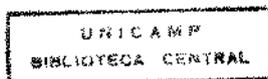


*Elizabeth Brasil dos Santos*

**EFEITOS DA XEROSTOMIA E DO TRATAMENTO COM  
4NQO NO DESENVOLVIMENTO DE CANDIDOSE NA  
LÍNGUA DE RATO**

Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
FOP/UNICAMP

1999

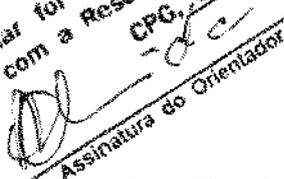


*Elizabeth Brasil dos Santos*

**EFEITOS DA XEROSTOMIA E DO TRATAMENTO COM  
4-NQO NO DESENVOLVIMENTO DE CANDIDOSE NA  
LÍNGUA DE RATO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Bucodental, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de doutor em Ciências.

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83  
CPG, 07/04/1999

  
Assinatura do Orientador

**Orientador: Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**

Piracicaba  
1999

UNIDADE	13C
N.º CHAMADA:	
V. _____	Est. _____
TOMBO BC/	37642
PROC.	229/99
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	RB. 11,00
DATA	06/05/99
N.º CPD	

CM-00123005-9

### Ficha Catalográfica

Sa59e Santos, Elizabete Brasil dos.  
 Efeitos da xerostomia e do tratamento com 4-NQO no desenvolvimento de candidose na língua de rato. / Elizabete Brasil dos Santos. – Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.  
 182f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.  
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Candida Albicans. 2. Glândulas salivares. 3. Patologia bucal. 4. Boca - Câncer. 5. Rato como animal de laboratório. I. Almeida, Oslei Paes de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



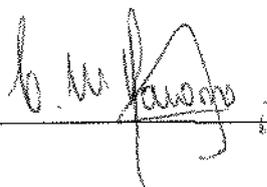
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

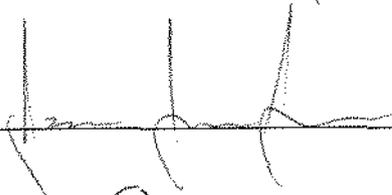


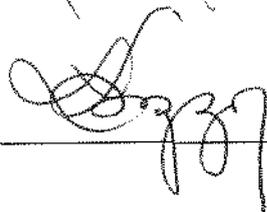
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 1999, considerou a candidata ELIZABETE BRASIL DOS SANTOS aprovada.

1. Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA 

2. Prof. Dr. ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE 

3. Profa. Dra. CLAUDIA MARIA NAVARRO 

4. Prof. Dr. JACKS JORGE JUNIOR 

5. Prof. Dr. LOURENÇO BOZZO 

À minha família, todo meu amor, por sempre ter me incentivado a seguir meu caminho. Por ter rido e chorado comigo durante essa jornada e estarem sempre presente.

Aos **amigos** que fiz em Piracicaba, que são muito importantes para mim. Sem vocês, meus amigos, a jornada teria sido mais difícil e solitária.

Ao Prof. **OSLEI PAES DE ALMEIDA**, todo meu respeito e carinho por ter tentado melhorar o que sou. Para quem me guiou por todos esses anos, todas as palavras de agradecimento não são suficientes. Meu eterno **OBRIGADA** por me ensinar o que é ser justo e bom e ter se preocupado com que eu me tornasse uma pessoa melhor.

*“Quem quiser ser professor deve começar ensinando a si mesmo antes de ensinar aos outros e ensinar pelo exemplo, antes de ensinar com palavras”*

*Kahlil gibran*

E é assim que você é. É o que você fez e faz!

Ao prof. **ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE**, por ter me mostrado o caminho! Com você essa caminhada começou! Através de você conheci a dedicação ao trabalho e à pesquisa. Também conheci Piracicaba, cidade maravilhosa, e as pessoas sinceras e competentes com as quais convivi durante esses anos. Você é o espelho para o qual sempre olharei e assim saberei pra onde ir.

## **Agradecimentos**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Antônio Wilson Salum e à Profª Dra. Darcy de Oliveira Tosello, atual coordenadora do curso de Pós-graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudos que nos deu a oportunidade para a realização do Curso de Pós-Graduação.

A todos os professores, alunos e amigos do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Aos amigos e professores da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por todo apoio, compreensão e por estarem sempre presentes ajudando em todos os momentos. À minha segunda família, meu **MUITO OBRIGADA!**

Às técnicas do laboratório e secretária da disciplina de Patologia, e principalmente grandes amigas, Ana Cristina Godoy, Maria Helena Peron e Rosa Maria, que como irmãs passaram com paciência seus conhecimentos para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao técnico de laboratório Adriano Martins, pela grande ajuda durante os experimentos com os animais.

À querida amiga Sílvia P. Paes de Almeida, pela grande ajuda durante os experimentos realizados neste trabalho e principalmente pela amizade sincera, que levarei comigo no coração. Você foi e é uma grande amiga!

Ao funcionário do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Sérgio Amaral pela inestimável ajuda no cuidado dos animais, durante o período experimental.

## **Sumário**

## Sumário

Introdução .....	08
Revisão da literatura .....	11
1 <i>Candida albicans</i> .....	11
1.1 Patogenicidade da <i>C. albicans</i> .....	14
1.2 Mecanismos de aderência da <i>C. albicans</i> .....	15
1.3 Capacidade de produzir pseudohifas e tubos germinativos ..	18
1.4 Produção de toxinas e enzimas .....	19
1.5 Presença de <i>C. albicans</i> na cavidade bucal de humanos .....	21
2 Candidose bucal .....	25
2.1 Fatores predisponentes à candidose .....	25
xerostomia .....	27
antibióticos e quimioterápicos .....	28
dieta .....	29
desordens endócrinas e imunossupressão .....	30
outros fatores .....	30
2.2 Classificação das candidoses bucais .....	31
3 Candidose experimental .....	34
4 <i>C. albicans</i> em lesões malignas e potencialmente malignas da cavidade bucal .....	38
5 Carcinoma bucal provocado pelo 4NQO em ratos.....	45
5.1 Método de aplicação do 4NQO .....	48
5.2 Lesões causadas pelo 4NQO .....	50
5.3 Alterações macroscópicas causadas pelo 4NQO .....	50
5.4 Aspect. microscópicos das alterações causadas pelo 4NQO..	51

