).
MET, aumento: 5000X.

Fig. 55 - Epitélio do dorso da língua de rato, 4 horas após a injeção intraepitelial de suspensão de C.albicans. Observa-se leveduras (L) no interior das células epiteliais (E) e infiltração de polimorfonucleares (PMN), alguns contendo levedura no interior.
MET, aumento: 7500X.

Fig. 56 - Epitélio do dorso da língua de rato, 4 horas após injeção de C.albicans. Observa-se leveduras (L) dentro da célula epitelial e uma pseudohifa (H) entre duas células.
MET, aumento: 10000X.

Fig. 57 - Célula epitelial do dorso da língua de rato (E), 4 horas após injeção de C.albicans, contendo levedura (L) próxima ao núcleo (N), provocando depressão na membrana nuclear.
MET, aumento: 12500X.



Figs. 58 e 59 - Dorso da língua de rato, 4 horas após inoculação intraepitelial de C.albicans. Dois polimorfonucleares (PMN) estão envolvendo uma levedura. A parede celular da levedura está íntegra, existindo espaço entre a camada mais externa da parede e a superfície do polimorfonuclear.
MET, aumento: 10000X.

Fig. 60 - Dorso da língua de rato, 4 horas após inoculação de C.albicans. A levedura (L), dentro do polimorfonuclear, mostra vacuolização intracelular, eletromdensidade e estrutura da parede celular diferente do normal.
MET, aumento: 12000X.

Fig. 61 - Dorso da língua de rato, 4 horas após inoculação intraepitelial de C.albicans. Levedura mostrando vacuolização intracelular e parede celular alterada, está envolvida por 2 ou 3 polimorfonucleares.
MET, aumento: 12000X.



Fig. 62 - Corte sagital do dorso da língua de rato, 6 horas após inoculação de C.albicans. A fenda (*) produzida pela injeção mostra leveduras (setas) aderidas à queratina, a partir das quais as pseudohifas (H) invadiram a mesma.
Coloração: PASH; 200X.

Fig. 63 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de ratos, 6 horas após a inoculação intraepitelial de C.albicans. Nas fendas (*) produzidas pela injeção, as leveduras estão aderidas às células epiteliais, formando pseudohifas (setas).
Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 64 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de ratos, 6 horas após a injeção intraepitelial de C.albicans. Leveduras, pseudohifas e acúmulo de polimorfonucleares, alguns já degenerados formam microabcesso intraepitelial (M). Na camada de queratina acima do microabcesso, observa-se pseudohifas (H) e leveduras (setas).
Coloração: PASH; aumento 200X.

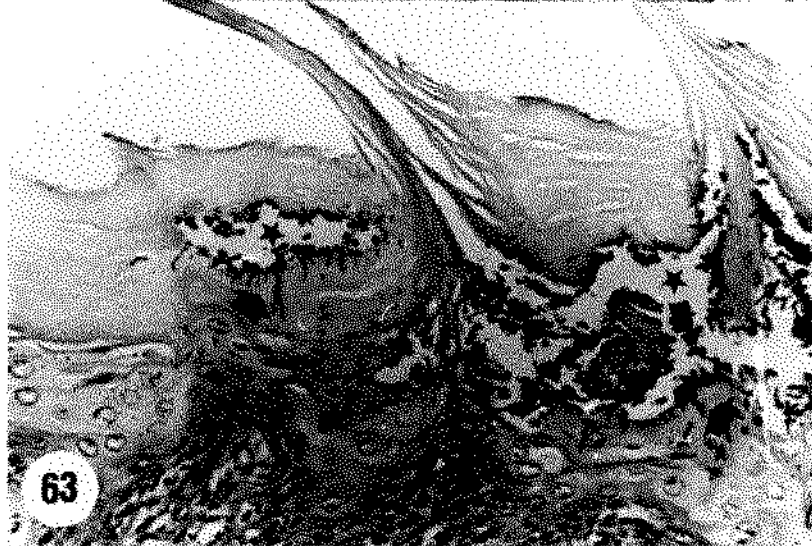
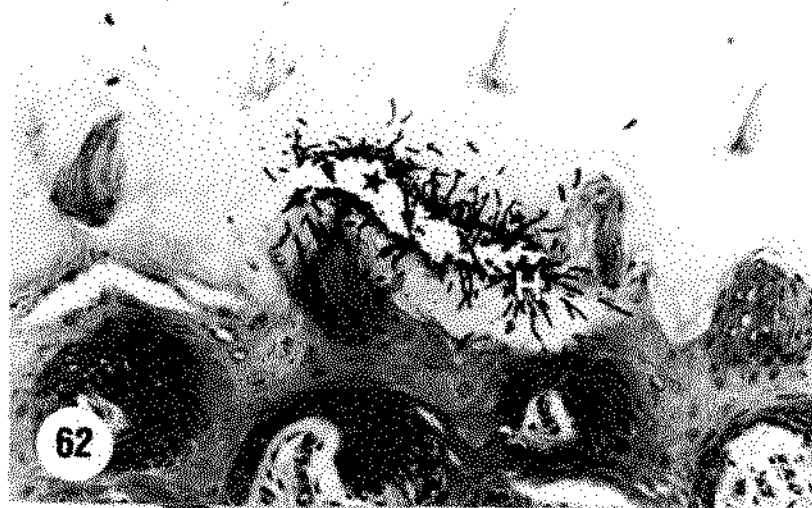


Fig. 65 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 8 horas após a inoculação de C. albicans. Observa-se microabcesso intraepitelial (M), ao lado da fenda (*) produzida pela injeção, contendo leveduras e pseudohifas. A queratina e a camada espinhosa estão invadidas por pseudohifas, porém a camada mais interna permanece íntegra.

Coloração: PASH; aumento: 80X.

Fig. 66 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 8 horas após inoculação de C. albicans. Observa-se intensa proliferação de pseudohifas (setas) e formação de microabcesso (M). A camada basal está desestruturada e infiltrada de leucócitos da lâmina própria.

Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 67 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato. Após 8 horas da injeção de C. albicans, a parte mais superficial do epitélio começa a destacar-se, liberando o conteúdo da fenda produzida pela inoculação. Observa-se grande quantidade de pseudohifas (setas) na queratina e na camada espinhosa, e microabcesso intraepitelial (M).

Coloração: PASH; aumento: 200X.

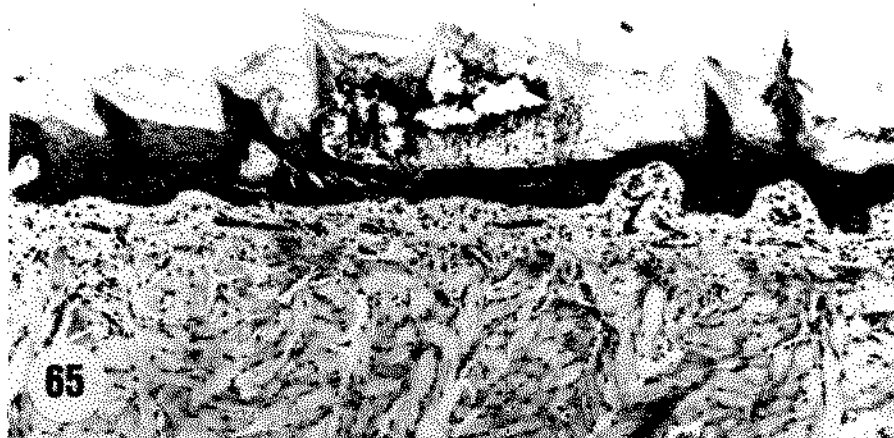
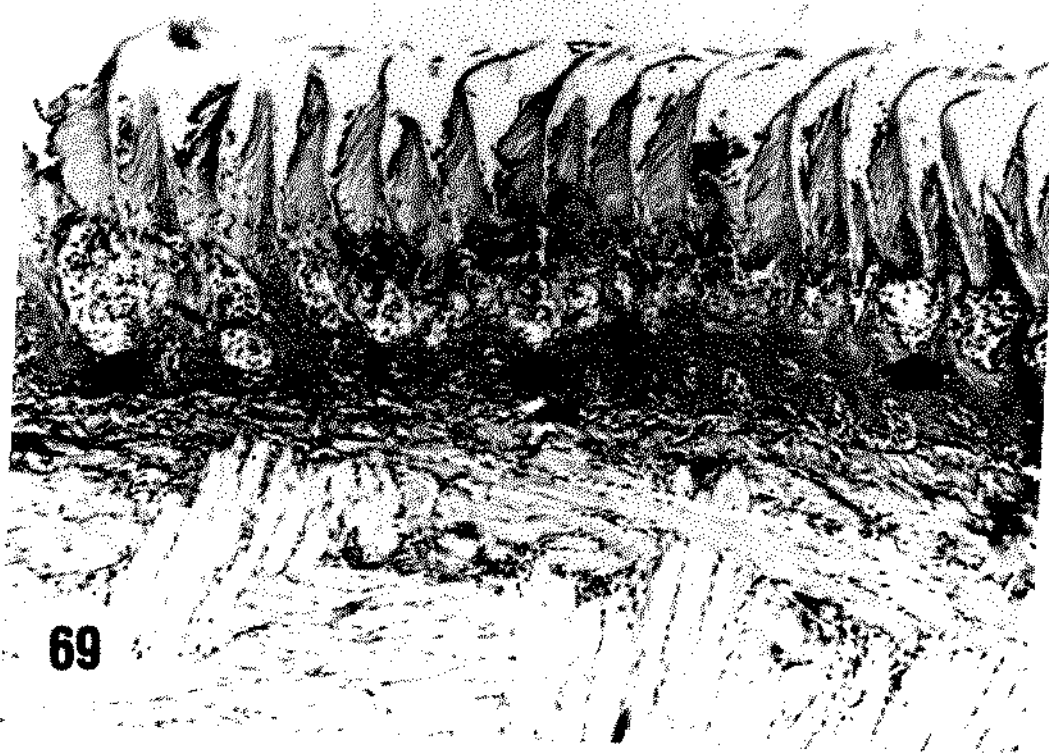


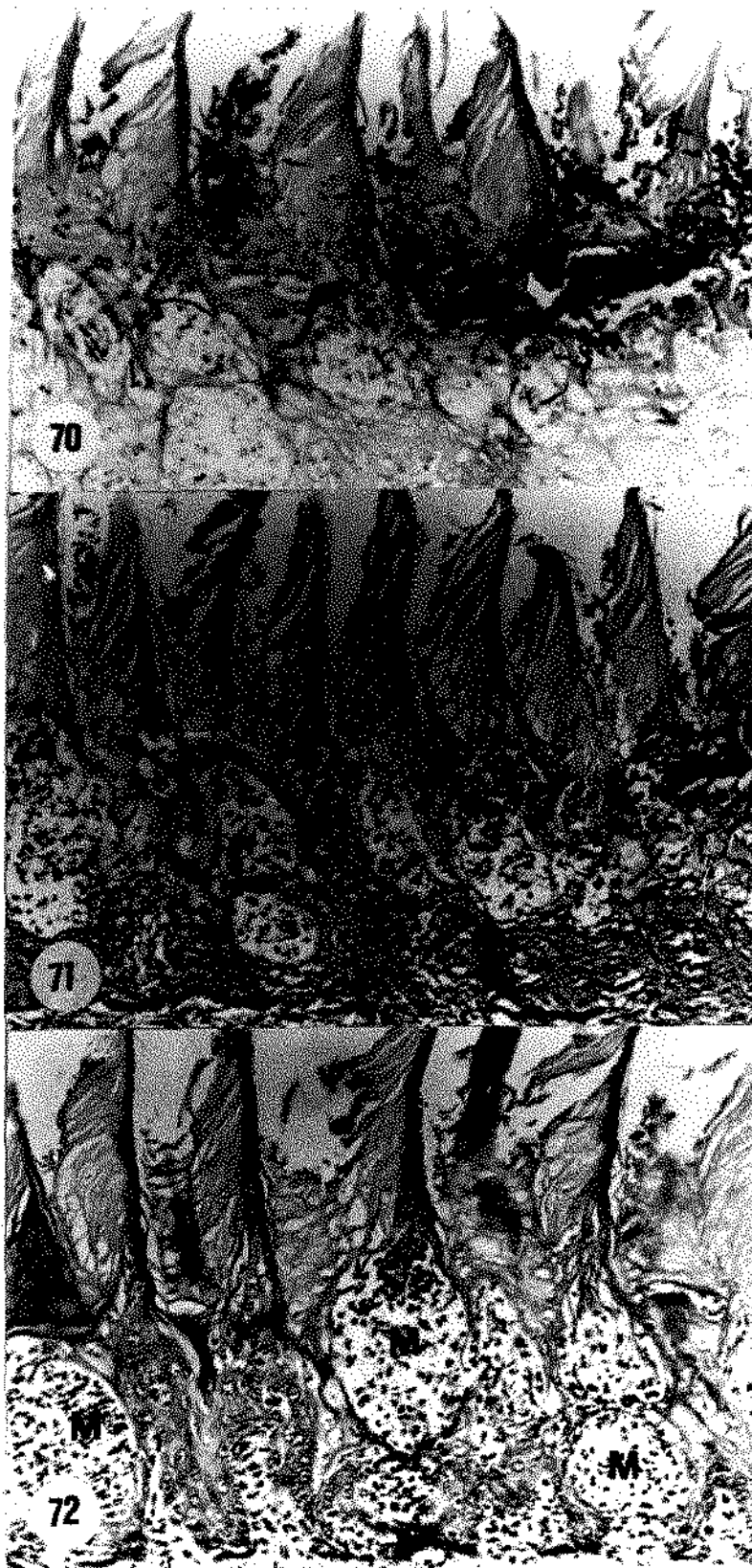
Fig. 68 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 12 horas após a injeção de C.albicans. Extenso microabcesso intraepitelial (M), com massa de leveduras e pseudohifas é visível, porém a camada basal do epitélio permanece íntegra. As pseudohifas estão presentes também no epitélio que circunda o microabcesso.
Coloração: PASH; aumento: 120X.

Fig. 69 - Corte sagital da região das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato, 12 horas após a injeção de C.albicans. Observa-se intensa proliferação de pseudohifas e formação de microabcessos intraepiteliais múltiplos (setas).
Coloração: PASH; aumento: 120X.



Figs. 70, 71 e 72 - Corte sagital da região das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato, 12 horas após a injeção de *C.albicans*. Na figura 70 a impregnação pela prata evidencia as leveduras e intensa proliferação de pseudohifas no epitélio. Na figura 71, leveduras, pseudohifas e os microabcessos intraepiteliais são visíveis. Na figura 72, como as leveduras e pseudohifas não estão coradas, observa-se mais nitidamente os microabcessos intraepiteliais (M).

Fig.70 - Coloração: Gomori-Grocott; aumento: 200X.
Fig.71 - Coloração: PASH; aumento: 200X.
Fig.72 - Coloração: HE; aumento: 200X.



Figs. 73 e 74 - Corte sagital da região das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato, 12 horas após a injeção de C.albicans. Observa-se microabcesso intraepitelial (M) abaixo da intensa proliferação de pseudohifas (H). Na figura 74, maior aumento da anterior, observa-se que a camada mais superficial da queratina começando a destacar-se, com o possível início de exteriorização do microabcesso (M).

Fig. 73 - Coloração: PASH; aumento: 120X.

Fig. 74 - Coloração: PASH; aumento: 300X.

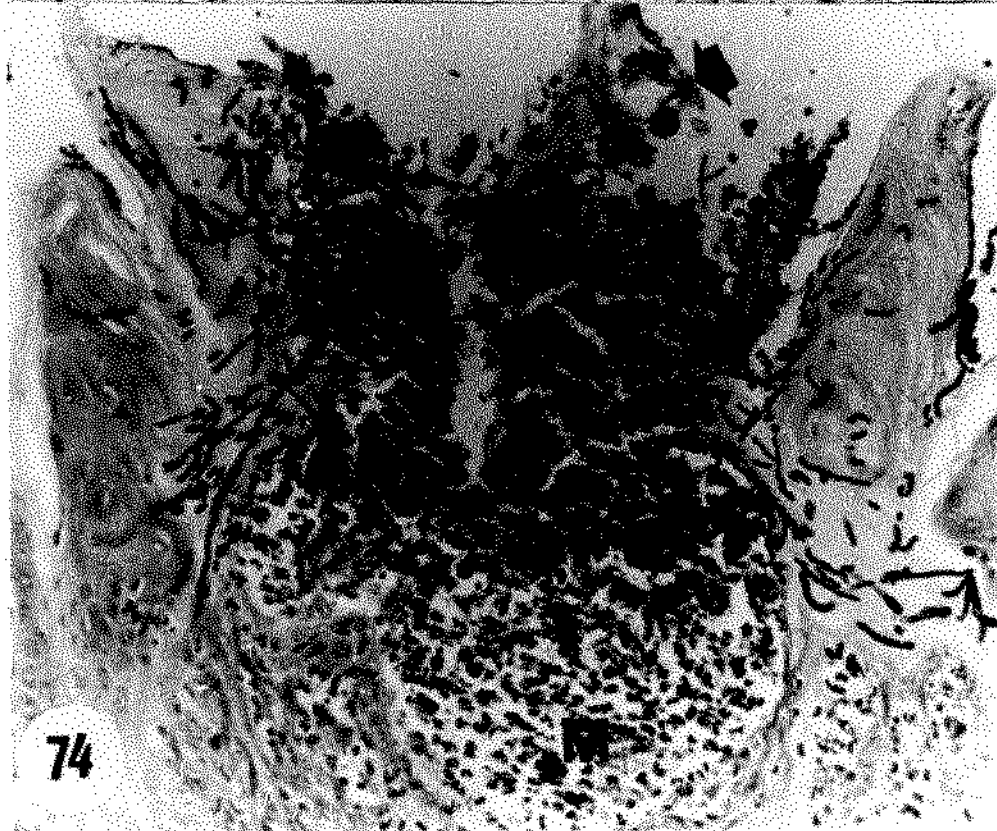
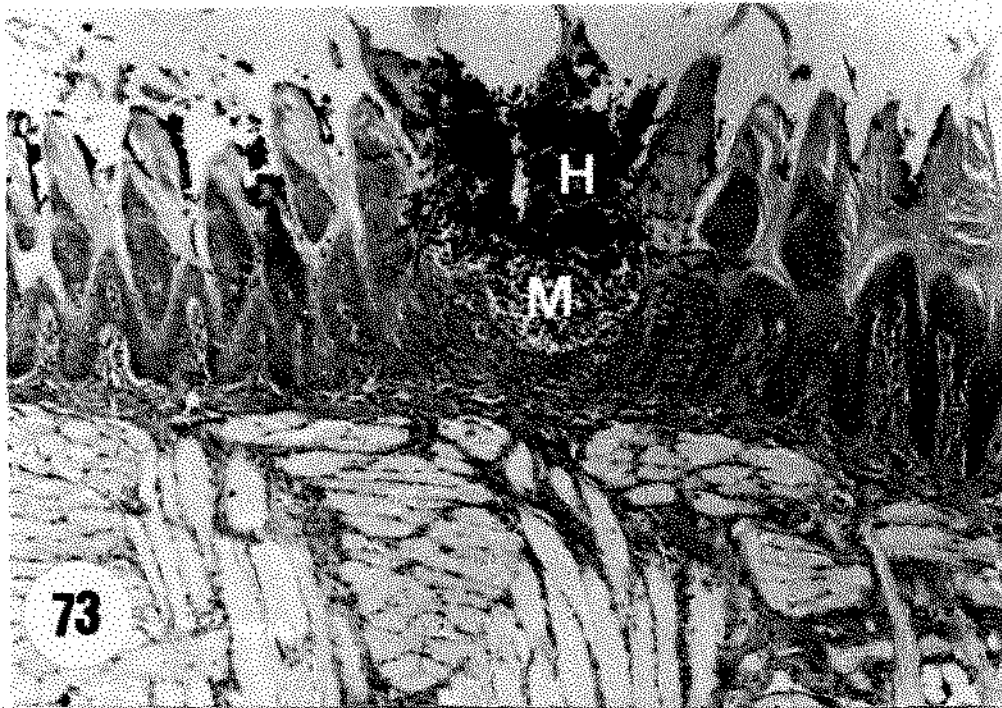


Fig. 75 - Corte sagital da região das papilas cónicas simples do dorso da língua de rato, 24 horas após injeção de C. albicans. A queratina (Q) contendo massas de pseudohifas (setas) está destacando-se do epitélio.
Coloração: PASH; aumento: 80X.

Fig. 76 - Maior aumento da figura acima, mostrando a intensa proliferação de pseudohifas (H) na queratina (Q) e os microabscessos intraepiteliais (*). Pedacos de queratina e massas de pseudohifas estão descamando-se da superfície.
Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 77 - Corte sagital da região das papilas cónicas simples do dorso da língua de rato, 24 horas após a inoculação de C. albicans. Observa-se pseudohifas e leveduras na queratina, e o envolvimento bacteriano (setas) no processo.
Coloração: PASH; aumento: 200X.

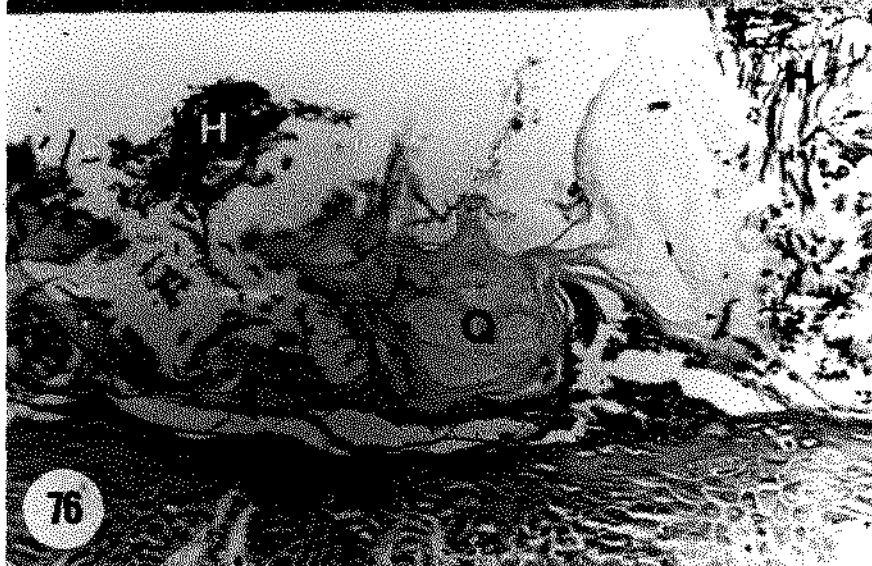
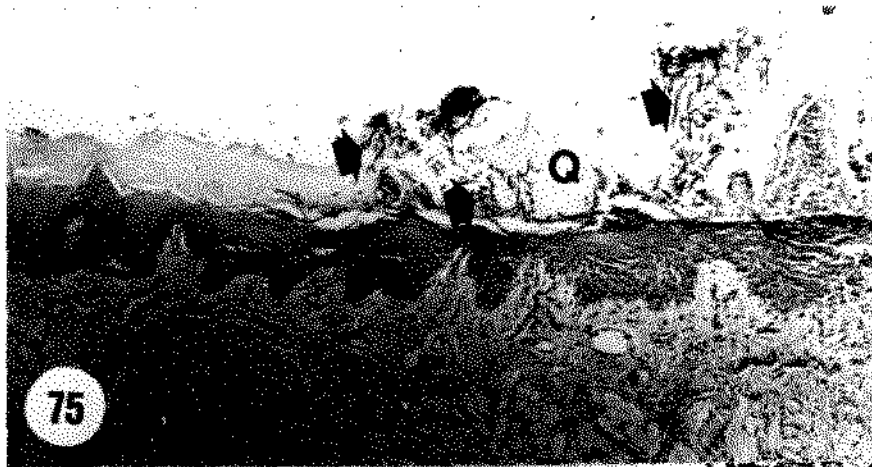


Fig. 78 - Dorso da língua de rato normal, 24 horas após a injeção intraepitelial de C.albicans. A fenda (*) produzida pela agulha contém bactérias (setas) e algumas leveduras (L) dentro das células epiteliais.

MET; aumento: 3000X.

Fig. 79 - Dorso da língua de rato, 24 horas após injeção intraepitelial de C.albicans. Observa-se o espaço produzido entre as células epiteliais (E) com bactérias (setas) e leveduras (L) na superfície e dentro da célula epitelial.

MET; aumento: 3200X.

Fig. 80- Dorso da língua de rato, 24 horas após injeção intraepitelial de C.albicans. Observa-se leveduras (L) e bactérias (setas) aderidas às células epiteliais e uma pseudohifa (H) penetrando entre as células epiteliais.

MET; aumento: 5000X.

Fig. 81 - Dorso da língua de rato, 24 horas após injeção intraepitelial de C.albicans. A pseudohifa (H) dentro de célula epitelial (E) está aparentemente seguindo o longo eixo da célula. A célula em contato com a pseudohifa tem eletrondensidade e aspecto granular diferente das células adjacentes.

MET; aumento: 8000X.



Fig. 82 - Epitélio do dorso da língua de rato, 24 horas após a injeção intraepitelial de C.albicans. Observa-se levedura (L) envolvida por duas células epiteliais (E).

MET; aumento: 16000X.

Fig. 83 - Levedura dentro de célula epitelial do dorso da língua de rato, 24 horas após a injeção intraepitelial de C.albicans. A parede celular (PC) é eletrônolúcida; o citoplasma (C) contém estruturas membranosas (setas) e um vacúolo (V). O núcleo (N) está na porção central da célula.

MET; aumento: 50000X.

Fig. 84 - Levedura dentro de célula epitelial (E) do dorso da língua de rato, 24 horas após a injeção intraepitelial de C.albicans. A parede celular (PC) mostra camada externa mais fina e eletrondensa e camada interna mais espessa e eletrônolúcida. A periodicidade definida da membrana citoplasmática está evidente (setas). O material nuclear (N) ocupa quase todo o citoplasma (C).

MET; aumento: 40000X.

Fig. 85 - Microscopia eletrônica da camada basal do epitélio do dorso da língua de rato que recebeu injeção intraepitelial de C.albicans. As células epiteliais da camada basal estão integras, e no conjuntivo subjacente (C) observa-se polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN).

MET; aumento: 2500X.

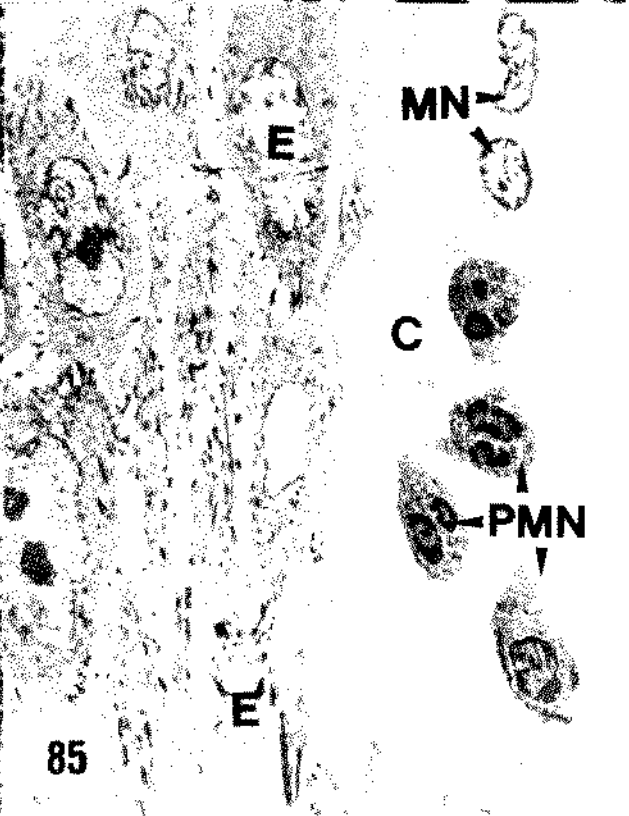
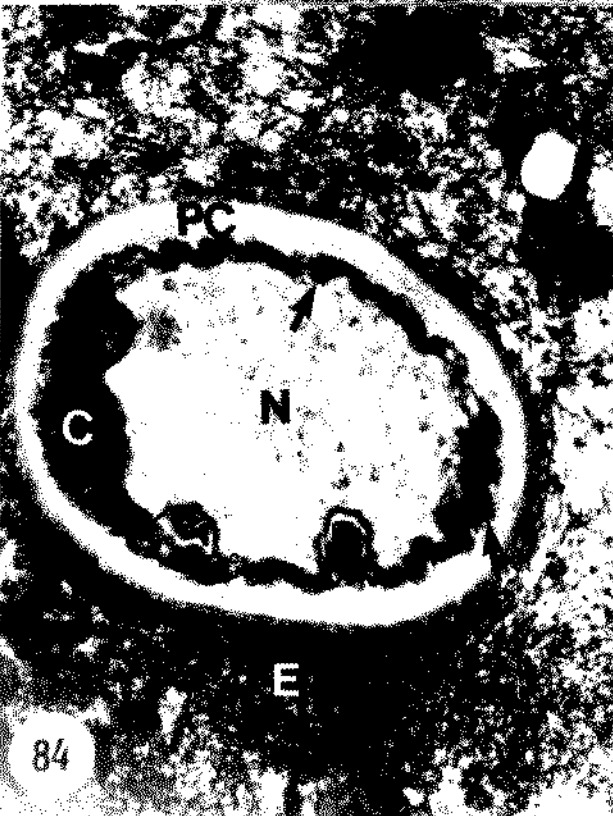
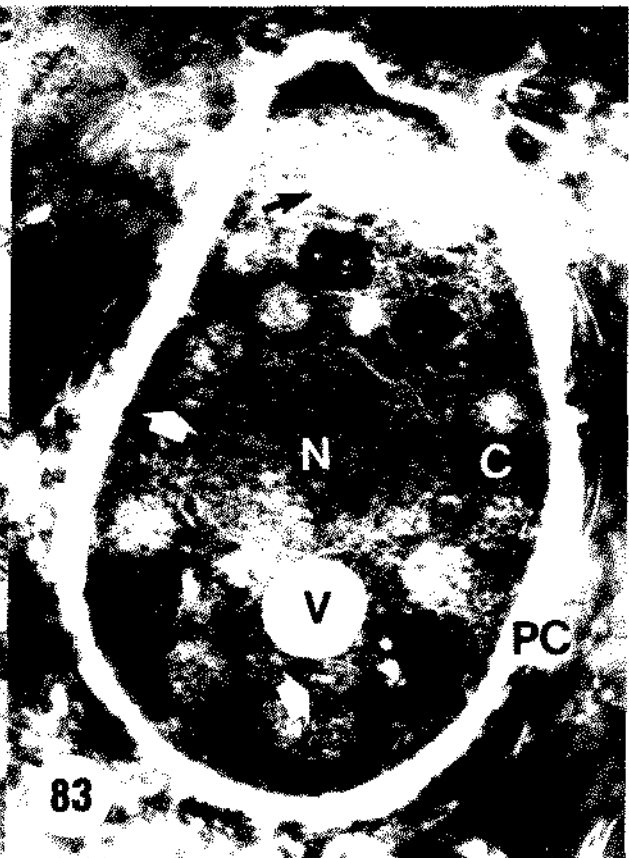


Fig. 86 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 48 horas após a injeção de C.albicans. Observa-se pseudohifas na queratina e perda das papilas na região. Em algumas áreas, nota-se esfoliamento da queratina, com fragmentos de pseudohifas e leveduras (setas). Coloração: PASH; aumento: 80X.

Fig. 87 - Maior aumento da figura acima, mostrando pseudohifas fragmentadas (H) que persistiram na queratina. O epitélio (E) apresenta-se acantótico. Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 88 - Corte sagital da região das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato, 48 horas após a injeção de C.albicans. Observa-se pseudohifas fragmentadas na queratina e perda das papilas na área (seta). O epitélio (E) mostra acantose e discreta hiperqueratose. Coloração: PASH; aumento: 80X.