5.5	Carcinoma causado pelo 4NQO .....	55
5.6	Efeitos da xerostomia na carcinogênese pelo 4NQO.....	57
6	<b>Proposição</b> .....	58
7	<b>Material e Métodos</b> .....	59
7.1	Animais .....	60
7.2	Sialoadenectomia .....	61
7.3	Aplicação do 4NQO .....	62
7.4	Observações macroscópicas e microscópicas .....	62
7.5	Recuperação de <i>C. albicans</i> e candidose.....	63
7.5.1	Presença de <i>Candida</i> na boca de ratos .....	64
7.5.2	Suspensão de <i>C. albicans</i> .....	64
7.5.3	Inoculação de <i>C. albicans</i> .....	65
7.5.4	Recuperação de <i>C. albicans</i> .....	66
7.5.5	Candidose .....	67
8	<b>Resultados</b> .....	69
8.1	Animais .....	70
8.1.1	Peso corporal .....	70
8.1.2	Carcinoma de boca .....	72
8.1.3	Observações macroscópicas .....	74
8.1.4	Observações microscópicos .....	76
8.2	Recuperação de <i>Candida</i> e candidose .....	77
8.2.1	Recuperação de <i>Candida</i> .....	78
8.2.2	Candidose .....	79
8.2.3	Figuras .....	85
8.2.4	Discussão.....	101
8.2.5	Conclusões .....	116

9	Aderência de <i>C. albicans</i> na língua de ratos normais	
e	xerostômicos tratados com tetraciclina .....	118
9.1	Introdução .....	119
9.2	Material e Métodos .....	121
9.3	<b>Resultados</b> .....	<b>125</b>
9.4	Figuras .....	134
9.5	Discussão .....	140
9.6	Conclusões .....	149
10	Resumo .....	151
11	Summary .....	154
12	Referências bibliográficas .....	157

## **Introdução**

## Introdução

A candidose é a micose mais comum da cavidade bucal, sendo *C. albicans* a principal espécie envolvida. Considerada infecção oportunista, com desenvolvimento relacionado à fatores predisponentes locais ou sistêmicos. A infecção por *Candida* é freqüente no palato de portadores de próteses totais, na glossite rombóide, imunossuprimidos e naqueles que recebem antibioticoterapia ou drogas que causam xerostomia. *Candida* pode infectar secundariamente lesões bucais como liquen plano, leucoplasias e carcinomas. A freqüência, o mecanismo de ocorrência, assim como o significado da infecção em cada uma dessas doenças não é conhecido. Não há evidências da participação da candidose no desenvolvimento de carcinomas bucais, mas alguns trabalhos mostram que a presença de *Candida* aumenta a severidade das displasias. Recentemente, BARRET et al. (1998) verificaram que 223 biópsias da mucosa de boca (4,7% do total de um período de 5 anos) foram positivas para *Candida*. Houve associação positiva com displasia epitelial moderada e severa, glossite rombóide mediana e papilomas escamosos. Houve correlação negativa com crescimentos fibrosos benignos, hiperqueratoses benignas, liquen plano e granuloma piogênico. Apenas 3.1% dos carcinomas espinocelulares foram positivos mas 15.2% das displasias

epiteliais severas e 18% das moderadas tinham hifas no epitélio. LIPPERHEIDE et al. (1996) sugerem que *C. albicans* possui alto potencial de adaptação às alterações associadas com o desenvolvimento de leucoplasias e liquen plano. ROED-PETESSEN et al. (1970) encontrou 31% das leucoplasias positivas para o fungo e 40% mostravam atipia. Experimentalmente, ZHANG et al. (1994) observaram que mucosa bucal de hamster com hiperplasia epitelial benigna e displasia epitelial com vários graus de severidade causadas pelo DMBA, quando inoculadas com *C. albicans* desenvolviam displasia nas áreas de hiperplasia epitelial benigna. Estes dados ainda não permitem inferir se o fungo causa displasia epitelial, mas confirmam a maior frequência de *Candida* em lesões com potencial de malignidade. Candidose experimental em ratos é mais frequente e mais intensa em animais sialoadenectomizados e/ou tratados com antibióticos. O objetivo deste trabalho é verificar o desenvolvimento de candidose em ratos portadores de carcinomas de língua, provocado pelo 4NQO.

## Revisão da Literatura

### 1 *Candida albicans*

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies distribuídas na natureza, sendo que algumas dessas espécies podem viver como saprófitas ou parasitas no homem e animais (KREGER-van RIJ, 1984; SHEPHERD et al., 1985; SHEPHERD, 1990). Dentre as espécies de *Candida*, a *C. albicans* merece maior destaque na micologia médica, por sua alta patogenicidade, entretanto espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* podem ser isoladas de seres humanos sadios ou apresentando micoses superficiais e profundas (STENDERUP, 1990).

As espécies do gênero *Candida* estão amplamente distribuídas na natureza, e todas elas são capazes de sobreviver sem um hospedeiro específico. Várias espécies do gênero foram isoladas da água do mar, água de esgoto, frutas, laticínios, aves e mamíferos. No homem pode ser isolada da orofaringe, boca, secreção brônquica, dobras da pele e vagina, podendo ser eliminada pela urina e fezes desses indivíduos.

As leveduras do gênero *Candida* apresentam morfologia variada. Comumente são ovóides, mas sua forma pode variar de redonda, cilíndrica e alongada a apiculada (com uma projeção em uma ou ambas as extremidades), triangular ou tubular. Sua reprodução vegetativa se dá por brotamento multilateral; as pseudohifas geralmente são bem desenvolvidas, mas podem não estar presentes ou ser apenas rudimentar em algumas espécies do gênero. Não se observam a produção de pigmentos carotenóides; algumas espécies elaboram exopolissacárides, cuja tonalidade varia do verde ao púrpura quando expostos à coloração de iodo (MEYER, 1984).

Na forma de leveduras apresentam-se como células globosas, ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 a 7  $\mu\text{m}$  de largura e 3 a 14  $\mu\text{m}$  de comprimento. Na forma de micélio, suas células apresentam-se como filamentos, denominados pseudohifas, podendo também formar hifas verdadeiras, especialmente quando o suprimento de oxigênio é baixo, como ocorre em colônias submersas em meio ágar e em sedimentos de caldo de cultura. São microrganismos Gram positivos, cultivados em aerobiose, podendo também crescer em anaerobiose, o que acentua a formação de micélio *in vitro* (PETTINATI, 1980; MEYER, 1984).