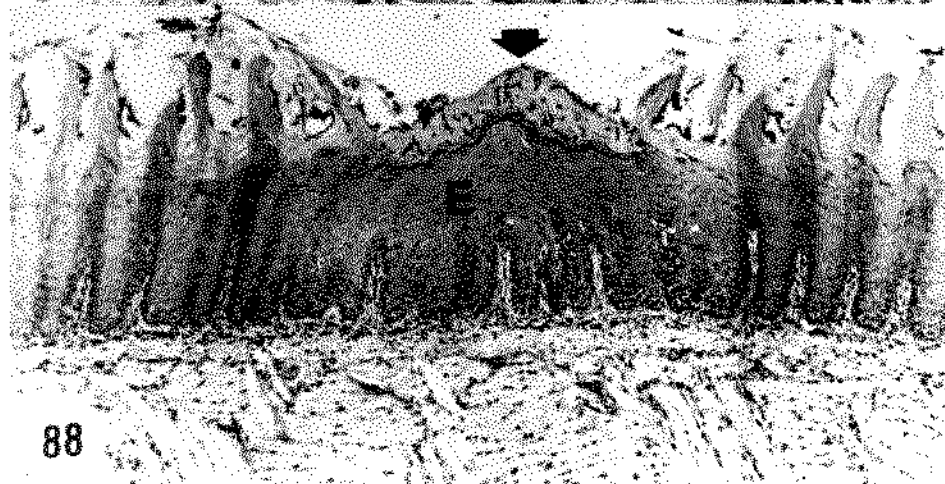
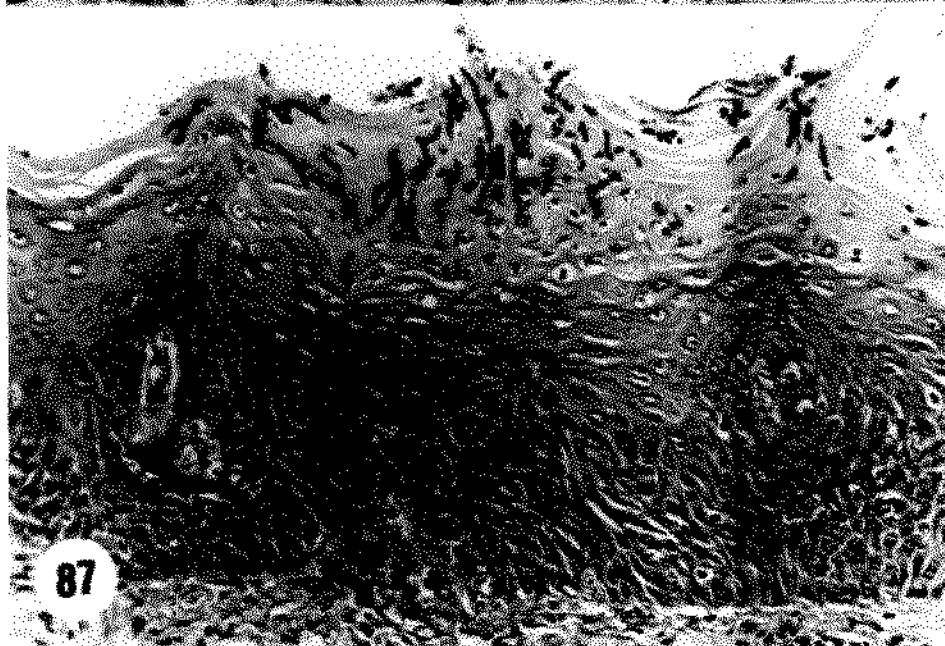
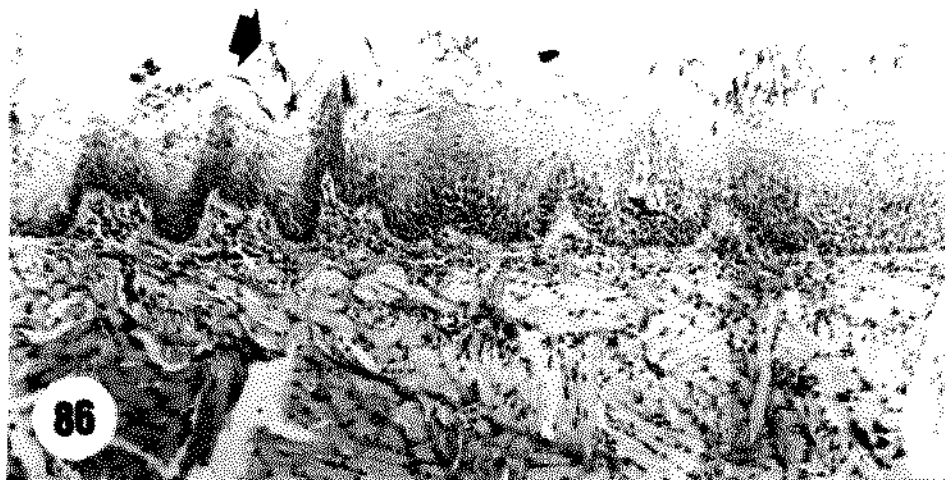
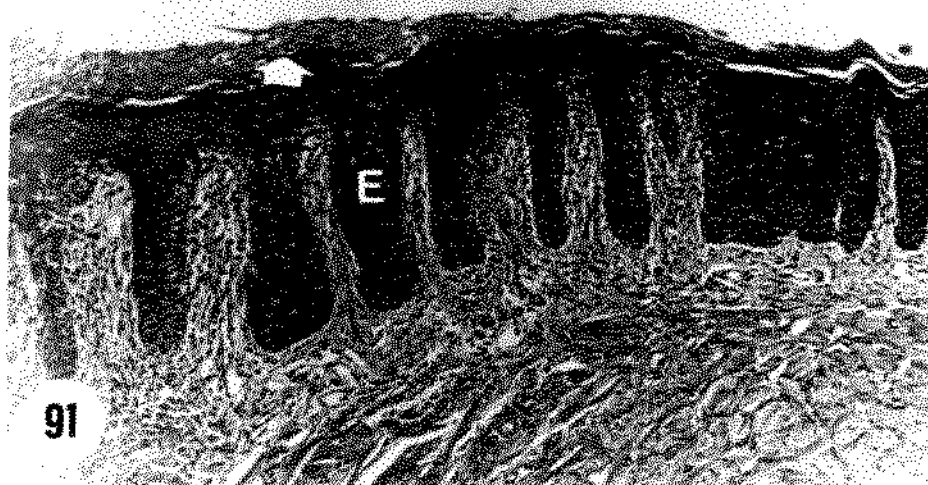
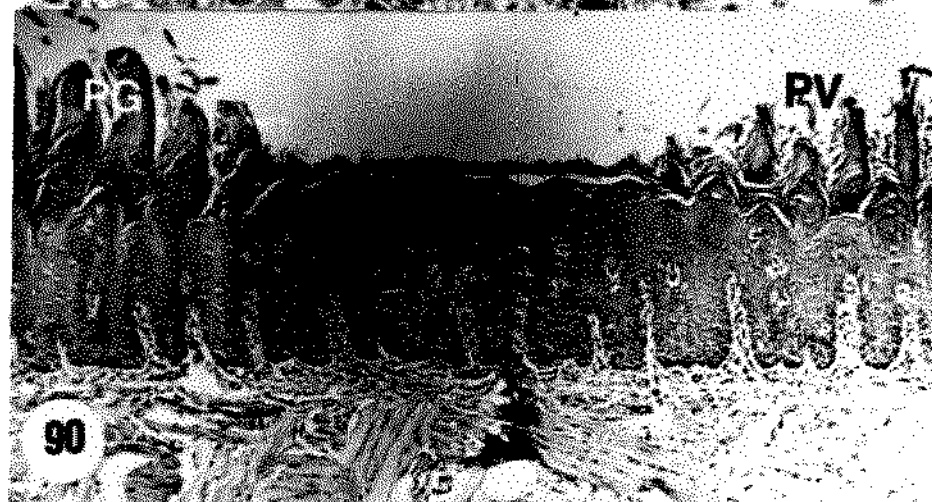
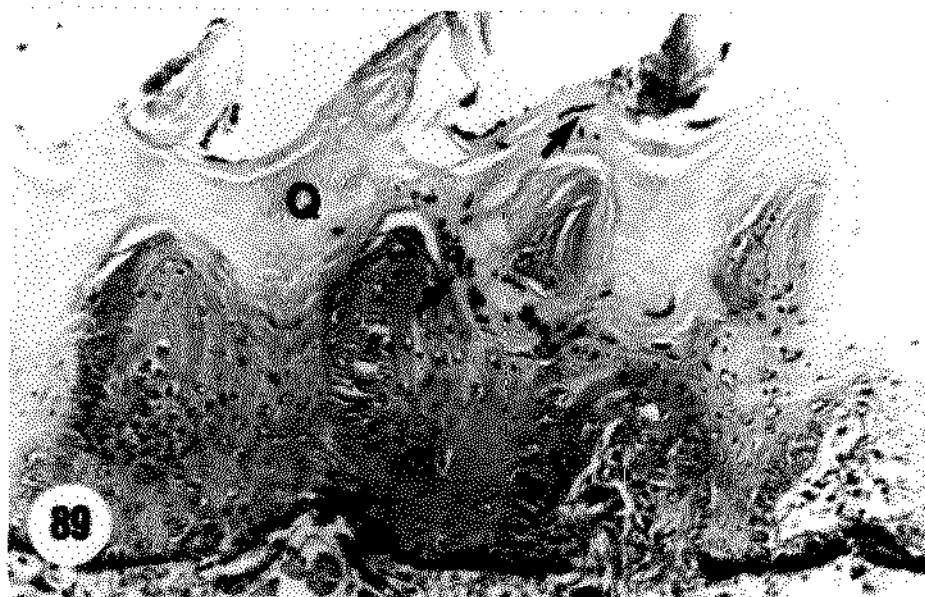


Fig. 89 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 7 dias após a inoculação de C.albicans. Observa-se presença de poucas pseudohifas e leveduras (setas) na queratina (Q).
Coloração: PASH; aumento: 200X.

Fig. 90 - Corte sagital da região das papilas verdadeiras do dorso da língua de rato, 15 dias após a inoculação de C.albicans. Observa-se Área de perda de papilas verdadeiras (PV), logo após as gigantes (PG), e acantose do epitélio, porém pseudohifas e ou leveduras não são mais visíveis.
Coloração: HE; aumento: 80X.

Fig. 91 - Corte sagital da região das papilas cônicas simples do dorso da língua de rato, 15 dias após a inoculação de C.albicans. Observa-se região despapilada. O epitélio (E) apresenta-se acantótico, com infiltrado de polimorfonucleares na queratina, porém leveduras e pseudohifas não são mais visíveis.
Coloração: HE; aumento: 80X.



D I S C U S S I O

DISCUSSÃO

1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA LINGUA E DO PALATO
DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Após a sialoadenectomia, as mucosas do palato e da língua dos ratos não apresentaram alterações visíveis macro e microscopicamente, como descrito por ITO (1990). Hiperqueratose do epitélio lingual, assim como alterações nas papilas valadas, descritas por NANDA e CATALANOTTO (1981) em ratos sialoadenectomizados, não foram observadas no presente trabalho. A cavidade bucal dos animais apresentava-se seca e com muitos resíduos de alimentos aderidos aos dentes. Os aspectos morfológicos do palato e da língua, tanto nos ratos normais como nos sialoadenectomizados, apresentaram-se semelhantes e de acordo com os descritos em diversos trabalhos (KUTUZOV e SICHER, 1952; CLEATON-JONES, 1971, 1972 E 1976; McMILLAN, 1974; BRADY e cols., 1975; KASTER e CAMERON, 1978).

Em seres humanos a xerostomia tem sido associada a atrofia da mucosa bucal, em particular no dorso da língua (WALLACE e PETRUSNECK, 1985). Isto sugere que a mucosa do rato é mais resistente que a humana, e realmente lesões frequentes no homem, como aftas, não ocorrem no rato. Sabe-se também que a mucosa do rato é mais resistente a

carcinomas espontâneos ou provocados experimentalmente (WALLENIIUS, 1966).

No dorso da língua dos ratos normais, as bactérias localizavam-se na superfície convexa das papilas filiformes, geralmente não ocorrendo nas superfícies côncavas, regiões interpapilares e papilas fungiformes (BRADY e cols., 1975; KASTER e CAMERON, 1978). Nos ratos sialoadenectomizados, a localização das bactérias seguiu o mesmo padrão dos normais, porém o número de microrganismos, apesar de não ter sido quantificado, foi aparentemente superior em alguns animais, com a presença de bastonetes Gram-positivos, que ocorrem em número muito reduzido nos ratos normais. Na porção faríngeana da língua dos ratos sialoadenectomizados a quantidade de bactérias estava também, aparentemente aumentada.

Alterações na microbiota bucal ocorrem em pacientes xerostômicos. Aumento na proporção de Streptococcus e Lactobacillus, assim como acidificação do pH da saliva foi observado em pacientes submetidos à radioterapia (LLORY e cols., 1971). BROWN e cols. (1975) estudando os efeitos da xerostomia provocada por radiação na microbiota bucal, observaram aumento na quantidade de S. mutans, espécies de Lactobacillus, Candida (principalmente C. albicans) e Staphylococcus; e, decréscimo no número de S. sanguis, espécies de Neisseria e Fusobacterium. KEENE e FLEMING

(1987) relataram aumento nos níveis de Lactobacillus e S.mutans em pacientes xerostômicos.

A instalação de microrganismos como o S.sobrinus e A.viscosus, é prontamente aumentada em ratos sialoadenectomizados, com consequente aumento nas cáries coronária e de raiz (BOWEN e cols., 1988a). Elevada microbiota acidogênica com alta virulência (incluindo S.sobrinus) é selecionada em ratos sialoadenectomizados, sendo transmitida mais rapidamente quando colocados em gaiolas juntos com animais normais, os quais passam a apresentar maiores níveis de cáries de superfícies lisas (BOWEN e cols, 1988b; MADISON e cols., 1989 e 1990).

2 PRESENÇA DE Candida albicans NA
BOCA DE RATOS NORMAIS

As leveduras do gênero Candida estavam presentes em 17,06% das bocas dos ratos normais, porém a espécie C.albicans foi isolada em apenas 3,41% do total dos animais examinados (381 ratos). OLSEN e BONDEVICK (1978) encontraram C.albicans em 30 de 38 ratos examinados, porém a maioria dos autores não relata a presença da levedura na cavidade bucal de ratos (RUSSEL e JONES, 1973a e b; ALLEN e cols., 1982 e 1985; ALLEN e BECK, 1983 e 1987; RENNIE e cols., 1983; HASSAN e cols., 1985). Por outro lado, a espécie C.albicans é considerada comensal de superfícies mucosas do trato gastro-intestinal de pássaros e mamíferos (ODDS, 1979, 1980 e 1984; ROGERS e BALLISCH, 1980), podendo portanto ser encontrada na cavidade bucal de ratos. Além disso, como o gênero possui 196 espécies catalogadas (MEYER e cols., 1984), cuja morfologia e aspecto colonial nem sempre podem ser diferenciados, os ratos que apresentavam leveduras não foram usados neste trabalho, para evitar eventuais interferências nos resultados.

3 SIALOADENECTOMIA, QUANTIFICAÇÃO DE SALIVA
NA BOCA DE RATOS E SUSPENSÃO DE
Candida albicans UTILIZADA

A remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores, produziu acentuada xerostomia nos animais, sendo a quantidade de saliva coletada reduzida em aproximadamente 75%, nos ratos submetidos a cirurgia. No homem, os sintomas de xerostomia ocorrem quando o fluxo salivar é reduzido em 40 a 50% do volume normal (FOX e cols., 1985; DAWES, 1987). Os 25% de saliva residuais dos ratos xerostômicos, provavelmente foram produzidos pelas glândulas salivares menores, localizadas principalmente no palato mole e na região posterior da língua, que são essencialmente mucosas e responsáveis pela produção de mais de 70% da mucina presente na saliva total. A saliva dos animais sialoadenectomizados era mais viscosa, devido, provavelmente, a maior quantidade relativa de mucina. Sabe-se que a retirada unilateral da parótida, sublingual e submandibular provoca aumento de volume das glândulas restantes, e é provável, embora ainda não demonstrado, que após a sialoadenectomia das glândulas maiores ocorra maior atividade das menores. Em casos de aplasia das glândulas salivares em humanos, é comum a presença de glândulas menores no lábio e palato, e da alta viscosidade da saliva (MacDONALD e cols., 1986). No homem, 7 a 8% da saliva total correspondem à contribuição das

glândulas menores (DAWES e WOOD, 1973), responsáveis pela produção de mais de 70% da mucina presente na saliva (TABAK e cols., 1982), a qual representa barreira efetiva contra bactérias e ressecamento da mucosa bucal (TABAK e cols., 1982; GREEN e EMBERY, 1984), controla a permeabilidade tecidual (ADAMS, 1974) e dificulta a penetração de agentes carcinogênicos no epitélio (STORMBY e WALLENIUS, 1964). Por outro lado a saliva diminui a taxa de absorção de água e outras substâncias pela mucosa bucal de ratos normais, sendo maior a quantidade de corante fluorescente que penetra na mucosa de ratos xerostômicos, mesmo na presença de mucina produzida pelas glândulas menores (DEAN e HIRAMOTO, 1986).

WALLENIUS (1966) obteve quantidade 9 vezes maior de saliva em ratos normais, após estimulação com pilocarpina que nos sialoadenectomizados. Com a metodologia usada neste trabalho a coleta com algodão deve ter absorvido maior quantidade da saliva mais viscosa dos ratos sialoadenectomizados, difícil de ser coletada pelo método de WALLENIUS, que obtiveram 0,8 a 0,9ml de saliva por minuto, coletando de 5 a 15 minutos após injeção de pilocarpina em ratos normais pesando 260 a 280 gramas, e medindo em tubos calibrados. Nossos resultados revelaram aproximadamente 0,4ml de saliva por minuto nos normais e 0,1 nos xerostômicos, porém os animais pesavam de 230 a 250 gramas e a coleta iniciou-se imediatamente após a injeção da pilocarpina. Outro fator importante na diferença dos

resultados, é que WALLENIIUS colocava os ratos em suporte inclinado no qual ficavam com a cabeça mais baixa e a saliva era coletada em tubos; posição contrária à usada neste trabalho, na qual a cabeça do animal ficava inclinada para cima e mais alta que o corpo, o que provavelmente dificultou que secreções respiratórias e digestivas, que ocorrem após uso da pilocarpina, se misturassem à saliva. BERNADE e cols. (1956) relataram produção de 0,1 a 0,25 ml de saliva por minuto em ratos adultos após uso da pilocarpina, porém não citam o peso corporal dos animais e não fazem mensuração em ratos sialoadenectomizados. WALLENIIUS (1966) obteve xerostomia total, por período de 8 horas, associando a sialoadenectomia com a administração de metilescopolamina (1mg/Kg peso corporal), 3 vezes por semana, com períodos de descanso de 48 horas entre as injeções. Optamos neste trabalho por usar animais apenas sialoadenectomizados, com acentuada xerostomia, porém não total, pois o uso de uma droga poderia interferir nos resultados.

A cirurgia de remoção das glândulas salivares maiores, não propiciou a presença de leveduras do gênero Candida nos animais, sem que a mesma fosse inoculada. Em todos os ratos sialoadenectomizados, foi verificada a presença de Candida antes do início dos experimentos, o que resultou sempre negativo. Como os ratos sialoadenectomizados não foram colocados com ratos que apresentavam C.albicans na cavidade bucal, não ocorreu transmissão da levedura e os animais

continuaram negativos. Possivelmente, assim como ocorre com o S.sobrinus (MADISON e cols., 1989 e 1990), a transmissibilidade da C.albicans também seja aumentada em ratos sialoadenectomizados inoculados com a levedura, sugerindo que estudos sobre a transmissibilidade de C.albicans em ratos xerostômicos sejam realizados.

A amostra F-72 de C.albicans utilizada no presente trabalho, foi isolada de paciente com estomatite por prótese total e apresentou alta letalidade para camundongos por via endovenosa (SHIMIZU, 1990). Além disso, é produtora de proteinase, hialuronidase, condroitin-sulfatase e fosfatase, enzimas consideradas como fatores de virulência. Amostras de C.albicans produtoras de maior quantidade de proteinase, apresentam maior aderência às células epiteliais bucais humanas (RÜCHEL e cols., 1982; RÜCHEL, 1984; BARRETT-BEE, 1985; CASSONI e cols., 1987; KONDOH e cols., 1987; BORG e RÜCHEL, 1988), são mais patogênicas para camundongos (GHANNOUM e ELTEEN, 1986; NEELY e HOLDER, 1990), e possuem maior aderência e poder de invasão na pele de camundongos (RAY e PAYNE, 1988). Hialuronidase e condroitin-sulfatase produzidas por microrganismos bucais são considerados fatores de patogenicidade na doença periodontal (HERSHON, 1971; TAM e cols., 1982; DAHLÉN e cols., 1983; SHIMIZU e ALMEIDA, 1989). A produção de fosfolipase por amostras de C.albicans é considerada também fator de virulência para o homem e animais (SAMARANAYAKE e cols., 1984; BARRETT-BEE e

cols., 1985; SOUZA, 1988). O grau de virulência das amostras de C.albicans é diverso na razão direta da presença da hialuronidase, condroitin-sulfatase, proteinase e fosfolipase, em suas variadas combinações; amostras produtoras das 4 enzimas são mais virulentas que as que não produzem uma ou mais dessas enzimas (SHIMIZU, 1990).

A quantidade de C.albicans usada nas inoculações bucais neste trabalho, foi de aproximadamente 5×10^6 células viáveis, dose que os animais suportaram bem, não ocorrendo alterações sistêmicas visíveis clinicamente. A maioria dos autores utiliza inóculos bucais de 0,1 a 0,2 ml de suspensões contendo 10^7 (JONES e RUSSELL, 1974; RUSSELL e JONES, 1975 e 1976; ALLEN e cols., 1982; ALLEN e BECK, 1983 e 1987) ou 10^6 células viáveis de C.albicans (JONES e ADAMS, 1970; RUSSELL e JONES, 1973a e b; RUSSELL e LAY, 1973; FISHER e cols., 1982a e b).

A padronização do número de células viáveis de C.albicans nas suspensões utilizadas nas inoculações, foi feita em câmara de Neubauer, após prévia coloração com corante vital, conforme descrito por vários autores (JONES e ADAMS, 1970; ALBANO e SCHMITT, 1973; FISHER e cols., 1982a e b; REED e cols., 1990). Por outro lado, vários trabalhos relatam a padronização do número de microrganismos em contagens de unidades formadoras de colônias/ml (PHILLIPS e BALISH, 1966; SOFAER e cols., 1982; ALLEN e cols., 1982; HOLBROOK e cols., 1983; ALLEN e BECK, 1983 e 1987). Em 50

das suspensões padronizadas através da câmara de Neubauer, foram realizadas diluições e contagens das unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em Agar Sabouraud dextrose, para confirmação do número de leveduras que estava sendo inoculado. Como a média obtida em 50 contagens foi de $5,71 \times 10^6$ UFC/ml de C. albicans, com desvio padrão de 2,64, considerou-se que o método de contagem em câmara de Neubauer foi mais rápido, de maior facilidade de execução e possibilitou ainda, o cálculo de número de células da suspensão, antes do inóculo.

4 PERSISTÊNCIA DE Candida albicans NA BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Exposição experimental de pacientes não portadores, a altas doses de C.albicans, tanto na forma de levedura como de pseudohifa, geralmente não resulta em colonização bucal; a instalação de candidose provavelmente resulta de alterações na resistência do hospedeiro muito mais que a exposição de altas doses de C.albicans (WATSON e KROONE, 1981). O uso de antibióticos também predispõe a candidose em humanos (OKSALA, 1990). Em animais, o uso de antibioticoterapia por via oral, facilita a instalação da C.albicans no intestino de camundongos (HUPPERT e cols., 1955; KENNEDY e VOLZ, 1983) e na boca de ratos e camundongos (ALLEN e cols., 1982 e 1985; HOLBROOK e cols., 1983; RENNIE e cols., 1983; ALLEN e BECK, 1983 e 1987). RUSSELL e JONES (1973a), relataram recuperação de C.albicans em todos os ratos normais 7 e 14 dias após última inoculação da levedura com o uso de antibióticos. Neste trabalho, após a administração inicial de cloridrato de tetraciclina e 3 inoculações de C.albicans, todos os ratos normais apresentaram culturas positivas para a levedura durante 2 dias, enquanto que nos xerostômicos a C.albicans persistiu em todos os animais até 50 dias após a última inoculação. Após 30 dias de inoculação, a recuperação de C.albicans na boca de ratos apresenta resultados variáveis de 30 a 86% na

literatura (RUSSELL e JONES, 1975; RUSSELL e cols., 1976; FISHER e cols., 1982a), sendo que nos dados deste trabalho a levedura persistiu em 50% dos animais normais. Após 90 dias, RUSSELL e JONES (1975) encontraram 48,3% de culturas positivas para C.albicans, porém com inoculações semanais e uso contínuo de antibiótico, enquanto em nossos resultados após 50 dias da última inoculação, a levedura não foi mais recuperada de nenhum animal normal. Por outro lado, nos ratos xerostômicos o microrganismo persistiu até a 18ª semana em 4 dos 6 animais examinados (66,6%).

ALLEN e cols.(1985) relataram 100% de culturas positivas da segunda a quarta semanas que os ratos receberam inoculações semanais de C.albicans, com ou sem administração de tetraciclina, ocorrendo diminuição nas contagens de colônias após a sexta semana e manutenção do microrganismo. Nossos resultados demonstram apenas 33,3% de isolamento da C.albicans em ratos normais após 6 semanas, entretanto os animais não receberam inoculações semanais do microrganismo o que justifica tal diferença de resultados. Entretanto nos animais xerostômicos, nossos resultados demonstraram números mais elevados de colonização da C.albicans em relação aos normais, e a partir da quinta semana, diminuição no número de microrganismos e manutenção da levedura em 60% dos animais sialoadenectomizados até o final do experimento (18 semanas). JONES e ADAMS (1970), não observaram variações na recuperação de C.albicans da boca de ratos que tiveram

redução do fluxo salivar com droga (hyoscine), 24 horas e 4 dias da última inoculação, encontrando a levedura em todos os animais. Os autores, entretanto, não obtiveram xerostomia constante nos animais, não quantificaram a levedura e verificaram a presença da Candida apenas até 4 dias após o último inóculo.

A metodologia utilizada neste trabalho para verificar a recuperação de C.albicans na boca de ratos, foi semiquantitativa, já que a quantidade de material coletado com o "swab" foi considerado como 0,05 ml, a partir do qual foram realizadas as diluições. Apesar do método parecer-nos seguro, visto que ocorreu a repetição dos mesmos resultados em diversas coletas (da 9ª até a 18ª semanas) e os resultados foram seguramente superiores nos ratos sialoadenectomizados, seria interessante um estudo mais detalhado, utilizando-se de método quantitativo para se determinar a permanência de C.albicans em ratos sialoadenectomizados.

5 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE Candida albicans
EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA

C.albicans observada em microscopia eletrônica de transmissão a partir de cultura em ágar Sabouraud dextrose, apresentou-se semelhante ao descrito na literatura por diversos autores (BAKERSPIGEL, 1964; CAWSON e RAJASINGHAM, 1972; MARRIE e COSTERTON, 1981).

Quando leveduras de C.albicans foram observadas na superfície do epitélio da língua de ratos, dois tipos de aderência às células ocorreram: íntima associação com a superfície epitelial, sem a presença de espaço entre a levedura e a célula, formando em algumas situações, depressões na mesma; ou então aderência ao epitélio, com presença de matriz entre a C.albicans e a célula, o que está de acordo com o descrito por diversos autores (HOWLETT e SQUIER, 1980; MARRIE e COSTERTON, 1981).

As pseudohifas que penetraram no epitélio, observadas neste trabalho, apresentavam crescimento intracelular, aparecendo em determinadas situações perto ou cruzando as junções intercelulares das células epiteliais, conforme descrito por CAWSON e RAJASINGHAM (1972).

6 APLICAÇÃO DE Candida albicans COM "SWAB" NA
BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

A aplicação com "swab" de C. albicans na língua de ratos normais e sialoadenectomizados, apresentou resultados histologicamente semelhantes 1 e 2 horas após inoculação da levedura. Não se observou Candida no interior do epitélio e a quantidade de leveduras aderidas às células epiteliais da língua não mostrou diferenças entre os grupos. Após 1 hora da inoculação todos os ratos apresentaram grande número de células sobre o dorso da língua, havendo alta variabilidade entre os animais do mesmo grupo, o que dificultou a interpretação. Além disso, em microscopia de luz, não foi possível distinguir leveduras aderidas ou simplesmente sobrepostas à membrana das células epiteliais.

A aderência às células epiteliais bucais é importante fator para a colonização das mucosas por bactérias (GIBBONS e VAN HOUTE, 1971; GIBBONS, 1973; VAN HOUTE, 1983). Sabe-se que as bactérias bucais são influenciadas pelas glicoproteínas salivares na aderência seletiva às superfícies do esmalte e ao epitélio bucal (KOOP e cols., 1987), e que as glândulas mucosas menores, preservadas neste estudo, são as principais secretoras destas substâncias. A C. albicans possui capacidade de aderência às células epiteliais bucais "in vitro" (KING e cols., 1980; SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1981; SOREL e cols., 1981; MACURA

e cols., 1983; DARWAZEH e cols., 1991), sendo a adesão aumentada quando as células são pré-incubadas com saliva (SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1981, 1982a e 1982b; GHANNOUM e cols., 1990; DARWAZEH e cols., 1991). Apesar do papel da saliva na adesão das leveduras ser pouco conhecido, parece que componentes específicos da saliva podem mediar tal adesão (YDON e cols., 1989). Por outro lado, a presença de IgA na saliva pode inibir a adesão de C.albicans às células epiteliais bucais (EPSTEIN e cols., 1982; VUDHICHAMNONG e cols., 1982). Pré-tratamento de peças acrílicas em saliva mista não estimulada, reduziu a adesão de C.albicans "in vitro" (McCOURTIE e cols., 1986b). Em humanos, a aderência da C.albicans às células epiteliais é dependente também da variabilidade individual das células coletadas (KING e cols., 1980).

A microbiota bacteriana indígena também interfere na adesão das leveduras (LILJEMARK e GIBBONS, 1973). Pré-exposição de células HeLa a Streptococcus salivarius reduzem a adesão de Candida às mesmas, entretanto, pré-exposição com S.mutans não apresentou redução significativa na adesão. (SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1982b). A capacidade de aderência da C.albicans ao acrílico (SEGAL e cols., 1988; SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1980; SAMARANAYAKE e cols., 1980) é significativamente inibida na presença de S.salivarius, entretanto culturas de S.mutans ou sobrenadante livre de células destas culturas, aumentam a

aderência da C.albicans ao acrílico (BRANTING e cols, 1989). C.albicans pode ser aglutinada por algumas bactérias da microbiota bucal, como S.sanguis, S.salivarius, S.mitis, Fusobacterium nucleatum e Actinomyces viscosus (BAGG e SILVERWOOD, 1986), que tem capacidade de aderência aos tecidos da boca, podendo agir como uma "ponte bacteriana" entre a levedura e os tecidos. A C.albicans persiste na boca na presença da microbiota normal, e nesta situação a formação de "ponte bacteriana" pode ter importância nos indivíduos portadores. Por outro lado, a microbiota intestinal suprime a colonização de C.albicans, inibindo a associação entre a levedura e a mucosa (KENNEDY e VOLTZ, 1985).

A xerostomia em animais leva a alterações da microbiota (BOWEN e cols., 1988a; MADISON e cols., 1989), portanto a aderência de C.albicans às células epiteliais da boca nos ratos sialoadenectomizados certamente foi influenciada, apesar de não ter sido detectada na metodologia utilizada neste trabalho. Ratos sialoadenectomizados parece-nos um bom modelo experimental para estudos da influência da saliva e das alterações da microbiota na aderência da C.albicans ao epitélio bucal.

Quatro horas após a inoculação de C.albicans com "swab" no dorso da língua de ratos, dois animais sialoadenectomizados revelaram pseudohifas no interior do epitélio, caracterizando candidose. No período de 6 horas e

7 dias, 4 sialoadenectomizados apresentaram pseudohifas no epitélio, enquanto nos períodos de 8, 12 horas, 1 e 2 dias todos demonstraram candidose. Nos ratos controle, a candidose ocorreu em um animal após 24 horas, em 2 após 48 horas e em um após 7 dias. Num total de 50 animais para cada grupo examinado, 8% dos normais apresentaram candidose, enquanto que 66,6% dos ratos xerostômicos tinham a doença. Os dados deste trabalho revelam portanto, que os animais sialoadenectomizados apresentaram maior incidência de candidose, sem o uso de qualquer outro fator predisponente.

JONES e ADAMS (1970) observaram candidose em 16,6% dos ratos 1 semana após inoculação de C.albicans, porcentual semelhante ao encontrado neste estudo (20%). RUSSELL e JONES (1973b) mostraram rápida eliminação da C.albicans no epitélio bucal de ratos normais, não se observando mais candidose 14 dias após o inóculo da levedura, resultado encontrado também neste trabalho para ratos normais. Por outro lado, nos sialoadenectomizados, candidose foi verificada histologicamente em 50% dos animais, possivelmente porque a xerostomia possa ter interferido na eliminação da C.albicans do epitélio.

Após inóculo de C.albicans, FISKE e cols. (1982b) observaram penetração de pseudohifas no epitélio bucal de 100% dos ratos normais, enquanto nossos achados demonstram candidose em 20% dos animais após 1 semana e em nenhum após 2 semanas. Entretanto os autores usaram antibiótico para

predisposição à candidose e examinaram todo o epitélio bucal, enquanto em nossos resultados apenas a língua foi observada. Os locais mais frequentes de candidose, relatados pelos autores, foram a gengiva marginal, a mucosa bucal, o sulco bucal e lingual e por último a língua.

LACASSE e cols. (1990) aplicaram C.albicans com "swab" na boca de camundongos e observaram a presença de candidose de 1 hora a 7 dias após a inoculação. Logo após 3 horas, já observaram tubos germinativos penetrando na queratina, com as leveduras na superfície. A quantidade de focos contendo pseudohifas foi aumentando progressivamente, atingindo máximo ao redor de 48 horas, decrescendo após 2 a 3 dias do inóculo. No presente estudo, o número de animais com candidose apresentou-se maior também no período de 48 horas, entretanto, no grupo xerostômico, a infecção ocorreu mais rapidamente que nos controles, sendo já observada após 4 horas da inoculação, atingindo máximo (100%) com 8 horas e mantendo-se neste nível até 48 horas, ocorrendo então decréscimo no número de animais com lesão.

Apesar do rato ter se revelado bom modelo experimental para estudo dos efeitos da xerostomia na candidose bucal, o camundongo também é considerado modelo viável para estudo da candidose (LACASSE e cols., 1990), visto que sua microbiota bacteriana é praticamente conhecida e restrita a menos de 20 espécies (TRUDEL e cols., 1986), o que torna possível avaliar o papel da competição microbiana no início da

infecção pela Candida. Além disso, C.albicans não é isolada da microflora bucal do camundongo (LACASSE e cols., 1990), diferentemente do rato, como demonstrado nos dados deste trabalho. Tal fato entretanto pode ser facilmente contornado, não utilizando-se ratos dos quais leveduras do gênero Candida tenham sido isoladas. Respostas do sistema imune ou do ecossistema bucal não são esperadas quando de inoculações bucais de C.albicans no camundongo (LACASSE e cols., 1990). Assim, acreditamos que novos estudos sobre os efeitos da xerostomia na candidose bucal possam ser realizados também em camundongos. A C.albicans não faz parte da microbiota bucal do camundongo, sendo a infecção pela levedura colonização transitória (LACASSE e cols., 1990). Como a C.albicans é habitante natural na boca de seres humanos (ARENDORF e WALKER, 1980b; BURFORD-MASON e cols., 1988; STENDERUP, 1990), e pode ser encontrada na boca de ratos Wistar, como demonstrado nos dados deste trabalho, acreditamos que para estudos de recuperação deste microrganismo, o rato seja o modelo experimental indicado.

7 INOCULAÇÃO PROLONGADA DE Candida albicans NA
BOCA DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

A inoculação prolongada de C. albicans na boca de ratos normais, durante 32 semanas, produziu candidose na língua de 20% dos animais (n=10). A literatura relata percentuais de 15 a 85% de candidose após inoculações prolongadas (20 a 40 semanas) de C. albicans (RUSSELL e JONES, 1975; FISHER e cols., 1982a; ALLEN e cols., 1982 e 1985).

Amostras de C. albicans exibem diferentes espectros de patogenicidade para a mucosa do dorso da língua de ratos. ALLEN e BECK (1983) inocularam 4 amostras diferentes de C. albicans durante 25 semanas, em 10 ratos que receberam tetraciclina, obtendo candidose apenas com 2 amostras; em 4 animais com uma e em 2 animais com outra. HOLBROOK e cols. (1983), demonstraram diferenças na colonização e infecção de duas amostras de C. albicans para camundongos. ALLEN e BECK (1987) isolaram 16 amostras de C. albicans de pacientes com candidose e as inocularam durante 16 semanas na boca de ratos; 6 amostras demonstraram habilidade de produzir lesão no dorso da língua, com incidência em 5% dos ratos em 3 amostras, 10% em uma, 15% em uma, e 60% com uma; outras 5 amostras apresentaram pseudohifas na queratina, porém sem alterações no epitélio; e, as outras 5 amostras não produziram candidose. Nos resultados do presente trabalho, o uso de apenas uma amostra de C. albicans possivelmente

possa explicar as diferenças encontradas na produção de candidose em ratos, com os dados da literatura, já que a amostra utilizada foi isolada de paciente com candidose, entretanto não foi usada anteriormente em ratos. Pode-se considerar que a amostra usada neste trabalho é de baixa patogenicidade para ratos, mas isto facilitou o estudo comparativo dos efeitos da sialoadenectomia, que foi nosso principal objetivo.