Em ágar Sabouraud, *C. albicans* apresenta-se como colônias brancas ou branco-amareladas, com diâmetro variando de 4 a 8 mm, úmidas e cremosas e com odor característico. Em meio de cultura líquido forma sedimento e em microcultivo, ágar fubá, produz estruturas esféricas características denominadas clamidoconídios (vesículas de parede espessa que não germinam nem produzem esporos). A identificação da espécie *C. albicans* é feita através do microcultivo em ágar fubá, para observação do clamidósporo; semeadura em soro a 37°C para observação da produção de tubo germinativo e provas bioquímicas de fermentação e assimilação de açúcares. *C. albicans* fermenta glicose e maltose, não ocorrendo fermentação da lactose e na maioria das vezes da sacarose; sendo a fermentação da galactose variável. Como fontes de carbono utiliza dextrose, galactose, maltose, trealose, xilose, sacarose e manitol; eventualmente arabinose, ribose e glucitol.

*C. albicans* é classificada em sorotipos A e B, sendo que o sorotipo A predomina em candidoses e estomatites por prótese total; enquanto que o sorotipo B é o mais isolado de pacientes imunossuprimidos, como na AIDS.

Nos tecidos, *C. albicans* induz reação inflamatória aguda, com edema, infiltrado inflamatório neutrofílico, com produção de microabscessos. Nas superfícies mucosas o crescimento miceliano é intenso, formado por massas de filamentos e leveduras, levando à formação de ulcerações (PETTINATI, 1980). Praticamente todos os órgãos e tecidos do corpo podem se tornar locais de colonização por *Candida* e de doença clínica manifesta, como demonstrado no quadro abaixo.

Quadro 1- Envolvimento de espécies do gênero *Candida* na produção de doenças.

Doença ou local anatômico	<i>albicans</i>	<i>guillier mondii</i>	<i>krusei</i>	<i>parapsi losis</i>	<i>pseudo tropicalis</i>	<i>stela toidea</i>	<i>tropicalis</i>
Endocardite	x	x	x	x		x	x
Candidemia	x	x	x	x	x	x	x
SNC	x	x					x
Infecção ocular	x			x	x		x
Trato gastrointestinal	x	x	x	x	x		x
Trato respiratório	x	x	x	x	x	x	
genitais	x					x	x
Trato urinário	x	x	x	x	x	x	x
Pele	x	x		x			x

### 1.1 Patogenicidade da *C. albicans*

Patogenicidade é a capacidade de um microrganismo em causar doença, em consequência de sua interação com o hospedeiro. Vários fatores têm sido implicados na patogenicidade da *Candida*, entretanto ainda não estão totalmente

compreendidos. Os fatores mais comumente implicados são: capacidade de aderência às mucosas e outras superfícies; capacidade de formar pseudohifas; formação de tubo germinativo; produção de enzimas histolíticas e endotoxinas.

## 1.2 Mecanismos de aderência da *C. albicans*

A aderência das leveduras às células epiteliais é um dos passos mais importantes no desenvolvimento de candidose (KIMURA et al., 1978; GHANNOUM, et. al., 1990). A aderência da *Candida* à mucosa bucal ocorre principalmente pela interação entre adesinas do microrganismo e receptores nas células epiteliais. As possíveis adesinas da *Candida* são manoproteínas, glucano e quitina, proteínas da parede celular e lipídios. Essas adesinas encontram como receptores moléculas de fibronectina, fucose, lipídios, manose, N-acetilglicosamina, mucinas, lamininas e colágeno (DOUGLAS, 1985; DOUGLAS, 1987; GHANNOUM, 1988; KENNEDY, 1988; OLSEN, 1990).

A aderência é necessária para a colonização inicial e contribui para a persistência da *Candida* no hospedeiro. Sem se aderir, a taxa de crescimento de *C. albicans* é insuficiente para manter o fungo na boca ou trato gastrintestinal.

A maioria dos estudos sobre aderência de *Candida* é realizada *in vitro*. Em cultura de células da mucosa do dorso da língua de ratos recém-nascidos, HOWLETT (1976) estudou a aderência e capacidade de invasão de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. *C. albicans* foi a única espécie capaz de invadir todos dos tecidos, inclusive o estrato córneo. RAY et al. (1984) observaram aderência de *Candida* aos queratinócitos e às células mucosas e sugeriram que a aderência às células epiteliais fornece estímulo para a transformação micelial. DOUGLAS (1984) demonstraram que amostras de *C. albicans* isoladas de infecções da cavidade bucal são mais virulentas para camundongos e mais aderentes que amostras isoladas de portadores assintomáticos. COTTER et al. (1997) demonstraram que alterações na membrana de células nos estágios iniciais de apoptose diminui a aderência de *C. albicans*.

Numerosos fatores podem influenciar na adesão de *Candida*. As condições de cultivo das leveduras são de extrema importância. ANTLEY & HAZEN (1988) demonstraram que células de *C. albicans* que cresceram à temperatura ambiente são mais virulentas para camundongo que aquelas cultivadas a 37°C. KENNEDY & SANDIN (1988), consideram importante o meio utilizado para cultivo. Os autores sugerem que a utilização de diferentes meios de cultura pode

explicar as discrepâncias na literatura referentes à natureza bioquímica dos componentes de superfície responsáveis pela adesão da levedura.

MACOURTIE & DOUGLAS (1984) encontraram relação direta entre a composição da superfície celular, aderência e virulência de *C. albicans*. Amostras de *C. albicans* foram capazes de sintetizar uma camada de superfície fibrilar em resposta às altas concentrações de açúcar no meio e esta modificação resultou no aumento de adesão às células epiteliais bucais e na virulência para camundongos. Assim, essas alterações devem ter importância *in vivo*, principalmente em indivíduos com dieta rica em carboidratos. Além disso, as fibrilas representam apêndices semelhantes às fímbrias, responsáveis pela aderência bacteriana, cuja presença já foi relatada por GARADINER et al. (1982).

Dentre as espécies de *Candida*, a *C. albicans* possui maior capacidade de aderência às células epiteliais e outras superfícies, o que pode estar diretamente relacionado com sua maior patogenicidade em comparação com as outras espécies (KIMURA, 1978).

O papel da saliva na aderência de *Candida* às células epiteliais é controverso. A inibição da aderência de *Candida* pela saliva depende amplamente dos resíduos de manose nas proteínas salivares (UMAZUME et al., 1995).

### 1.3 Capacidade de produzir pseudohifas e tubo germinativo

Tubo germinativo é uma estrutura desenvolvida apenas pela espécie *C. albicans*, que aumenta sua capacidade de aderência às células epiteliais, ao acrílico e pele; e também propiciam aumento da habilidade invasiva às células do hospedeiro (KIMURA & PEARSAL., 1980; RAY & PAYNE, 1984). Além disso, o tubo germinativo apresenta outras adesinas que não estão presentes nos blastóporos, que ajudam a aumentar a aderência. Na forma de filamentos a *Candida* causa doença. Amostras que formam pseudohifas são mais patogênicas que aquelas não produtoras (FISKER et al., 1982; JORGE et al., 1993). A relação entre a forma miceliana e infecção implica no fato de que as pseudohifas são mais resistentes do que as leveduras à fagocitose por neutrófilos, penetrando com mais facilidade nos tecidos, provavelmente pela atividade fosfolipásica concentrada em suas extremidades (GHANNOUN & ABU-ELTEEN, 1990; HEIMDAHL & NORD, 1990).