Nos ratos xerostômicos que receberam inoculação prolongada de C.albicans usados neste trabalho, candidose ocorreu em 70% dos animais, o que nos leva a sugerir que a redução do fluxo salivar facilitou a implantação e penetração da levedura no epitélio da língua. Três animais sialoadenectomizados apresentaram candidose na porção faríngea da língua, o que não ocorreu em nenhum dos outros grupos estudados. A candidose embora mais freqüente nos xerostômicos, mostrou aspectos semelhantes nos dois grupos, com as leveduras e pseudohifas restritas à camada de queratina. Entretanto, houve diferenças de acordo com a região da língua. Nas papilas cônicas, por exemplo, embora o fungo estivesse presente, as vezes em quantidade acentuada, geralmente não ocorreu resposta inflamatória ou outras modificações do epitélio. Os microabscessos foram mais evidentes na região faríngeana, enquanto que atrofia do epitélio destacou-se no ventre da língua. Não é possível determinar no momento o por que destas diferenças, mas deve

ser considerada a possibilidade de serem respostas dependentes da morfologia de cada área, o que merece maiores esclarecimentos. Isto também explica, porque as lesões macroscópicas são facilmente observadas na região das papilas gigantes, o que não ocorre nas cônicas. Embora menos freqüente do que no dorso da língua, 1 rato normal e 1 xerostômico tiveram candidose na região ventral, indicando que esta área também é susceptível. Foi também a única região onde a incidência foi igual nos dois grupos. Também não é descrita na literatura, candidose na porção faríngeana da língua de ratos. É possível, como neste experimento, que esta região seja mais resistente à candidose, e que a mesma ocorra apenas em condições que modifiquem a biologia bucal, como na xerostomia. Como a candidose produzida no dorso da língua, por inoculações prolongadas de C.albicans tem sido muito pouco estudada em ratos xerostômicos, sugerimos que novos estudos com amostras diferentes de C.albicans sejam realizados.

8 INOCULAÇÃO DE Candida albicans NA BOCA DE RATOS
PORTADORES DE PLACA ACRÍLICA NO PALATO

A permanência de placa acrílica após 3 inoculações consecutivas de C. albicans na boca de ratos normais, não revelou penetração de pseudohifas no epitélio em nossos resultados, e em apenas um animal foi observado presença de leveduras no palato. Apesar do epitélio do palato apresentar hiperqueratose e áreas de acantose, as alterações foram semelhantes ao grupo que recebeu apenas a placa acrílica. OLSEN e BONDEVIK (1978) relataram reação inflamatória e alterações epiteliais evidentes nos ratos portadores de placa acrílica e inoculados com Candida, o que não foi possível visualizar no presente trabalho, porém os autores também não observaram penetração de pseudohifas no epitélio. SHAKIR e cols. (1981) observaram penetração de pseudohifas na queratina e alterações no epitélio após inoculação de C. albicans e permanência de placa acrílica no palato de ratos por 2 a 4 semanas, demonstrando que as lesões eram dependentes da presença da placa acrílica, pois quando a mesma era removida, as alterações se resolviam em 2 semanas.

OLSEN e BONDEVIK (1978) relataram que ratos com placas acrílicas, apresentaram redução inicial de peso, recuperado após 10 a 12 dias de permanência da placa. Em nossos resultados, os ratos com placa acrílica e naqueles que

receberam também inoculações de C.albicans, toleraram a presença das placas, com ligeira perda de peso após 25 dias de permanência das mesmas. Por outro lado, nos animais sialoadenectomizados a colocação de placa acrílica produziu acentuada perda de peso, com diferença significativa em relação ao peso inicial, e os animais apresentaram-se muito abatidos após 25 dias de permanência da placa.

Ratos sialoadenectomizados portadores de placa acrílica apresentaram perda das rugosidades palatinas, alterações gengivais e lesão periodontal evidente. O epitélio apresentou hiperqueratose e camada basal irregular e hiperplásica. Os ratos sialoadenectomizados com placa acrílica, que receberam inoculações de C.albicans apresentaram alterações semelhantes no epitélio, porém ligeiramente mais acentuadas e leveduras em número mais elevado nos esfregaços e nos cortes histológicos que nos demais grupos, porém pseudohifas invadindo o epitélio não foram observadas.

Macacos portadores de placa acrílica apresentaram lesões no palato, mais extensas com invasão intraepitelial de pseudohifas mais frequente e que regrediam mais lentamente nos animais com fluxo salivar diminuído através de drogas (OLSEN e HAANAES, 1977). Os resultados deste trabalho não mostraram entretanto, penetração de pseudohifas no epitélio do palato dos ratos sialoadenectomizados

portadores de placa acrílica nos quais a C.albicans foi inoculada.

A estomatite por prótese total em humanos, caracteriza-se por reação inflamatória severa, atrofia e hiperplasia do epitélio (BUDTZ-JØRGENSEN, 1990a), porém as áreas atingidas, frequentemente não demonstram invasão dos tecidos pela Candida, o que poderia justificar os resultados deste trabalho.

A adaptação de placa acrílica em animais sialoadenectomizados, possivelmente alterou os hábitos alimentares dos ratos, os quais deixaram de se alimentar adequadamente, mesmo com a administração de ração moída e molhada. A perda de peso e comprometimento sistêmico do animal foram bastante significativas, e mesmo assim, as diferenças nas lesões produzidas naqueles que receberam C.albicans foram menos intensas que o esperado. Portanto, a adaptação de placa acrílica no palato não demonstrou ser bom modelo experimental para estudar a influência da xerostomia sobre a presença de C.albicans na boca de ratos sialoadenectomizados.

9 CANDIDOSE NO DORSO DA LINGUA DE RATOS
NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Injeção intraepitelial de 10^6 células de C.albicans/ml no dorso da língua de ratos, produziu macroscopicamente após 4 horas, regiões esbranquiçadas com saliência no epitélio, o que correspondeu microscópicamente à formação de microabcessos com pseudohifas e leveduras no epitélio. Após 12 horas, as lesões mais evidentes macroscopicamente, correspondiam à formação de extensas pseudohifas e microabcessos intraepiteliais em vias de exteriorização com descamação da queratina em algumas áreas. 24 horas após, presença de pequenas áreas despapiladas de aspecto liso e eritematoso visíveis nos locais da injeção, foram devidas provavelmente a acelerada renovação do epitélio, pois observou-se poucas leveduras e pseudohifas em relação ao período anterior. Após 7 dias, área eritematosa é visível macroscopicamente, correspondendo à perda de papilas, a qual diminui decorridos 15 dias da injeção, voltando a aparência da língua praticamente à normalidade.

A análise em microscopia de luz, mostrou 1 hora após a injeção da C.albicans, a formação de tubo germinativo em aproximadamente 25% das leveduras, o que aumentou para mais de 50% após 2 horas da inoculação. MACKENZIE (1964) injetava 1 ml de ar no subcutâneo da pele de camundongos, e a seguir inoculava C.albicans. Após 1 hora da injeção,

observava que mais de 60% das leveduras apresentavam tubo germinativo, número que elevou-se a mais de 90% após 2 horas. A diferença na quantidade de tubos germinativos formados pelas leveduras no presente trabalho, deve ter ocorrido devido a amostra de C.albicans utilizada, já que diferentes amostras produzem quantidade diferentes destas estruturas "in vitro" (MackENZIE, 1962; MARTIN, 1979; SHEPERD e cols., 1985). O local de injeção também deve ter interferido, já que MackENZIE (1964) injetava no subcutâneo de pele de camundongos, enquanto que nossos resultados referem-se a injeções intraepiteliais na língua de ratos, entretanto, o tamanho e a forma dos tubos germinativos apresentaram-se iguais às descritas por MackENZIE (1964). O meio de cultura em que as amostras de C.albicans crescem, o número de vezes em que é repicada, assim como o soro utilizado, também são fatores que influenciam na quantidade de tubos germinativos formados (MARTIN, 1979). Amostras de C.albicans tubo germinativo negativas não apresentam potencial patogênico de causar candidose oral experimental (MARTIN e cols., 1984; KIMURA e PEARSALL, 1980).

Após 4 horas da injeção intraepitelial de C.albicans, os resultados revelaram a formação de pseudohifas e afluxo de polimorfonucleares, caracterizando inflamação aguda, resultados semelhantes aos de MackENZIE (1964) em pele de camundongos. Segundo este autor, após 8 a 12 horas, o afluxo intenso de polimorfonucleares e os demais mecanismos

de defesa do hospedeiro fazem com que as pseudohifas adquiram aparência bizarra, algumas em desintegração, com volta a presença de leveduras; entretanto, quando da ausência de polimorfonucleares, o alongamento das pseudohifas continuam, formando micélios. Nossos resultados foram semelhantes e quando não houve formação de microabcessos, as pseudohifas apresentaram crescimento mais acentuado. Diferença importante em relação aos experimentos de MACKENZIE (1964), é que em nossos resultados após 12 horas, o processo começa a exteriorizar-se, com pedaços de queratina destacando-se, o que não é descrito por esse autor, já que suas injeções eram no subcutâneo da pele, o que provavelmente dificultou a exteriorização. Em nossos resultados, a maioria dos microabcessos já havia exteriorizado após 24 horas.

MAIBACH e KLIGMAN (1962) mostraram em biópsias, 24 horas após oclusão de C.albicans na pele de voluntários, formação de microabcessos intraepiteliais típicos de candidose, semelhantes aos observados neste trabalho 12 horas após injeção de C.albicans no epitélio bucal de ratos. Candidose cutânea experimental em humanos, realizada por REBORA e cols. (1973), através da oclusão de cultura de C.albicans com filme plástico, na pele do antebraço de voluntários (aplicação epicutânea), demonstrou indução de dermatite pustular, dependente da dose aplicada e da permanência da oclusão. 30% dos pacientes demonstraram

lesões após 7 horas, 90% após 21 horas e todos após 105 horas. Após 2 horas, os autores observaram a formação de poucos tubos germinativos os quais foram aumentando em quantidade durante o experimento, com o desenvolvimento de algumas pseudohifas após 4 dias.

A oclusão de células viáveis de C.albicans na pele de ratos e camundongos recém nascidos leva a formação de microabcessos abaixo da camada córnea da pele, após período de aproximadamente 21 horas, tempo necessário para a transformação das leveduras em pseudohifas, sua penetração na camada córnea, formação de fatores quimiotáticos e a migração de granulócitos até o epitélio. Não apenas a proliferação de pseudohifas, mas sua penetração nas camadas viáveis do epitélio é necessária para o aparecimento de lesões. Pseudohifas de espécies patogênicas de Candida penetram na epiderme intacta e produzem pústulas, enquanto que amostras não-patogênicas desenvolvem pseudohifas confinadas ao estrato córneo, mas falham em produzir lesões. A penetração das pseudohifas nas camadas viáveis do epitélio parece ser necessária ao estímulo inicial da resposta inflamatória (RAY e WUEPPER, 1976). Nos resultados deste trabalho, o tempo de formação de microabcessos foi menor, já que as leveduras eram injetadas no epitélio. No período de 6 horas após a injeção, foram observadas duas situações; filamentação das leveduras aderidas às células epiteliais, com pseudohifas penetrando na queratina e nas células mais

superficiais da camada espinhosa, porém sem formação de microabcessos; em outra situação, ocasionalmente no mesmo animal, observou-se áreas com leveduras, pseudohifas e intenso infiltrado de polimorfonucleares, com leucócitos degenerados e restos de células epiteliais, caracterizando microabcessos. Talvez essas duas situações, se devam a profundidade que a injeção atingiu no epitélio, estimulando mais ou menos a resposta leucocitária.

Na aplicação epicutânea ou injeção intradérmica de C.albicans em ratos e camundongos recém nascidos (1 a 3 dias de idade), a levedura penetra na queratina e produz reação inflamatória com microabcessos intraepidérmicos, com as pseudohifas penetrando também nas camadas viáveis do epitélio (GIGER e cols., 1978a). Nos resultados do presente trabalho, após injeção intraepitelial, a C.albicans demonstrou capacidade de invadir a queratina e as camadas mais profundas do epitélio. Como já citado anteriormente, nos ratos em que a C.albicans foi aplicada com "swab", a levedura mostrou-se capaz de penetrar na camada íntegra de queratina, e também nas camadas viáveis do epitélio, principalmente nos animais sialoadenectomizados.

A produção de lesões na pele de ratos e camundongos por amostras de Candida depende pelo menos de três fatores; primeiro, o estrato córneo intacto, que representa barreira física que exclui muitas espécies de Candida, mesmo quando aplicadas debaixo de curativos oclusivos; na ausência do

estrato córneo íntegro, ou no caso de invasão do mesmo por C.albicans e C.stellatoidea, mediadores inflamatórios derivados do complemento, são essenciais para mobilizar células fagocitárias; e finalmente, neutrófilos competentes, que respondem ao estímulo quimiotático são necessários para confinar o processo ao sítio da infecção (RAY e WUEPPER, 1978).

A aderência de microrganismos aos queratócitos da epiderme e nas células epiteliais bucais, é considerado como pré-requisito à colonização cutânea e à infecção. RAY e cols. (1984) demonstraram que C.albicans e C.stellatoidea exibem marcada aderência a queratócitos da epiderme e a células epiteliais bucais e são consideradas patogênicas em modelos animais.

C.albicans filamenta-se e produz extensa destruição em cultura de células renais de camundongos (HURLEY e STANLEY, 1969). HOWLETT (1976a e b) produziu infecção por espécies de Candida em cultura de células epiteliais de animais recém-nascidos com diferentes tipos de queratinização: mucosa do dorso da língua de rato, que é ortoqueratinizada; mucosa paraqueratinizada do dorso da língua de coelho; e, mucosa da bochecha de coelho, não queratinizada. A C.albicans foi a única espécie capaz de invadir os 3 tipos de mucosa testados, apresentando pseudohifas na queratina de células do dorso da língua de ratos 18 horas após inoculação. O tempo de incubação aumentou a penetração das pseudohifas,

sendo que com 28 horas penetravam na camada basal do epitélio e membrana basal e após 35 horas invadia o tecido conjuntivo. A C.albicans mostrou habilidade em invadir os outros tipos de epitélio estudados. Nos dados deste trabalho, após injeção intraepitelial no dorso da língua de ratos, a C.albicans mostrou habilidade em invadir a queratina e a camada basal, produzindo em alguns locais a desestruturação desta última, porém em nenhum momento invadiu o tecido conjuntivo, possivelmente porque a reação de defesa do hospedeiro foi mais rápida, com formação de microabcessos intraepiteliais já 12 horas após o inóculo, impedindo que as pseudohifas de C.albicans atingissem o conjuntivo.

CONCLUDES

CONCLUSÕES

- 1 O gênero Candida foi isolado da cavidade bucal de 65 (17,06%) dos 381 ratos Wistar normais examinados, dos quais 20% eram da espécie C.albicans.
- 2 C.albicans foi recuperada em maior quantidade, em maior número de animais e por tempo mais prolongado, da cavidade bucal de ratos sialoadenectomizados, após 3 inoculações prévias da levedura, em relação aos normais.
- 3 Após 3 aplicações de C.albicans com "swab" na cavidade bucal, 8% dos 50 ratos normais e 66% dos 50 sialoadenectomizados apresentaram candidose no dorso da língua. Após a última aplicação, 20% dos ratos normais apresentaram candidose depois de 24 horas, aumentando para 40% após 2 dias, e diminuindo novamente para 20% decorridos 7 dias. Nos ratos sialoadenectomizados, 40% mostraram candidose após 4 horas, aumentando para 100% depois de 1 e 2 dias, ocorrendo em 80 e 60% após 7 e 15 dias respectivamente.

- 4 Após aplicação de C.albicans por período prolongado na cavidade bucal de ratos (32 semanas), 20% dos normais e 70% dos sialoadenectomizados apresentaram candidose no dorso da língua, cujas características foram variáveis de acordo com a região afetada.
- 5 A adaptação de placa acrílica no palato de ratos sialoadenectomizados, não se mostrou bom modelo experimental para estudo da candidose na cavidade bucal de ratos.
- 6 A injeção intraepitelial de C.albicans, no dorso da língua de ratos, provocou candidose de aspecto semelhante nos animais normais e sialoadenectomizados, porém com variações de acordo com o tempo de evolução das lesões. Após 1 hora da injeção, as leveduras mostravam brotamento de tubo germinativo e depois de 4 horas pseudohifas penetraram nas células epiteliais, ocorrendo formação de microabscessos intraepiteliais. Depois de 24 e 48 horas, as áreas epiteliais com pseudohifas estavam em descamação, com hiperplasia da camada basal e discreta inflamação no conjuntivo subjacente. Após 7 dias, poucas pseudohifas foram observadas e o epitélio apresentou perda de papilas filiformes, hiperqueratose e acantose.

R E S U M O

RESUMO

Neste trabalho foram estudados os efeitos da xerostomia, provocada pela remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores, na permanência de Candida albicans e no desenvolvimento de candidose na cavidade bucal de ratos. De 381 ratos Wistar examinados, o gênero Candida foi isolado da boca de 65 animais (17,06%), e destes, 20% foram caracterizados como da espécie C. albicans. Nos experimentos posteriores foram usados apenas os ratos que não apresentavam leveduras do gênero Candida na cavidade bucal. A permanência de C. albicans na boca de ratos normais e sialoadenectomizados, foi verificada após três inoculações de 10^6 células da levedura, em dias consecutivos. Em vários períodos de tempo, até o máximo de 18 semanas, C. albicans foi recuperada em maior quantidade e por tempo mais prolongado na boca dos animais sialoadenectomizados. A candidose foi estudada microscopicamente na língua de ratos que receberam aplicação de 10^6 células com "swab" em três dias consecutivos, ou durante 32 semanas (3 aplicações semanais). Com 3 aplicações iniciais, 20% dos ratos normais apresentaram candidose depois de 24 horas, aumentando para 40% após 2 dias, e diminuindo novamente para 20% decorridos 7 dias. Nos ratos sialoadenectomizados, 40% mostraram candidose após 4 horas, aumentando para 100% depois de 1 e 2 dias, ocorrendo em 80% e 60% após 7 e 15 dias

respectivamente. Quando a aplicação foi prolongada (32 semanas), candidose ocorreu em 20% dos ratos normais e 70% dos sialoadenectomizados, tendo microscopicamente características variáveis de acordo com a região da língua afetada. Candidose também foi provocada pela injeção intraepitelial no dorso da língua de ratos com 10^8 células/ml de C.albicans. Após 1 hora, leveduras mostravam brotamento de tubo germinativo, e depois de 4 horas as pseudohifas penetraram nas células epiteliais, havendo também formação de microabscessos intraepiteliais. Depois de 24 e 48 horas as áreas epiteliais com pseudohifas estavam em descamação, com hiperplasia da camada basal e discreta inflamação no conjuntivo subjacente. Após 7 dias poucas pseudohifas foram observadas, com o epitélio apresentando aspecto liso e eritematoso nas regiões injetadas com C.albicans. Os aspectos macro e microscópicos e a evolução da candidose foram semelhantes nos animais normais e sialoadenectomizados. Os dados deste trabalho mostram que, como em humanos, a xerostomia facilita a presença de C.albicans e o desenvolvimento de candidose na cavidade bucal de ratos. Sugere também que uma vez no interior do epitélio, outros fatores como a resposta inflamatória e a descamação epitelial são mais relevantes no controle da candidose.

S U M M A R Y

SUMMARY

On this work it was studied the effects of xerostomia, provoked by extirpation of the major salivary glands, on the carriage of Candida albicans and development of candidosis in the mouth of rats. Candida gender was isolated from 65 (17,06%) of 381 Wistar rats, and of these isolates, 20% were characterized as C.albicans species. On the following experiments only rats negative for Candida gender were used. C.albicans presence in the mouth of normal and desalivated rats was verified after three inoculations, on consecutive days, of 10^8 cells. On various periods up to 18 weeks, C.albicans was recovered in larger quantities and longer periods on xerostomic rats.

Candidosis, histopathologically confirmed, of the rat tongue was studied after inoculations as a swab of 10^8 cells either during 3 days and 32 weeks (3 weekly inoculations). With short term inoculations, 20% of normal rats showed candidosis after 24 hs, increasing to 40% after 2 days, decreasing again to 20% on the 7th day. 40% of xerostomic rats had candidosis after 4 hs, and 100% after 1 and 2 days. After 7 and 15 days, 80% and 60% of the desalivated rats had candidosis respectively. With prolonged period of inoculation (32 weeks), candidosis occurred on 20% of normal and 70% of desalivated rats. The microscopical characteristics varied accordingly to the region of the tongue affected.

Experimentally acute candidosis was also induced by intraepithelial injection of 10^6 cells on the dorso of the tongue. After 1h yeasts exhibited germinative tubes, and with 4 hs there was penetration into the epithelial cells and presence of intraepithelial microabscesses. After 24 and 48 hs the epithelial regions containing hyphas suffered desquamation, with hyperplasia of the basal cell layer and mild inflammation of the subjacent connective tissue. On the 7th day few hyphas were observed, and epithelium lost the filiforms papillae, and showed hyperkeratosis and acantosis. Macroscopically the most evident alterations occurred after 24 and 48 hs of injection, with the dorso of the tongue having a smooth and erithematous aspect. Macro and microscopically the candidosis on both normal and xerostomic rats were similar.

These data show that in rats, as in humans, saliva is an important factor to control the carriage of C.albicans in the mouths of rats. Xerostomia also facilitates the penetration of C.albicans into the oral epithelium and the development of candidosis. Candidosis provoked by intraepithelial injection of Candida yeasts also suggests that other factors as the inflammatory response and epithelial desquamation are more relevant than saliva to control Candida growth after its penetration in the epithelium.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ADAMS, D. The effect of saliva on the penetration of fluorescent dyes into the oral mucosa of the rat and rabbit. Arch.Oral Biol., 19: 505-509, 1974.
- ADAMS, D.; JONES, J.H. Life history of experimentally induced acute oral candidiasis in the rat. J.Dent.Res., 50: 643-644, 1971.
- ADRIANO, S.M.; SCHWARZ, J. Experimental moniliasis in mice. Am.J.Pathol., 31: 859-873, 1955.
- AIDS: tuberculose e infecção pelo HIV: documento complementar ao Manual de Condutas Clínicas. Bol. Epidemiol.Min.Saúde, 2: 1-8, 1989.
- ALBANO, M.M.; SCHMITT, J.A. Pathogenicity in mice of strains of Candida albicans (Robin) Berk. Isolated from burn patients). Mycopathol.Mycol.Appl., 49: 283-288, 1973.
- ALLEN, C.M.; BECK, F.M. Differences in mucosal reaction related to Candida albicans isolates. J.Oral Pathol., 16: 89-93, 1987.

* De acordo com NB-66 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1978.
Abreviaturas de Periódicos segundo Index to Dental Literature e Index Medicus.

ALLEN, C.M.; BECK, F.M. Strain-related differences in pathogenicity of Candida albicans for oral mucosa. J.Infect.Dis., 147: 1036-1040, 1983.

ALLEN, C.M.; BECK, F.M.; LURIE, F.A.; PINSKY, H.M. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongues. Infect.Immun., 47: 480-483, 1985.

ALLEN, C.M.; BLOZIS, G.G.; ROSEN, S.; BRIGHT, J.S. Chronic Candidiasis of the rat tongue: a possible model for human median rhomboid glossitis. J.Dent.Res., 61: 1287-1291, 1982.

ALLEN, C.M.; ROSSIE, K.M.; HARING, J.I.; BECK, F.M. Resolution of candidal lesions of the dorsal rat tongue by ketoconazole. J.Oral Pathol., 17: 158-163, 1988.

ALMEIDA, N.Q. Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de Candida sobre a patogenicidade para camundongos. São José dos Campos, Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos/UNESP, 1991, 111p. (Tese de Livre-Docência).

ALY, R.; MAIBACH, H.I.; RAHMAN, R.; SHINEFIELD, H.R.; MANDEL, A.D. Correlation of human "in vivo" and "in vitro" cutaneous antimicrobial factors. J.Infect.Dis., 131: 578-583, 1975.

- AMBJØRNSSEN, E. An analytic epidemiological study of denture stomatitis in a group of Norwegian old-age pensioners. Gerodontology, 1: 207-212, 1985.
- ARENDORF, T.M.; ADDY, M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. J.Clin.Periodontol., 12: 360-368, 1985.
- ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Candida albicans: its association with dentures, plaque and the oral mucosa. J.Dent.Assoc.South Africa, 35: 563-569, 1980a.
- ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Denture stomatitis: a review. J.Oral.Rehabil., 18: 217-227, 1987.
- ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Oral candidal populations in health and disease. Br.Dent.J., 147: 267-272, 1979.
- ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of Candida albicans in man. Arch.Oral Biol., 25: 1-10, 1980b.
- BAGG, J.; SILVERWOOD, R.W. Coagglutination reactions between Candida albicans and oral bacteria. J.Med.Microbiol., 22: 165-169, 1986.
- BAKERSPIGEL, A. Some observations on the cytology of Candida albicans. J. Bacteriol., 87: 228-230, 1964.

BALISH, E.; PHILLIPS, A.W. Growth and virulence of Candida albicans after oral inoculation in the chick with a monoflora of either Escherichia coli or Streptococcus faecalis. J.Bacteriol., 91: 1744-1749, 1966a.

BALISH, E.; PHILLIPS, A.W. Growth, morphogenesis, and virulence of Candida albicans after oral inoculation in the germ-free and conventional chick. J.Bacteriol., 91: 1736-1743, 1966b.

BANNO, Y.; YAMADA, T.; NOZAWA, Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, Candida albicans; separation of three enzymes and some biological properties. Sabouraudia, 23: 47-54, 1985.

BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R.G.; RYLEY, J.F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J.Gen.Microbiol., 131: 1217-1221, 1985.

BERDICEVSKY, I.; BEN-ARYEH, H.; SZARGEL, R.; GUTMAN, D. Oral candida in asymptomatic denture wearers. Int.J.Oral Surg., 9: 113-115, 1980.

BERDICEVSKY, I.; BEN-ARYEH, H.; SZARGEL, R.; GUTMAN, D. Oral candida in children. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol., 57: 37-40, 1984.

- BERNADE, M.A.; FABIAN, F.W.; ROSEN, S.; HOPPERT, C.A.; HUNT, H.R. A method for the collection of large quantities of rat saliva. J.Dent.Res., 35: 326-327, 1956.
- BERTRAM, U. Xerostomia, clinical aspects, pathology and pathogenesis. Acta Odontol.Scand., 25: 12-126, 1967.
- BORG, M.; RÜCHEL, R. Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of Candida albicans and Candida tropicalis. J.Med.Vet.Mycol., 28: 3-14, 1990.
- BORG, M.; RUCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic Candida spp. during experimental infection of oral mucosa. Infect.Immun., 56: 626-631, 1988.
- BOWEN, W.H.; MADISON, K.M.; PEARSON, S.K. Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intact cagemates. J.Dent.Res., 67: 1316-1318, 1988a.
- BOWEN, W.H.; PEARSON, S.K.; YOUNG, D.A. The effect of desalivation on coronal and root surface caries in rats. J.Dent.Res., 67: 21-23, 1988b.
- BRADY, J.M.; GRAY, W.A.; LARA-GARCIA, W. Localization of bacteria on the rat tongue with scanning and transmission electron microscopy. J.Dent.Res., 54: 777-782, 1975.

- BRANTING, C.; SUND, M.L.; LINDER, L.E. The influence of Streptococcus mutans on adhesion of Candida albicans to acrylic surfaces in "vitro". Arch.Oral Biol., 34: 347-353, 1989.
- BRAWNER, D.L.; CUTLER, J.E. Oral Candida albicans isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquires immunodeficiency syndrome. J.Clin.Microbiol., 27: 1335-1341, 1989
- BROWN, L.R.; DREIZEN, S.; HANDLER, S.; JOHNSTON, D.A. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. J.Dent.Res., 54: 740-750, 1975.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Cellular immunity in acquired candidiasis of the palate. Scand.J.Dent.Res., 81: 372-382, 1973a.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Denture stomatitis. IV. An experimental model in monkeys. Acta Odontol.Scand., 29: 513-526, 1971a.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Denture stomatitis. V. Candida agglutinins in human sera. Acta Odontol.Scand., 30: 313-325, 1972.

- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Effects of triamcinolone acetonide on experimental oral candidiasis in monkeys. J.Dent.Res., 83: 171-178, 1975.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol. Scand., 48: 61-69, 1990a.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Acta Odontol. Scand., 48: 37-43, 1990b.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Immune response to C.albicans in monkeys with experimental candidiasis in the palate. Scand.J.Dent.Res., 81: 360-371, 1973b.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Proteolytic activity of Candida sp as related to the pathogenesis of denture stomatitis. Sabouraudia, 12: 266-271, 1971b.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. The significance of Candida albicans in denture stomatitis. Scand.J.Dent.Res., 82: 151-190, 1974.
- Thesis
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; BERTRAM, U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. Acta Odontol. Scand., 28: 71-92, 1970.

- BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; STENDERUP, A.; GRABOWSKY, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community Dent. Oral Epidemiol., 3: 115-119, 1975.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; THEILADE, E.; THEILADE, J. Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. Scand. J. Dent. Res., 91: 134-142, 1983.
- 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., 26: 49-56, 1988.
- BUTLER, K.M.; BAKER, C.J. Candida: an increasingly important pathogen in the nursery. Pediatr. Clin. North Am., 35: 543-563, 1988.
- CASSONI, A.; DE BERNARDIS, F.; MODELLO, F.; CEDDIA, T.; AGATENSI, L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. J. Infect. Dis., 156: 777-783, 1987.
- CATALAN, A.; HERRERA, R.; MARTINEZ, A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: Scanning electron microscopic and microbiologic study. J. Prosthet. Dent., 57: 581-586, 1987.

- CAWSON, R.A.; RAJASINGHAM, K.C. Ultrastructural features of the invasive phase of Candida albicans. Br.J.Dermatol., 87: 435-443, 1972.
- CHEYNE, V.D. A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation. J.Dent.Res., 18: 457-468, 1939.
- CLEATON-JONES, P. Anatomical observations in the soft palate of the albino rat. Anat.Anz., 131: 419-424, 1972.
- CLEATON-JONES, P. An ultrastructural study of keratinized epithelia in the rat soft palate. J.Anat., 122: 23-29, 1976.
- CLEATON-JONES, P. Histological observations in the soft palate of the albino rat. J.Anat., 110: 39-47, 1971.
- CUTLER, J.E.; FRIEDMAN, L.; MILNER, K. Biological and chemical characterization of toxic substances from Candida albicans. Infect.Immun., 6: 616-627, 1972.
- DAHLÉN, B. ; WIKSTROM, M.; MOLLER, A. Production of hystolytic enzymes by combination of oral bacteria with know pathogenicity. J.,Dent.Res., 62: 1041-1044, 1983.
- DAHLE, U.R.; OLSEN, I Anaerobioses and serum promote mycelium formation by Candida albicans in colonies on TSBV agar. Acta Odontol.Scand., 49: 41-45, 1991.

- DARWAZEH, A.M.G; LAMEY, P.J.; LEWIS, M.A.O.; SAMARANAYAKE, L.P. Systemic fluconazole therapy and "in vitro" adhesion of Candida albicans to human buccal epithelial cells. J.Oral Pathol.Med., 20: 17-19, 1991.
- DAVENPORT, J.C. The oral distribution of Candida in denture stomatitis. Br.Dent.J., 129: 151-156, 1970.
- DAWES, C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and sensation of dry mouth in man. J.Dent.Res., 66: 648-653, 1987.
- DAWES, C.; WOOD, C.M. The contribution of oral minor mucous gland secretions to the volume of whole saliva in man. Arch.Oral Biol., 18: 337-342, 1973.
- DEAN, D.H.; HIRAMOTO, R.N. Oral mucosal permeability of desalivated rats. J.Oral Med., 41: 170-171, 1986.
- DOUGLAS, L.J. Adhesion of Candida species to epithelial surfaces. Critical Rev.Microbiol., 15: 27-43, 1987.
- EDGAR, W.M.; BOWEN, W.H.; COLE, M.F. Development of rampant dental caries, and composition of plaque fluid and saliva in irradiated primates. J.Oral Pathol., 10: 284-295, 1981.

EPSTEIN, J.B. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. Oral Surg.Oral Med,Oral Pathol., 69: 32-41, 1990.

EPSTEIN, J.B.; DECOTEAU, W.E. WILKINSON, A. Effect of sialor in treatment of xerostomia in Sjogren's syndrome. Oral Surg,Oral Med,Oral Pathol., 56: 495-499, 1983.

EPSTEIN, J.B.; KIMURA, L.H.; MENARD, T.W.; TRUELOVE, E.L. Effects of especific antibodies on the interation between fungus Candida albicans and human oral mucosa. Arch,Oral Biol., 27: 469-574, 1982.

EPSTEIN, J.B.; PEARSALL, N.N.; TRUELOVE, E.L. Quantitative relationship between Candida albicans in saliva and the clinical status of human subjects. J.Clin.Microbiol., 12: 475-476, 1980.

FISKER, A.V.; RINDOM-SCHIOTT, C.; PHILIPSEN, H.P. Long-term oral candidosis in rats. Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand., 90: 221-227, 1982a.

FISKER, A.V.; RINDOM-SCHIOTT, C.; PHILIPSEN, H.P. Short-term oral candidosis in rats, with special reference to the site of infection. Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand., 90: 49-57, 1982b.

- FONSECA, J.B. Candidiases. Aspectos de interesse odontológico. In: —. LACAZ, C.S. Candidiases. São Paulo, Ed.Pedagógica Universitária e Ed.Universidade de São Paulo, 1980, p.130-146.
- FOX, C.P.; VAN DER VEN, P.F.; SONIES, B.C. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. J.Am.Dent.Assoc., 110: 519-525, 1985.
- FRANCIS, C.A.; FARTHING, P.M. The response of Langerhans cells to palatal cover plates in the rat. Arch.Oral Biol., 34: 377-381, 1989.
- FRANKER, C.K.; LUCATORTO, F.M.; JOHNSON, B.S.; JACOBSON, J.J. Characterization of the mycoflora from oral mucosal surfaces of some HIV-infected patients. Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol., 69: 683-687, 1990.
- FREITAS, H.R.; BIRMAN, E.G. Candidose bucal - aspectos clínicos e terapêuticos. Rev.Assoc.Paul.Cir.Dent., 43: 227-230, 1989.
- FRETER, R.; JONES, G.W. Adhesive properties of Vibrio cholerae: nature of the interaction with intact mucosal surfaces. Infect.Immun., 6: 918-927, 1972.
- FUENTES, C.A.; SCHWARTZ, J.; ABOLAFIA, R. Some aspects of the pathogenicity of Candida albicans in laboratory animals. Mycopathol.Mycol.Appl., 6: 176-181, 1952.