#### 1.4 Produção de toxinas e enzimas

A secreção de enzimas hidrolíticas geralmente contribuem para a patogênese de infecções microbianas (VOLKMANN, 1990). *C. albicans* é produtora de numerosas enzimas, entre elas fosfolipase, lipase, fosfomonoesterase, hexosaminidases e pelo menos 3 proteinases aspárticas (WHITE et al., 1993; ODDS, 1994).

Enzimas e toxinas produzidas pela *Candida* são determinantes importantes de patogenicidade da levedura e favorecem sua implantação e penetração no tecido. A proteinase, produzida por *C. albicans* é capaz de degradar IgA secretória e sérica presente na saliva. KAMINISH et al. (1988) descreveram produção de proteinase pela *C. albicans*, com capacidade de degradar colágeno, sendo por esta razão mais invasivas que as demais espécies. A proteinase é produzida principalmente por espécies patogênicas de *Candida*. A relação dessa enzima com a virulência foi determinada utilizando-se amostras mutantes deficientes em proteinase (ROSS et al., 1990).

GHANNOUM & ABU-ELTEEN (1986) estudaram a relação entre a produção de proteinase e a aderência e patogenicidade de amostras de *C. albicans*

para células epiteliais de camundongo e verificaram que das 53 amostras utilizadas, todas eram produtoras da enzima e apresentavam habilidade de adesão às células. Quanto maior a produção de proteinase pela *Candida*, maior a capacidade de adesão e maior patogenicidade para camundongo, quando inoculadas endovenosamente. Achados semelhantes foram relatados por BORG & RÚCHEL (1988). Os mesmos autores, em 1990, observaram que amostras de *Candida* altamente produtoras de proteinase podem germinar dentro de macrófagos, levando-os à morte.

Fosfolipase e lipofosfolipase foram demonstradas por PUGH & CAWSON (1975) em blastóporos, pseudohifas, membranas e parede celular de *C. albicans*. Amostras com atividade fosfolipásica aumentada aderem-se mais fortemente às células epiteliais bucais (BARRET-BEE, 1985). Produção de hialuronidase foi observada em 50% de amostras de *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, em 44% de *C. parapsilosis* e em 16% de *C. krusei*.

A produção de toxinas por espécies de *Candida* foi sugerida por HENRICI (1940) e SALVIN (1952). Dentre as toxinas, a candidoxina é a melhor caracterizada (IWATA, 1975). É uma endotoxina de natureza protéica, de alto peso molecular, localizada no citoplasma da célula, cuja ação parece estar relacionada com a liberação de histamina dos mastócitos.

Fatores *Killer*, são substância protéicas secretada *in vitro* por várias cepas de *C. albicans*, que inibem o crescimento de outros fungos e bactérias, semelhante às bacteriocinas. O efeito *Killer* foi primeiramente observado em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, sendo posteriormente encontrado na *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula* e *Torulopsis*. As toxinas *Killer* agem na membrana citoplasmática, levando a um aumento da permeabilidade, com perda de potássio, inibição do transporte ativo de aminoácidos e acidificação do interior celular, levando à morte celular (BEVAN, 1963; POLONELLI & MORAGE, 1984; BENDOVA, 1988).

### 1.5 Presença de *Candida albicans* na cavidade bucal de humanos

As leveduras são os únicos fungos pertencentes à microbiota normal do homem, podendo ser isoladas de cerca de 60 a 70% de adultos jovens saudáveis (STENDERUP, 1990), existindo relação direta entre o grau de acidez salivar e a ocorrência desse fungo na boca. A presença de espécies do gênero *Candida* na cavidade bucal pode apresentar um índice de variação entre 35 a 60% em indivíduos saudáveis, sendo essa variação decorrente provavelmente dos diferentes

métodos de coleta, origem das amostras, meio de cultura, grupos de indivíduos estudados e métodos de análise (FOTOS, 1991; MARSH et al., 1992).

GERGELY & URY (1961) encontraram um índice de 70% de *C. albicans* na cavidade bucal de indivíduos sadios. Utilizando-se da mesma metodologia, esses autores estudaram a variação diária de fungos na boca durante 8 dias e observaram grandes variações no mesmo indivíduo. WILLIAMSON (1972) encontrou variações semelhantes e sugere que as contagens devem ser realizadas em vários dias para a determinação da população de *Candida* em um indivíduo.

ARENDORF & WALKER (1979, 1980) obtiveram culturas positivas para leveduras, utilizando-se de várias técnicas, sendo *C. albicans* identificada em 88%, *C. krusei* e *C. guilliermondii* em 4%.

*C. albicans* não está distribuída uniformemente na boca, sendo o dorso da língua o reservatório primário do fungo, a partir do qual o restante da mucosa, superfície dos dentes, placa bacteriana e saliva tornam-se colonizados secundariamente.

Em crianças, A presença de *C. albicans* é relatada na cavidade bucal de 5 a 7% nas primeiras horas pós-parto; em 14,21% após 1 semana; em 49% das crianças entre 3 a 5,5 anos e em 65% nas crianças de 6 a 12 anos (RUSSEL & LAY, 1973; LAY & RUSSEL., 1977). No estudo desenvolvido por

BERDICEVSKY et al. (1984), *Candida* estava presente em 49% das crianças entre 3 a 5,5 anos e em 65% nas de 6 a 12 anos.

DARWAZEH & AL-BASHIR (1995) estudaram a presença de *Candida* na cavidade bucal de 206 crianças saudáveis entre 2 a 11 meses de idade. Espécies de *Candida* foram isoladas em 48% das crianças, sendo *C. albicans* a mais frequente (30,6%), seguida de *C. parapsilosis* (5,8%). Os autores concluíram que *Candida* constitui parte da microbiota comensal bucal em aproximadamente 50% das crianças saudáveis com menos de 1 ano de idade, não levando em consideração o gênero e aspectos alimentares.

No estudo realizado por JORGE et al. (1997), a presença de espécies do gênero *Candida* foi pesquisada em 570 indivíduos normais e 493 pacientes com diferentes fatores predisponentes locais. Os grupos com fatores predisponentes apresentaram 73,80% dos pacientes positivos para *Candida*, enquanto que no grupo de indivíduos normais, a porcentagem foi de 38,42%. Neste estudo observou-se ainda que a espécie predominante era a *C. albicans* e que os grupos com fatores predisponentes, principalmente os usuários de prótese, apresentaram maior diversidade de espécies.