- GHANNOUM, M.; ELTEEN, K.A. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of Candida albicans. J.Med.Vet.Mycol., 24: 407-413, 1986.
- GHANNOUM, M.A.; ELTEEN, K.B.; STRETTON, R.J.; WHITTAKER, P.A. Effects of octenidine and pirtenidine on adhesion of Candida species to human buccal epithelial cells "in vitro". Arch.Oral Biol., 35: 249-253, 1990.
- GIANNI, E.; SANTORO, F.; LASAGNI, A.; GUARIGH, A.; CHIARI, A. Incidenza della Candida albicans nei bambini portatori di apparecchiature ortodontiche: indagine epidemiologica. Prev.Stomatol., 10: 39-43, 1984.
- GIBBONS, R.J. Bacterial adherence in infection and immunity. Rev.Microbiol., 4: 49-60, 1973.
- GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. Seletive bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinants. Infect.Immun., 3: 567-73, 1971.
- GIGER, D.K.; DOMER, J.E.; McQUITTY-JR, J.T. Experimental murine candidiasis: pathological and immune responses to cutaneous inoculation with Candida albicans. Infect.Immun., 19: 499-509, 1978a.

- GIGER, D.K.; DOMER, J.E.; MOSER, S.A.; McQUITT-Y-JR, J.T.
Experimental murine candidiasis: pathological and immune responses in T-lymphocyte-depleted mice. Infect.Immun., 21: 729-737, 1978b.
- GILDA, J.E.; KEYES, P.H. Increased dental caries activity in the Syrian hamster following desalivation. Proc.Soc. Exp.Biol.Med., 66: 28-32, 1947.
- GRAD, H.; GRUSHKA, M.; YANDOVER, L. Drug induced xerostomia. The effects and treatment. J.Can.Dent.Assoc., 4: 296-300, 1985.
- GREEN, D.R.; EMBERY, G. Partial chemical characterization an biological activities of sulphated glycoproteins isolated from "in vivo" pilocarpine-stimulated secretions of rat minor salivary glands. Arch.Oral Biol., 29: 859-863, 1984.
- GUSBERTI, F.A.; GADA, T.G.; LANG, N.P.; GEERING, A.H. Cultivable microflora of plaque from full denture bases and adjacent palatal mucosa. J.Biol.Buccale, 13: 227-236, 1985.
- HASENCLEVER, H.F. Comparative pathogenicity of Candida albicans for mice and rabbits. J.Bacteriol., 78: 105-109, 1959.

- HASENCLEVER, H.F.; MITCHELL, W.O. Antigenic studies of Candida III. Comparative pathogenicity of Candida albicans group A, group B, and C.stellatoidea. J.Bacteriol., 82: 578-581, 1962.
- HASENCLEVER, H.F.; MITCHELL, W.O. Pathogenicity of C.albicans and C.tropicalis. Sabouraudia, 1: 16-21, 1961.
- HASSAN, O.E.; JONES, J.H.; RUSSELL, C. Experimental oral candidal infection and carriage of oral bacteria in rats subjected to a carbohydrate-rich diet and tetracycline treatment. J.Med.Microbiol., 20: 291-298, 1985.
- HAZEN, K.C. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of Candida albicans to human epithelial cells. Infect.Immun., 57: 1894-1900, 1989.
- HEINDAHL, A; NORD, C.E. Oral yeast infections in immunocompromised and seriously diseased patients. Acta Odontol.Scand., 48: 77-84, 1990.
- HERRERA, J.L.; LYONS, M.F.; JOHNSON, L.F. Saliva: its role in health and disease. J.Clin.Gastroenterol., 10: 569-578, 1988.

- HERSHON, L.E. Elaboration of hyaluronidase and chondroitin sulfatase by microorganisms inhabiting the gingival sulcus: evaluation of screening method for periodontal disease. J.Periodontol., 42: 34-36, 1971.
- HOLBROOK, W.P.; SOFAER, J.A.; SOUTHAM, J.C. Experimental oral infection of mice with a pathogenic and a non-pathogenic strain of the yeast Candida albicans. Arch.Oral Biol., 28: 1089-1091, 1983.
- HOLMSTRUP, P.; AXELL, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. Acta Odontol. Scand., 48: 57-59, 1990.
- HOLMSTRUP, P.; BESSERMAN, M. Clinical, therapeutic, and pathogenic aspects of chronic oral multifocal candidiasis. Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol., 56: 388-395, 1983.
- HOWLETT, J.A. Candidal infection of the oral mucosa: an "in vitro" model. Proc.R.Soc.Med., 69: 16-20, 1976a.
- HOWLETT, J.A. The infection of rat tongue mucosa "in vitro" with five species of Candida. J.Med.Microbiol., 9: 309-316, 1976b.
- HOWLETT, J.A.; SQUIER, C.A. Candida albicans ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. Infect.Immun., 29: 252-260, 1980.

- HUPPERT, M.; CAZIN JR., J.; SMITH JR., H. Pathogenesis of Candida albicans infection following antibiotic therapy. III. The effect of antibiotics on the incidence of Candida albicans in the intestinal tract of mice. J.Bacteriol., 70: 400-447, 1955.
- HURLEY, R. Effect of route of entry of Candida albicans on the histogenesis of the lesions in experimental candidosis in the mouse. J.Pathol.Bacteriol., 92: 578-583, 1966.
- HURLEY, R.; STANLEY, V.C. Cytopathic effects of pathogenic and non-pathogenic species of Candida on cultured mouse epithelial cells: relation to the growth rate and morphology of the fungi. J.Med.Microbiol., 2: 63-74, 1969.
- ISENBERG, H.D.; ALLERHAND, J.; BERKMAN, J.I. An endotoxin-like fraction extracted from the cells of Candida albicans. Nature, 197: 516-517, 1963.
- ITO, V.S. Efeitos da xerostomia nas estruturas bucais do rato. Piracicaba, Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, 1990. 68p. (Dissertação de Mestrado).

IWATA, K. Fungal toxins and their role in the etiopathology of fungal infection. In: —. Recent advances in medical and veterinary micology. Tokyo, Ed.K.Iwata, 1975. p.15-33.

JOHANNESSEN, A.C.; ISACSSON, G.; NILSEN, R.; BERGENDAL, T. In situ characterization of the inflammatory cell infiltrates of hyperplastic denture stomatitis. Acta Odontol.Scand., 44: 185-192, 1986.

JONES, J.H.; ADAMS, D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. Br.J.Dermatol., 83: 670-673, 1970.

JONES, J.H.; RUSSELL, C. The histology of chronic candidal infection of the rat's tongue. J.Pathol., 113: 97-100, 1974.

JONES, J.H.; RUSSELL, C.; YOUNG, C.; OWEN, D. Tetracycline and the colonization and infection of the mouths of germ-free and conventionalized rats with Candida albicans. J.Antimicrob.Chemother., 2: 247-253, 1976.

JORGE, A.O.C. Influência do uso de aparelhos ortodônticos sobre a presença de Candida albicans na cavidade bucal. Taubaté, Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, 1986. 45p. (Dissertação de Mestrado).

- JORGE, A.O.C.; ALMEIDA, N.O.; UNTERKIRCHER, C.S.; SHIMIZU, M.T. Influência do uso de aparelhos ortodônticos sobre a presença de Candida albicans na cavidade bucal. Rev. Assoc.Paul.Cir.Dent., 41: 308-310, 1987.
- KASTER, A.G.; CAMERON, I.L. Selective habitation of bacteria on "intermediate soft" keratin surfaces of the rat tongue. J.Dent.Res., 57: 139-145, 1978.
- KEARNS, M.J.; DAVIES, P.; SMITH, H. Variability of the adherence of Candida albicans strains to human buccal epithelial cells: inconsistency of differences between strains related to virulence. Sabouraudia, 21: 93-98, 1983.
- KEENE, H.J.; FLEMING, T.J. Prevalence of caries-associated microflora after radiotherapy in patients with cancer of the head and neck. Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol., 64: 421-426, 1987.
- KENNEDY, M.J.; VOLTZ, P.A. Ecology of Candida albicans gut colonization: inhibition of Candida adhesion, colonization and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. Infect.Immun., 49: 654-663, 1985.

- KENNEDY, M.J.; VOLTZ, P.A. Dissemination of yeasts after gastrointestinal inoculation in antibiotic-treated mice. Sabouraudia, 21: 27-33, 1983.
- KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N. Adherence of Candida albicans to human buccal epithelial cells. Infect.Immun., 21: 64-68, 1978.
- KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N. Relationship between germination of Candida albicans and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect.Immun., 28: 464-468, 1980.
- KING, R.D.; LEE, J.C.; MORRIS, A.L. Adherence of Candida albicans and other Candida species to mucosal epithelial cells. Infect.Immun., 27: 667-674, 1980.
- KLAPPER, C.E.; VOLKER, J.F. The influence of impaired salivary function on dental caries in the syrian hamster. J.Dent.Res., 32: 219-223, 1953.
- KLOTZ, S.A.; DRUTZ, D.J.; ZAJIC, J.E. Factors governing adherence of Candida species to plastic surfaces. Infect.Immun., 50: 97-101, 1985.

- KOMSHIAN, S.V.; UWAYDAH, A.K.; SOBEL, J.D.; CRANE, L.R.
Fungemia caused by Candida species and Torulopsis
glabrata in the hospitalized patient: frequency,
characteristics, and evaluation of factors influencing
outcome. Rev.Infect.Dis., 11: 379-390, 1989.
- KONDOH, Y.; SHIMIZU, K.; TANAKA, K. Proteinase production
and pathogenicity of Candida albicans. II. Virulence for
mice of C.albicans strains of different proteinase
activity. Microbiol.Immunol., 31: 1061-1069, 1987.
- KOOP, H.M.; VALENTIJN-BENZ, M.; AMERONGEN, A.V.N.; ROUKEMA,
P.A.; GRAAFF, J. Influence of human whole saliva on
bacterial aggregation. J.Dent.Res., 66: 613-615, 1987.
- KOOPMANS, A.S.F.; KIPPUW, N.; GRAAFF, J. Bacterial
involvement in denture-induced stomatitis. J.Dent.Res.,
67: 1246-1250, 1988.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The yeasts: a taxonomic study.,
3.ed., Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984.
p.585-613.
- KROGH, P. The role of yeasts in oral cancer by means of
endogenous nitrosation. Acta Odontol.Scand., 48: 85-88,
1990.
- KUTUZOV, H.; SICHER, H. Anatomy and function of the palate
in the white rat. Anat.Rec., 114: 67-84, 1952.

- LACASSE, M; FORTIER, C.; TRUDEL, L.; COLLET, A.J.,
DESLAURIERS, N. Experimental oral candidosis in the
mouse: microbiologic and histologic aspects. J.Oral
Pathol.Med., 19:136-141, 1990.
- LACAZ, C.S. Candidiases. São Paulo, Ed.Pedagógica
Universitária e Ed.Universidade de São Paulo, 1980. 190p.
- LAMEY, P.J.; DARWAZEH, A.M.G.; MUIRHEAD, J.; RENNIE, J.S.;
SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. Chronic
hyperplastic candidosis and secretor status. J.Oral
Pathol.Med., 20: 64-67, 1991.
- LAY, K.M.; RUSSELL, C. Candida species and yeasts in mouth
of infants from a special care of a maternity hospital.
Arch.Dis.Clin., 52: 794-804, 1977.
- LEHNER, T. Oral candidosis. Dent.Practit., 17: 210-216, 1967.
- LILJEMARK, W.F.; GIBBONS, R.J. Supression of Candida
albicans by human oral streptococci in gnotobiotic mice.
Infect.Immun., 8: 846-849, 1973.
- LLORY, H.; DAMMRON, A.; FRANK., R.M. Les modifications de
la flore buccale aerobie apres radiotherapie
bucco-pharynge. Arch.Oral Biol., 16: 617-630, 1971.

- LUCATORTO, F.M.; FRANKER, C.; HARDY, D.; CHAFEY, S.
Treatment of refractory oral candidiasis with
fluconazole. Oral Surg.Oral Med. Oral Pathol., 71: 42-44,
1991.
- MacDONALD, F.G.; MANTAS, J.; McEWEN, C.G.; FERGUSON, M.N.
Salivary gland aplasia: an ectodermal disorder? J.Oral
Pathol., 15: 115-117, 1986.
- MacFARLANE, T.W.; HELNARSKA, S.J. The microbiology of
angular cheilitis. Br.Dent.J., 140: 403-406, 1976.
- MackENZIE, D.W.R. Morphogenesis of Candida albicans "in
vivo". Sabouraudia, 3: 225-237, 1964.
- MackENZIE, D.W.R. Serum tube identification of Candida
albicans. J.Clin.Pathol., 15: 563-565, 1962.
- MackINNON, J.E. (1936). In: — JONES, J.H.; ADANS, D.
Experimentally induced acute oral candidosis in the rat.
Br.J.Dermatol., 83: 670-673, 1970.
- MACURA, A.B.; PAWLICK, B.; WITA, B. Candida adherence to
mucosal epithelial cells with regard to its
pathogenicity. Zentralbl.Bakteriol.Hyg., 254: 561-565,
1983.

- MADISON, K.M.; BOWEN, W.H.; PEARSON, S.K.; FALANY, J.L.
Caries incidence in intact rat infected with
Streptococcus sobrinus via transmission from desalivated
cagemates. J.Dent.Res., 69: 1154-1159, 1990.
- MADISON, K.M.; BOWEN, W.H.; PEARSON, S.K.; YOUNG, D.A.
Effect of desalivation and age on susceptibility to
infection by Streptococcus sobrinus. Caries Res., 23:
70-74, 1989.
- MAIBACH, H.I.; KLIGMAN, A.M. The biology of experimental
human cutaneous moniliasis (Candida albicans).
Arch.Dermatol., 85: 233-257, 1962.
- MANDELL, I.D. The functions of saliva. J.Dent.Res., 66:
623-627, 1987.
- MANDELL, I.D. The diagnostic uses of saliva. J.Oral
Pathol.Med., 19: 119-125, 1990.
- MARDON, D.N.; GUNN, J.L.; ROBINETTE JR., E. Variation in
the lethal response in mice to yeast-like and
pseudohyphal forms of Candida albicans.
Can.J.Microbiol., 21: 1681-1687, 1975.
- MARDT, P.A.; WESTROM, L. Adherence of bacteria to vaginal
epithelial cells. Infect.Immun., 13: 661-66, 1976.

- MARRIE, T.J.; COSTERTON, J.W. The ultrastructure of Candida albicans infections. Can.J.Microbiol., 27: 1156-1164, 1981.
- MARTIN, M.V. Germ-tube formation by oral strains of Candida tropicalis. J.Med.Microbiol., 12: 187-193, 1979.
- MARTIN, M.V.; CRAIG, G.T.; LAMB, D.J. An investigation of the role of true hypha production in the pathogenesis of experimental oral candidosis. Sabouraudia, 22: 471-476, 1984.
- MARTIN, M.V.; LAMB, D.J. Frequency of Candida albicans serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. J.Clin.Pathol., 35: 888-891, 1982.
- MCCOURTIE, J.; DOUGLAS, L.J. Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect.Immun., 32: 1234-1241, 1981.
- MCCOURTIE, J.; MacFARLANE, T.W.; SAMARANAYAKE, L.P. A comparison of the effects of chlorhexidine gluconate, amphotericin B and nystatin on the adherence of Candida species to denture acrylic. J.Antimicrob.Chemother., 17: 575-583, 1986a.

- McCOURTIE, J.; MacFARLANE, T.W.; SAMARANAYAKE, L.P. Effect of saliva and serum on the adherence of Candida species to chlorexidine-treated denture acrylic. J.Med. Microbiol., 21: 209-213, 1986b.
- McMILLAN, M.D. A scanning electron microscopic study of keratinized epithelium of the hard palate of the rat. Arch.Oral Biol., 19: 225-229, 1974.
- McMILLAN, M.D.; COWELL, V.M. Experimental candidiasis in the hamster cheek pouch. Arch.Oral Biol., 30: 249-255, 1985.
- MEYER, S.A.; AHEARN, D.G.; YARROW, D. Genus 4. Candida Berkhout. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The yeasts: a taxonomic study. 3ed., Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1984. p.585-613.
- MIRANDA, V.C.; GRECCO, A.J.T.; ITO, I.Y. Influência de aparelhos ortodônticos removíveis sobre a microbiologia da saliva de crianças. Ars Cyrandi Odontol., 9: 14-16, 1983.
- MOHAMED, A.M.H. Ultrastructural aspects of chronic oral candidosis. J.Oral Pathol., 4: 180-194, 1975.

- MONIACI, D.; GRECO, D.; FLECCHIA, G.; RAITERI, R.; SINICCO, A. Epidemiology, clinical features and prognostic value of HIV-1 related oral lesions. J.Oral Pathol.Med., 19: 477-481, 1990.
- MDURAD, S.; FRIEDMAN, L. Pathogenicity of Candida. J.Bacteriol., 81: 550-551, 1961.
- MUHLER, J.C.; SHAFER, W.G. Experimental dental caries. II.Effect of desalivation on dental caries and castration and desalivation on fluorine storage in the rat. J.Dent.Res., 33: 346-356, 1954.
- NANDA, R.; CATALANOTTO, F.A. Long terms effects of surgical desalivation upon taste acuity, fluid intake and taste buds in the rat. J.Dent.Res., 10: 69-76, 1981.
- NEELY, A.N.; HOLDER, I.A. Effect of proteolytic activity on virulence of Candida albicans in burned mice. Infect.Immun., 58: 1527-1531, 1990.
- ODDS, F.C. Candida and candidosis. Baltimore, Leicester, Univ.Press, 1979. p.352.
- ODDS, F.C. Candida infections: an overview. Critical Rev.Microbiol., 15: 1-5, 1987.
- ODDS, F.C. Ecology and epidemiology of Candida species. Zentralbl.Bakteriol.Hyg., 257: 207-212, 1984.