Pacientes sadios geralmente apresentam baixas contagens de *Candida* na cavidade bucal. Pacientes com candidose apresentam contagens de *C. albicans*

geralmente superiores a 400 ufc/ml de saliva, enquanto que nos portadores, os valores são sempre inferiores a este. WILLIAMSON (1972) relata que valores entre 300 e 500 ufc/ml são encontrados em indivíduos sadios, embora esses valores variem de acordo com o período do dia em que a pesquisa é realizada. Os portadores apresentam os maiores valores pela manhã e ao final da tarde. Em pacientes hospitalizados, *C. albicans* é isolada em valores superiores a 80%, atingindo índice semelhante em pacientes portadores de AIDS (ODDS, 1987; FRANKER et al., 1990; WILKIESON et al., 1991).

Vários fatores podem influenciar no estado de portador dos indivíduos. Entre esses fatores estão a dieta, interações com a microbiota bacteriana, diferenças no tecido do hospedeiro e fluidos corpóreos, presença de anticorpos específicos, componentes do soro e grupo sanguíneo (WILLIAMSON, 1972;; JENKINS, 1977; ROGERS & BALISH, 1980; SAMARANAYAKE, 1986; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; STENDERUP, 1990). Os indivíduos não secretores de grupos sanguíneos na saliva possuem maior predisposição à candidose (BURFORD-MASON et al., 1988).

O fator idade parece influenciar na presença e *Candida*. Em crianças, o sistema imunológico imaturo favorece a implantação do fungo. Já na idade avançada, a presença de doenças sistêmicas e o uso de medicamentos pode

favorecer o estado de portador de *Candida* (RUSSEL & LAY., 1973; BASTIAAN & READE, 1982).

## 2 Candidose bucal

Candidose é a micose mais comum da boca. *C. albicans* é a espécie mais freqüentemente envolvida, sendo que a infecção é facilitada por fatores locais ou sistêmicos, como uso de próteses totais e imunossupressão (STENDERUP, 1990). Outras espécies de *Candida* estão sendo freqüentemente isoladas, particularmente de indivíduos imunocomprometidos (ODDS et al., 1989; NORD, 1990). Candidemias em pacientes recebendo terapêutica anti-fúngica são causadas por espécies não *C. albicans*, como *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Isto é relevante porque as espécies não *C. albicans* são mais resistentes aos agentes anti-fúngicos (NGUYEN et al., 1996).

### 2.1 Fatores predisponentes à candidose

A candidose bucal é uma infecção oportunista. A capacidade da *Candida* de causar infecção está relacionada ao estado geral de saúde do hospedeiro ou à

presença de fatores predisponentes locais ou sistêmicos. Assim, a virulência da *Candida* é determinada mais pelo hospedeiro que por fatores inerentes à própria levedura (ALLEN, 1992; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

A relação dos principais fatores predisponentes com o tipo de candidose bucal e seu aspecto clínico foi descrita por CANNON (1995) e está demonstrada no quadro abaixo.

**Quadro 2 -** Relação entre fatores predisponentes, tipo de candidose e aspecto clínico das lesões.

Fatores predisponentes	Candidose bucal	Patologia
Idade( recém-nascidos e idosos) Deficiência nutricional Uso oral ou sistêmico de esteróides Antibióticos de largo espectro Lesão maligna Quimioterapia Disfunção fagocitária Disfunção na imunidade mediada por células AIDS	Candidose Pseudomembranosa	Placas brancas e cremosa sobre a superfície da mucosa bucal e língua, formando pseudomembranas confluentes, semelhante à coágulo. A raspagem da pseudomembrana revela uma base eritematosa inflamada.
Uso de próteses bucais Hábito de sugar o polegar	Candidose atrófica crônica (estomatite por prótese) Queilite angular	Edema e eritema crônicos, do palato duro Fissuras e incrustações nos cantos da boca, comumente associada com estomatite por prótese.
Asma/ uso de corticosteróides Antibióticos de largo espectro	Candidose atrófica aguda	Lesões pequenas, geralmente na língua, com inflamação e aspecto vermelho dos tecidos circundantes.
Hiperplasia celular Câncer bucal Tabaco Uso de próteses bucais	Candidose hiperplásica crônica (leucoplasia por <i>Candida</i> )	Lesões nodulares, duras e crônicas na superfície da língua ou na bochecha. <i>Candida</i> associada à hiperplasia das células epiteliais do hospedeiro.

Dentre os fatores locais, a xerostomia e o uso de antibióticos são considerados os mais importantes, principalmente pela alteração do equilíbrio da microbiota indígena bucal (FOTOS et al., 1992) .

### **Xerostomia**

Em indivíduos xerostômicos, a ausência da saliva favorece a implantação de *Candida*, primeiro porque nestes indivíduos a limpeza mecânica da boca, exercida pela saliva, está ausente ou diminuída, contribuindo para a presença de maior número de microrganismos na boca e para a retenção de alimentos. Além disso, a saliva possui substâncias antimicrobianas como a lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase e glicoproteínas, responsáveis pela integridade local. Polipeptídios ricos em histidina da saliva da parótida possuem ação anti-fúngica, inibindo o crescimento de *C. albicans in vitro*, podendo ter a mesma ação *in vivo* (PARVINEN & LARMAS, 1981; OKSALA, 1990).

Síndrome de Sjögren, radioterapia de cabeça e pescoço e o uso de medicamento são as principais condições que podem levar à xerostomia (HERNANDEZ et al., 1989; HEIMDAHL & NORD, 1990).

A xerostomia pode resultar no ressecamento da mucosa bucal, fissura na língua e lábios e freqüentes ulcerações (GLASS, 1984). Xerostomia induzida por radiação em pacientes com câncer, causa aumento no número de *Candida* na boca, com redução no nível de imunoglobulina na saliva e ulcerações na mucosa bucal (WAHLIN, 1991).

Vários estudos experimentais têm demonstrado os efeitos da xerostomia na candidose bucal. MEITNER et al. (1990) desenvolveram candidose mais intensa na boca e esôfago de ratos com fluxo salivar reduzido. No estudo realizado por JORGE (1991), após 3 inoculações consecutivas de *C. albicans*, candidose foi observada em 70% dos ratos xerostômicos e em 20% dos animais com salivagem normal.

### **Antibióticos e Quimioterápicos**

O uso de antibióticos, principalmente de largo espectro, pode impedir ou inibir o desenvolvimento de microrganismos indígenas que atuam como antagonistas à implantação da levedura, seja por competição por alimentos ou pela aderência à receptores nas células epiteliais que também servem de receptores para a *Candida* (OKSALA, 1990).

Quimioterápicos usados no tratamento de neoplasias malignas pode causar alteração na quantidade e fluxo salivar e a mucosa fica mais susceptível à ulcerações por trauma, que podem favorecer a retenção, aderência e colonização pelo fungo. ROSSIE et al. (1987) relatam aumento do número de *Candida* recuperada em 47% dos pacientes que apresentavam culturas negativas antes da radiação. Em 50 pacientes com câncer bucal estudados antes e durante radioterapia por PAULA et al. (1990), *C. albicans* foi isolada em 30%; *C. tropicalis* em 12%; *C. glabrata* e *C. krusei* em 4%, *C. parapsilosis* e *Candida ssp* em 2% dos pacientes.

## Dieta

Quando rica em carboidratos solúveis favorece o desenvolvimento de candidose bucal, possivelmente porque os carboidratos, como a glicose, servem como substrato metabólico, estimulam o crescimento fúngico e aumentam a capacidade de aderência da *Candida* (JENKINS, 1977; SAMARANAYAKE, 1986).

Fatores nutricionais incluindo deficiências de ferro e vitaminas têm sido relatados na patogênese de infecções bucais por *Candida*. Íons ferro parecem

atuar modulando o sistema de lactoferrina e lisozima, alterando o ritmo de crescimento de células epiteliais ou reduzindo a fagocitose e produção de anticorpos (WALKER, 1973; FLETCHER, 1975).

### **Desordens endócrinas e imunossupressão**

Nas desordens endócrinas como a diabetes mellitus e hiperparatireoidismo, são observadas altas taxas de candidose. KNIGHT & FLETCHER (1971) relatam que pacientes diabéticos possuem concentrações elevadas de glicose na saliva, o que pode favorecer o crescimento de *Candida*. Em 412 pacientes diabéticos estudados por FISHER et al. (1987), 210 (51%) eram portadores de *Candida*, sendo *C. albicans* a espécie isolada em 89% dos casos. Em diabéticos controlados e não controlados, a incidência de *C. albicans* foi de 51.7% dos pacientes controlados e de 62.5% dos não controlados.

### **Outros fatores**

O papel do tabaco na candidose bucal é controverso. O aumento da queratinização do epitélio em pacientes fumantes parece facilitar a aderência de

*Candida* ao epitélio. ARENDORF et al. (1982) observaram relação entre infecções na mucosa bucal e tabagismo, entretanto outros estudos não observam essa relação (OLIVER & SHILLITOE, 1984; BASTIAAN & READE, 1982).

Fatores como gravidez e uso de prótese foram relacionados à presença de *Candida* na cavidade bucal provavelmente por causar alteração no fluxo salivar ou na imunidade causadas pelo desequilíbrio hormonal. IACOPINO & WATHEN (1992) relatam que 65% dos usuários de prótese desenvolvem estomatite por *Candida*. Esta condição pode ser favorecida quando a higienização da boca e da prótese são precárias. BUDTZ-JÖRGENSEN et al. (1975), encontraram prevalência de 86.5% de portadores de *Candida* entre pacientes com mucosite por prótese, sendo *C. albicans* a espécie isolada com maior frequência.

## 2.2 Classificação das candidoses bucais

De acordo com seu aspecto clínico, a candidose bucal é classificada em aguda e crônica. As formas agudas são subdivididas em pseudomembranosa e eritematosa. As candidoses crônicas são subdivididas em pseudomembranosa, tipo "placa" e nodular (HOLMSTRUP & AXÉL, 1990).

Clinicamente, as lesões da forma pseudomembranosa aguda aparecem como placas brancas e cremosas, com localização principalmente na língua, palato e bochecha, podendo ocorrer também na gengiva e soalho de boca. Histologicamente, a pseudomembrana é formada por tecido necrótico, restos alimentares, leucócitos e bactérias, juntamente com leveduras e pseudohifas de *Candida*, que podem apresentar invasão na camada queratinizada do epitélio. Acantose, edema e microabscessos também estão presentes. Infiltrado inflamatório PMN, linfócitos e macrófagos estão presentes no tecido conjuntivo (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

A candidose eritematosa aguda apresenta-se como áreas avermelhadas com bordas pouco definidas, na maioria dos casos está localizada no dorso da língua, podendo estender-se às comissuras labiais e faringe (LEHNER, 1964). As áreas despiladas apresentam sintomatologia dolorosa. Histologicamente, o aspecto é semelhante ao observado na pseudomembranosa, entretanto a quantidade de hifas é menor e a reação inflamatória no tecido conjuntivo é mais acentuada (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

As formas crônicas pseudomembranosa e eritematosa são freqüentemente observadas em indivíduos imunossuprimidos. O tipo "placa" é encontrado principalmente no lábio, língua e bochecha, e clinicamente apresentam-se como

placas brancas, geralmente firmes e persistentes, circundadas por eritema. Na forma nodular há a formação de pápulas ou nódulos (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; HOLMSTRUP, 1990) .

Queilite angular, estomatite por prótese e glossite rombóide mediana são denominadas lesões associadas à *Candida*. A etiologia dessas lesões é discutida, entretanto acredita-se que sejam decorrentes de associação microbiana com leveduras (ARENDORF & WALKER, 1984; ARENDORF & WALKER, 1987).

A candidose mucocutânea crônica é observada principalmente na boca, pele e unhas. Quando localizada na cavidade bucal, a língua é o principal sítio envolvido e pode apresentar fissuras e nódulos hiperplásicos nas bordas laterais. É uma doença rara, com manifestação grave, que constitui um grupo de desordens heterogêneas, associadas à deficiências imunológicas, endócrinas e metabólicas. Candidose bucal pode ser observada em 90% dos casos e são semelhantes às candidoses bucais crônicas (ARANSON & SOLTAMI, 1976; HOLMSTRUP & BESSERMANN, 1983; LYNCH, 1990).

### 3 Candidose experimental

A candidose bucal experimental é estudada em várias espécies de animais, como coelhos (MACKIKNNON, 1936), macacos (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1973) e camundongos (LACASSE et al., 1990). O rato é a espécie mais usada, através de inoculações de *Candida* por períodos curtos ou prolongados, associados a fatores predisponentes como antibióticos, próteses totais e xerostomia (JONES & RUSSEL., 1973, FISHER et al., 1982, JORGE et al., 1993). JONES & RUSSEL (1974) relatam a incidência de candidose na mucosa da língua em 55% dos ratos inoculados com *C. albicans* durante 22 semanas. JONES et al. (1976) demonstraram histologicamente infecção em 14, 40 e 20% dos ratos em 6, 9 e 12 meses de inoculações semanais de *C. albicans*, respectivamente.