- ÖHMAN, S.C.; JONTELL, M. Treatment of angular cheilitis. The significance of microbial analysis, antimicrobial treatment, and interfering factors. Acta Odontol.Scand., 46: 267-272, 1988.
- OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. Acta Odontol.Scand., 48: 71-74, 1990.
- OLSEN, I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. Acta Odont.Scand., 32: 229-233, 1974.
- OLSEN, I. Oral adhesion of yeasts. Acta Odontol.Scand., 48: 45-53, 1990.
- OLSEN, I.; BIRKELAND, J.M. Initiation and aggravation of denture stomatitis by sucrose rinses. Scand.J.Dent.Res., 84: 94-97, 1976.
- OLSEN, I.; BONDEVİK, O. Experimental Candida-induced denture stomatitis in the Wistar rat. Scand.J.Dent.Res., 86: 392-398, 1978.
- OLSEN, I.; HAANAES, H.R. Experimental palatal candidosis and saliva flow in monkeys. Scand.J.Dent.Res., 85: 135-141, 1977.
- OLSEN, I.; STENDERUP, A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. Acta Odontol.Scand., 48: 11-18, 1990.

- OSTERBERG, T.; LANDAHL, S.; HEDEGARD, M. Salivary flow, saliva, pH and buffering capacity in 70-year-old men and women. J.Oral Rehabil., 11: 157-170, 1984.
- PARTRIDGE, B.M.; ATHAR, M.A.; WINNER, H.I. Chick embryo inoculation as a pathogenicity test for Candida species. J.Clin.Pathol., 24: 645-648, 1971.
- PETTINATI, A.H. Anatomia patológica das candidiases. In: LACAZ, C.S. Candidiases. São Paulo, Ed. Pedagógica Universitária e Ed.Universidade de São Paulo, 1980, p.101-112.
- PHILLIPS, A.W.; BALISH, E. Growth and invasiveness of Candida albicans in the germ-free and conventional mouse after oral challenge. Appl.Microbiol., 14: 737-741, 1966.
- POLLOCK, J.J.; DENEPIITIYA, L.; MACKAY, B.; IACONO, V.J. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on Candida albicans. Infect.Immun., 44: 702-707, 1984.
- PRICE, M.F.; CAWSON, R.A. Phospholipase activity in Candida albicans. Sabouraudia, 15: 179-185, 1977.
- PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.D. Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans. Sabouraudia, 20: 7-14, 1982.

- PROROK, Z. Relation between the occurrence of Candida albicans and usage of the fixed prostheses regarding prosthetic stomatopathy. Protet.Stomatol., 28: 223-232, 1978.
- PUGH, D.; CAWSON, R.A. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in Candida albicans. Sabouraudia, 13: 110-115, 1975.
- PUGH, D.; CAWSON, R.A. The cytochemical localization of phospholipase in Candida albicans infecting the chick chorio-allantoic membrane. Sabouraudia, 15: 29-35, 1977.
- RAMIREZ, V.; GONZALES, A.; ROSA, E.; GONZALES, M.; RIVERA, I.; HERNANDES, C.; PONCE DE LEON, S. Oral lesions in Mexican HIV-infected patients. J.Oral Pathol. Med., 19: 482-485, 1990.
- RAY, T.L., DIGRE, K.B., PAYNE, C.D. Adherence of Candida species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity. J.Invest.Dermatol., 83: 37-41, 1984.
- RAY, T.L.; PAYNE, C.D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for Candida acid proteinase. Infect.Immun., 56: 1942-1949, 1988.

- RAY, T.L.; WUEPPER, K.D. Experimental cutaneous candidiasis in rodents. J.Invest.Dermatol., 66: 29-33, 1976.
- RAY, T.L.; WUEPPER, K.D. Experimental cutaneous candidiasis in rodents. II.Role of the stratum corneum barrier and serum complement as a mediator of a protective inflammatory response. Arch.Dermatol., 114: 539-543, 1978.
- REBORA, A.; MARPLES, R.R.; KLIGMAN, A.M. Experimental infection with Candida albicans. Arch.Dermatol., 108: 69-73, 1973.
- REDAELLI, P. Experimental moniliasis. J.Trop.Med.Hyg., 27: 211-213, 1924.
- REED, M..F.; SCRAGG, M.A.; WILLIAMS, D.M.; SOAMES, J.V. "In vivo" effects of Candida albicans products on rat oral epithelium. J.Oral Pathol.Med., 19: 326-329, 1990.
- REINHOLDT, J.; KROGH, P. HOLMSTRUP, P. Degradation of IgA1, IgA2, and S-IgA by Candida and Torulopsis species. Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand., 93: 265-274, 1987.
- RENNER, R.P.; LEE, M.; ANDDRA, L.; McNAMARA, T.F. C.albicans in the diagnosis of denture stomatitis. J.Dent.Res., 57: 343, 1978.

- RENNIE, J.S.; HUTCHEON, A.W.; MacFARLANE, T.W.; MacDONALD, D.G. The role of iron deficiency in experimentally-induced oral candidosis in the rat. J. Med. Microbiol., 16: 363-369, 1983.
- ROGERS, T.; BALISH, E. Experimental Candida albicans infection in conventional rats. Infect. Immun., 14: 33-38, 1980.
- ROSSIE, K.M.; TAYLOR, J.; BECK, F.M.; HODGSON, S.E.; BLOZIS, G.G. Influence of radiation therapy on oral Candida albicans colonization: a quantitative assessment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 64: 698-701, 1987.
- RÜCHEL, R. A variety of Candida proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. Zentralbl. Bakteriол. Hyg., 257: 266-274, 1984.
- RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of Candida albicans. Sabouraudia, 20: 233-244, 1982.
- RUSSELL, C.; JONES, J.H. Effects of oral inoculation of Candida albicans in tetracycline-treated rats. J. Med. Microbiol., 6: 275-279, 1973a.

- RUSSELL, C.; JONES, J.H. The effects of oral inoculation of the yeast and mycelial phases of Candida albicans in rats fed on normal and carbohydrate rich diets. Arch. Oral Biol., 18: 409-412, 1973b.
- RUSSELL, C.; JONES, J.H. The histology of prolonged candidal infection of the rat's tongue. J.Oral Pathol., 4: 330-339, 1975.
- RUSSELL, C.; JONES, J.H.; GIBBS, A.C.C. The carriage of Candida albicans in the mouths of rats treated with tetracycline briefly or for a prolonged period. Mycopathologia, 58: 125-129, 1976.
- RUSSELL, C.; LAY, K.M. Natural history of Candida species and yeasts in the oral cavities of infants. Arch.Oral Biol., 18: 957-962, 1973.
- SAMARANAYAKE, L.P. Nutritional factors and oral candidosis. J.Oral Pathol., 15: 61-65, 1986.
- SAMARANAYAKE, L.P.; LAMB, A.B.; LAMEY, P.J.; MAC FARLANE, T.W. Oral carriage of Candida species and coliforms in patients with burning mouth syndrome. J.Oral Pathol.Med., 18: 233-235, 1989.
- SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. An "in-vitro" study of the adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. Arch.Oral Biol., 25: 603-609, 1980.

- 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., 27: 869-873, 1982a.
- SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. The adhesion of the yeast Candida albicans to epithelial cells of human origin "in vitro". Arch.Oral Biol., 26: 815-820, 1981.
- SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. The effect of dietary carbohydrates on the in-vitro adhesion of Candida albicans to epithelial cells. J.Med.Microbiol., 15: 511-517, 1982b.
- SAMARANAYAKE, L.P.; McCOURTIE, J.; MacFARLANE, T.W. Factors affecting the "in vitro" adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. Arch.Oral Biol., 25: 611-615, 1980.
- SAMARANAYAKE, L.P.; McLAUGHLIN, L.; MacFARLANE, T. Adherence of Candida species to fibrin clots "in vitro". Mycopathologia, 102: 135-38, 1988.
- SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MacFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of Candida species "in vitro". Sabouraudia, 22: 201-207, 1984.
- SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. Acta Odontol.Scand., 48: 27-36, 1990.

SCHIODT, M.; BAKILANA, P.B.; HIZA, J.F.R.; SHAO, J.F.; MBAGA, I.; NIELSEN, C.M.; LAURITZEN, E.; LERCHE, B.; KUIJLEN, K. Oral candidiasis and hairy leukoplakia correlate with HIV infection in Tanzania. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 69: 591-596, 1990.

SCHWARTZ, A.; SHAW, J.H. Studies on the effect of selective desalivation on the dental caries incidence of albino rats. J.Dent.Res., 34: 239-247, 1955.

SCHWARTZMAN, R.M.; DEUBLER, M.J.; DICE, P.F. Experimentally induced cutaneous moniliasis (Candida albicans) in the dog. J.Small Anim.Pract., 6: 327-332, 1965.

SEGAL, E.; LEHRMAN, O.; DAYAN, D. Adherence "in vitro" of various Candida species to acrylic surfaces. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 66: 670-673, 1988.

SHAFER, W.B.; HINE, M.K.; BARNET, M.L. Tratado de patologia bucal. 2ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1985, p.363-367.

SHAKIR, B.S.; MARTIN, M.V.; SMITH, C.J. Effect on experimental palatal candidosis in the wistar rat of removal and re-insertion of acrylic appliances. Arch.Oral Biol., 31: 617-621, 1986a.

- SHAKIR, B.S.; MARTIN, M.V.; SMITH, C.J. Induced palatal candidosis in the Wistar rat. Arch.Oral Biol., 26: 787-793, 1981.
- SHAKIR, B.S.; MARTIN, M.V.; SMITH, C.J. Relative effectiveness of various yeasts, Candida spp. and Torulopsis glabrata for inducing palatal infection in the wistar rat. Arch.Oral Biol., 28: 1069-1071, 1983.
- SHAKIR, B.S.; SMITH, C.J.; MARTIN, M.V. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the wistar rat. J.Oral Pathol., 15: 375-380, 1986b.
- SHAW, J.H.; WEISBERGER, D. Carious lesions in cotton rat molars. II. Effect of removal of principal salivary glands. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 70: 103-105, 1949.
- SHEPERD, M.G.; FOULTER, R.T.M.; SULLIVAN, P.A. Candida albicans: biology, genetics and pathogenicity. Ann.Rev. Microbiol., 39: 579-614, 1985.
- SHIMIZU, K.; SHIMIZU, F.; KAMIYAMA, K. Microbiological studies on denture-induced stomatitis in children. Pediatr.Dent., 9: 304-307, 1987.
- SHIMIZU, M.T. Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero Candida. Rev.Microbiol., 19: 442-445, 1988.

- SHIMIZU, M.T. Produção de hialuronidase, condroitin-sulfatase, proteinase e fosfolipase, por amostras de Candida albicans e sua correlação com virulência para camundongos inoculados experimentalmente. São José dos Campos, Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos/UNESP, 1990. 105p. (Tese de Livre-Docência).
- SHIMIZU, M.T; ALMEIDA, N.G. Fatores enzimáticos de agressão produzidas por bactérias aeróbicas da cavidade bucal. Rev.Odontol.UNESP, 18: 199-204, 1989.
- SOBEL, J.D.; MYERS, P.G.; KAYE, D.; LEVISON, M.E. Adherence of Candida albicans to human vaginal and buccal epithelial cells. J.Infect.Dis., 143: 76-82, 1981.
- SOBEL, J.D.; MULLER, G.; BUCKLEY, H.R. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. Infect.Immun., 44: 575-578, 1984.
- SOFAER, J.A.; HOLBROOK, W.P.; SOUTHAM, J.C. Experimental oral infection with the yeast Candida albicans in mice with or without inherited iron-deficiency anaemia. Arch.Oral Biol., 27: 497-503, 1982.

- SOUZA, E.M.B. Candida albicans (Robin) BERKHOUT. 1923 - Sorotipagem e estudos de alguns aspectos morfo-fisiológicos de amostras isoladas de materiais clínicos. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1988. 108p. (Dissertação de Mestrado).
- STEINMAN, R.R.; LEONORA, J.; SINGH, R.J. The effect of desalivation upon pulpal function and dental caries in rats. J.Dent.Res., 59: 176-185, 1980.
- STENDERUP, A. Oral mycology. Acta Odontol.Scand., 48: 3-10, 1990.
- STORMBY, N.G.; WALLENIUS, K. Effect of reduced salivation on oral tumor induction in hamster by 9.10-dimetyl-1.2-benzinthrane. Odontol.Rev., 13: 186-209, 1964.
- SWANGO, P.A.; KLEINMAN, D.V.; KONZELMAN, J.L. HIV and periodontal health. A study of military personnel with HIV. J.Am.Dent.Assoc., 122: 49-54, 1991.
- TABAK, A.L.; LEVINE, M.J.; MANDEL, I.D.; ELLISON, S.A. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. J.Oral Pathol., 11: 1-17, 1982.
- TAM, Y.C.; HARVEY, R.F.; CHAM, E.C.S. Chondroitin sulfatase producing and hyaluronidase producing oral bacteria associated with periodontal disease. J.Can.Dent.Assoc., 48: 115-120, 1982.

- TAPPER-JONES, L.M.; ALDRED, M.J.; WALKER, D.M.; HAYES, T.M.
Candidal infections and populations of Candida albicans
in mouths of diabetics. J.Clin.Pathol., 34: 706-711,
1981.
- TASCHDJIAN, C.L.; REISS, F.; KOZINN, P.J. Experimental
vaginal candidiasis in mice; its implications for
superficial candidiasis in humans. J.Invest.Dermatol.,
34: 89-94, 1960.
- TOBGI, R.S.; SAMARANAYAKE, L.P.; MAC FARLANE, T.W. "In
vitro" susceptibility of Candida species to lysozyme.
Oral Microbiol.Immunol., 3: 35-39, 1988.
- TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J.F.; ROBERT, R.; SENET, J.M.
Adherence of Candida albicans germ tubes to plastic:
ultrastructural and molecular studies of fibrillar
adhesins. Infect.Immun., 56: 1987-1993, 1988.
- TRUDEL, L.; ST-AMAND, L.; BAREIL, M.; CARDINAL, P.; LAVOI,
M.C. Bacteriology of oral cavity of Balb/c mice.
Can.J.Microbiol., 32: 673-678, 1986.
- TURREL, A.J.W. A etiology of inflamed upper denture-bearing
tissues. Br.Dent.J., 120: 542-546, 1966.

- UNTERKIRCHER, C.S. Candidíase crônica atrôfica (pesquisa de anticorpos específicos para C.albicans no soro e na saliva). São Paulo, Faculdade de Odontologia/USP, 1980. 41p. (Dissertação de Mestrado).
- UNTERKIRCHER, C.S.; TAUNAY, A.E.; TAKEDA, A. Candidíase crônica atrôfica. Pesquisa de anticorpos específicos no soro e na saliva. Rev.Odontol.UNESP, 12: 77-82, 1983.
- VAN CUTSEM, J.; THIENPORT, D. Experimental cutaneous Candida albicans infection in guinea-pigs. Sabouraudia, 9: 17-20, 1971.
- VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in the mouth. Rev.Infect.Dis., 5: 659-669, 1983.
- VIEIRA, S. Introdução à bioestatística, 2ed., Rio de Janeiro, Ed. Campus Ltda, 1983. 294p.
- VLUDHICHAMNOG, K. WALHER, D.M.; RYLEY, H.C. The effect of secretory immunoglobulin A on the in vitro adherence of the yeast Candida albicans to human oral epithelial cells. Arch.Oral Biol., 27: 617-621, 1982.
- WALLACE, M.; PETRUSNECK, F. The dental implications of xerostomia. A review of the literature. J.Alab.Dent.Assoc., 69: 44-47, 1985.

- WALLENIUS, K. Experimental oral cancer in the rat, with special reference to the influence of saliva. Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand., 180: 5-79, 1966.
- WALKER, D.M.; STAFFORD, G.D.; HUGGETT, R.; NEWCOMBE, R.G. The treatment of denture-induced stomatitis. Br.Dent.J., 151: 416-419, 1981.
- WATSON, C.J.; KROONE, H.B. The survival of Candida albicans experimentally inoculated into the mouths of healthy human subjects. J.Dent., 9: 248-253, 1981.
- WATSON, I.B.; MacDONALD, D.G. Oral mucosa and complete dentures. J.Prosthet.Dent., 47: 133-140, 1982.
- WILKIESON, C.; SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W.; LAMEY, P.J.; MackENZIE, D. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. J.Oral Pathol.Med., 20: 13-16, 1991.
- WILLIANSON, J.J. Diurnal variation of Candida albicans counts in saliva. Aust.Dent.J., 17: 54-60, 1972a.
- WILLIANSON, J.J. A study of extent of variation in daily counts of Candida albicans in saliva. Aust.Dent.J., 17: 106-109, 1972b.

- WINNER, H.I. An experimental approach to the study of infections by yeast-like organisms. Proc.R.Soc.Med., 51: 496-499, 1958.
- WRAY, D.; FELIX, D.H.; CUMMING, C.G. Alteration of humoral responses to Candida in HIV infection. Br.Dent.J., 168: 326-329, 1990.
- YOKOYAMA, K.; KAJI, H.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of Candida albicans. J.Gen.Microbiol., 136: 1067-1075, 1990.
- YODN, K.J.; EDGERTON, M.; LEVINE, M.J. Binding of Candida albicans to human saliva and acquired pellicles. J.Dent.Res., 68:355, 1989.