Mesmo com inoculação prolongada da levedura, as candidoses bucais em ratos são reversíveis. ALLEN et al. (1988) obtiveram lesões clinicamente visíveis na língua de 17 ratos inoculados com *C. albicans* durante 20 semanas. Os animais receberam 20 mg/Kg/dia de cetoconazol por 2 semanas e 9 animais não

receberam tratamento. Em todos os animais tratados, as lesões regrediram, enquanto 2 ratos do grupo controle apresentaram regressão das lesões.

O desenvolvimento de candidose após inoculação por período curto foi demonstrado por FISHER et al. (1982). Os autores relatam a alta incidência inicial de candidose, após 3 inoculações da levedura em 3 dias alternados, seguida de rápido declínio após 5 semanas da primeira inoculação. 33% dos animais apresentaram candidose, principalmente na gengiva marginal (98,8%), mucosa do sulco bucal e lingual e a língua. Para os autores a presença da infecção nesses sítios deve-se às características do epitélio e à presença e natureza da queratina.

Além de *C. albicans*, a patogenicidade das demais espécies de *Candida* de importância médica também é estudada em animais experimentais, como o rato e camundongo. SHAKIR et al. (1983) testaram a habilidade de *C. albicans* sorotipos A e B, *C. tropicalis* e *C. glabrata* em produzir candidose no palato de ratos. *C. albicans* sorotipo A foi mais eficaz em produzir candidose que o sorotipo B. *C. tropicalis* e *C. glabrata* apenas causaram infecção em animais portadores de placa acrílica.

O uso de camundongos para se estudar candidose bucal é também um bom modelo, uma vez que este animal não é portador da *Candida* na boca e possui uma microbiota bacteriana bastante restrita e já definida, constituindo-se

de 20 espécies. HASENCLEVER (1959) inocularam *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, e *C. guilliermondii* intravenosamente em camundongos e observaram alta letalidade pela *C. albicans* e ligeira letalidade por *C. tropicalis*. As demais espécies não produziram morte nos animais. *C. tropicalis* mostrou ser a segunda espécie mais patogênica neste e em estudos realizados por HASENCLEVER & MITCHEL, 1961; HURLEY & WINNER, 1962; FROMTLING, 1987.

A candidose na boca de ratos, embora confinada à camada córnea, está associada a alterações significativas nas células epiteliais mais profundas, sugerindo que pode ter algum papel no desenvolvimento de alguns tipos de leucoplasias (JONES & RUSSEL, 1973). Entretanto ALLEN & BECK (1987) observaram a presença de pseudohifas no interior da queratina, porém sem alterações nas camadas celularizadas do epitélio do dorso da língua de ratos após inoculação de *C. albicans* durante 16 semanas. Em ratos inoculados com *Candida* durante 40 semanas, candidose foi observada principalmente na porção média do terço posterior da língua, com aspectos clínicos e histológicos semelhantes ao da glossite rombóide mediana (ALLEN et al., 1982).

Aspectos microbiológicos e histológicos de candidose bucal em camundongos foi demonstrado por LACASSE et al. (1990). O desenvolvimento

de candidose foi estudado de 1 hora a 7 dias após inoculação de *C. albicans*. Após 3 horas os autores observaram presença de tubo germinativo na queratina e as áreas de candidose aumentavam progressivamente, tornando-se mais acentuadas no período de 48 horas.

Segundo vários autores, a presença de *C. albicans* aumenta o desenvolvimento de neoplasias. MANKOWSKI (1963) após injeção de *C. albicans* no baço de ratos, descreveu aumento significativo na formação de tumores malignos. O mesmo autor em 1971 descreveu maior incidência de tumores em ratos e camundongos recém-nascidos injetados com metilcolantreno, e concomitantemente com glicoproteínas de *C. albicans*.

De acordo com BLANK et al. (1968) extratos de *C. parapsilosis* injetados no subcutâneo de camundongos causaram sarcomas. Células de fibrossarcoma infectadas por *C. albicans* metastatizaram mais rapidamente quando injetadas em camundongos (GINSBURG et al., 1987). No carcinoma de boca de rato causado pelo 4NQO, O'GRADY & READE (1992), verificaram que *C. albicans* tem efeito semelhante ao promotor ester de forbol, potencializando portanto a ação do 4-NQO. Apesar da freqüente presença de *Candida* nos carcinomas e leucoplasias bucais de humanos, não há evidências da participação da *Candida* nessas lesões, sendo considerada como infecção oportunista (FIELD et al., 1989).

#### 4 *C. albicans* em lesões potencialmente malignas e malignas da cavidade bucal

*C. albicans* é freqüentemente isolada de lesões malignas e potencialmente malignas na cavidade bucal, entretanto seu papel na etiologia dessas lesões é incerto. A interpretação mais aceita para a presença de *Candida* nessas lesões é que ela seja um colonizador secundário da mucosa previamente alterada.

Dentre as lesões potencialmente malignas da boca, encontramos as leucoplasias, eritroplasias e liquen plano, sendo que a *C. albicans* é isolada com maior freqüência das leucoplasias em relação às demais. Leucoplasia é um termo clínico para indicar lesões com aspecto esbranquiçado na mucosa bucal, cuja etiologia não pode ser relacionada à qualquer doença conhecida. Histologicamente, as leucoplasias apresentam hiperqueratose, o que pode explicar a constante presença de *C. albicans*, que é queratofílica.

As leucoplasias bucais podem sofrer transformação maligna em cerca de 0.13 a 6.0 % dos casos (BÁNÓCZY & SUGAR, 1970; BÁNÓCZY, 1977).

As leucoplasias bucais dividem-se nas formas homogêneas e não homogêneas. O tipo homogêneo apresenta uma superfície ondulada e macia. O tipo não homogêneo pode ser dividido em: Eritroplasia - lesões brancas

intercaladas com áreas avermelhadas; Leucoplasia nodular: lesões brancas, com áreas nodulares e granulares; e Leucoplasia verrucosa: lesão exofítica, com projeções pontiagudas e grosseiras (AXÉLL et al., 1984)

A transformação maligna das leucoplasias do tipo não homogêneo varia de 7 a 49%. *Candida* pode ser encontrada em todos os tipos de leucoplasia, entretanto o tipo não homogêneo apresenta maior predisposição à invasão. Nessas lesões, o biotipo de *Candida* é diferente daquele isolado da mucosa bucal normal (PINDBORG et al., 1963; SILVERMAN & ROZEN, 1968; SILVERMAN et al., 1984; KROGH et al., 1987; HOGEWIND et al., 1989; BÁNÓCZY & RIGÓ, 1991).

CAWSON em 1966, estudou a prevalência de *Candida* em 171 amostras de leucoplasia, 27 de líquen plano e 6 de carcinoma e encontrou a levedura em 15 casos de leucoplasia e 2 de carcinoma. *Candida* estava ausente das lesões de líquen plano. Histologicamente, as áreas leucoplásicas apresentavam paraqueratose, edema e infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Em 1968, CAWSON & LEHNER, sugerem que a *Candida* pode estar envolvida na etiologia das leucoplasias, baseados no fato de ocorrer regressão das lesões após tratamento antifúngico.

RENSTRUP, (1970), encontrou invasão por *Candida* em 61% das amostras de leucoplasias do tipo não homogêneo e em 3% das lesões do tipo homogêneo. 71% das amostras do tipo não homogêneo apresentavam atipia celular. No estudo realizado por DAFTARY (1972), a incidência de invasão por *Candida* foi semelhante entre os tipos homogêneo e não homogêneo, sendo de 27 e 22 amostras respectivamente.

BAKILANA et al. (1990) estudou a presença de lesões bucais em pacientes com AIDS e encontrou 52 dos pacientes com lesões na cavidade bucal, sendo a candidose atrófica encontrada em 21% dos pacientes, pseudomembranosa em 23% e leucoplasia pilosa em 36% dos pacientes.

Candidose induzida experimentalmente na boca de ratos, embora confinada à camada córnea, está associada à alterações significativas nos tecidos epiteliais e subepiteliais, o que sugere pelo menos um papel co-causativo da infecção por *Candida* em alguns casos de leucoplasia bucal em humanos (JONES & RUSSEL., 1973). ZHANG et al. (1994) induziram alterações epiteliais na mucosa bucal de hamster através da aplicação de DMBA, que variavam de hiperplasia à displasia epitelial com vários graus de severidade, e posteriormente inocularam *C. albicans*. Os autores verificaram que *C. albicans* induziu displasia em

hiperplasia benigna e pode promover transformação maligna nos casos de displasia epitelial.

LIPPERHEIDE et al. (1996) estudaram a prevalência de *Candida* em 35 pacientes com leucoplasia e 34 de líquen plano oral, comparando os valores observados com os encontrados em indivíduos sem doenças na cavidade bucal. Leveduras foram isoladas de 43% dos pacientes, sendo *C. albicans* (sorotipo A) a espécie predominante, estando presente em 76% dos casos de leucoplasia e 88.2% nos casos de líquen plano e 60.8% nos indivíduos sadios. Os autores observaram ainda que *C. albicans* apresentou um alto potencial de adaptação às alterações epiteliais associadas ao desenvolvimento de leucoplasia e líquen plano.

O grau de transformação maligna do líquen plano oral varia de 1 a 4% e a presença de *Candida* nessas lesões é menos freqüente que nas leucoplasias. SILVERMAN & BAHL (1997) encontraram índice de transformação maligna de 3.2% e não observaram associação evidente com infecção por *Candida*.

A freqüência de infecção fúngica em lesões da mucosa bucal foi verificada por BARRET et al. (1998), sendo observada uma associação positiva significativa entre infecção fúngica e displasia epitelial moderada, glossite rombóide mediana e papilomas. Em observação histológica subsequente, 21.9% dos casos de displasia epitelial infectada por *Candida* ocorreu aumento na severidade da alteração

epitelial. Em lesões como hiperqueratose, reações liquenóides e granuloma piogênico, a incidência de *Candida* foi baixa. Queilite angular crônica, com constante presença de *Candida* apresentou progressão para carcinoma epiteliomatoso no estudo relatado por SEOANE et al. (1996).

O câncer bucal é responsável por cerca de 1% das mortes por câncer. A etiologia envolve numerosos fatores, sendo os mais importantes o tabaco e o álcool. A maioria dos casos de câncer bucal resulta da ação de carcinógenos exógenos, sendo que alguns deles agem sinergicamente. *Herpes simplex*, papiloma vírus humano (HPV) e *Candida* já foram implicados na etiologia do câncer bucal (GERSON, 1990), embora o papel de microrganismos, em muitos casos de câncer ainda seja controverso. PEDERSEN et al. (1989) relatam 2 casos de pacientes com carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo no palato mole que provavelmente tenham se desenvolvido em sítio de infecção crônica por *Candida* de longa duração.

PAULA et al. (1990) estudaram a incidência de espécies do gênero *Candida* e outras leveduras na cavidade bucal de indivíduos com carcinoma bucal, antes e durante tratamento com radioterapia. Antes do tratamento, as leveduras foram isoladas da boca de 56% dos pacientes, sendo *C. albicans* a espécie mais freqüente (30%), seguida de *C. tropicalis* (12%) e *C. glabrata* e *C. krusei* (4%). Durante

radioterapia, 72% dos pacientes apresentavam *Candida* na boca, sendo *C. albicans* (36%), *C. tropicalis* (16%), *Rodotorula rubra* (9%), *C. kefyr*, *C. krusei* e *Pichia farinosa* (4%). O sorotipo A constituiu 93% das amostras de *C. albicans* antes do tratamento e 88.8% após a radioterapia. Aumento no número de *Candida* na cavidade bucal após terapia anti-câncer também foi relatado por UMAZUME et al. (1995). Quando as glândulas salivares estão incluídas no campo de radiação, ocorre xerostomia, que leva a um aumento progressivo na colonização da cavidade bucal por *Candida* (RAMIREZ-AMADOR et al., 1997).

NAGY et al. (1998) estudaram a microbiota que forma um biofilme na superfície dos carcinomas de células escamosas da cavidade bucal. Amostras foram obtidas de 21 pacientes. As espécies bacterianas isoladas foram *Veillonella*, *fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Actinomyces* e *Clostridium*. *C. albicans* estava presente em 8 dos 21 tumores.

Vários estudos experimentais buscam esclarecer a influência exercida pela *Candida* e outros fungos no desenvolvimento de lesões potencialmente malignas e malignas da cavidade bucal. A capacidade de algumas espécies de *Candida* e outros fungos em induzir ou intensificar o desenvolvimento de tumores malignos já foi demonstrada por LANCASTER et al., 1961; MANKOWSKI, 1963; BLANK et al., 1968; HISIA et al., 1981; FIELD et al., 1989.

MANKOWSKI (1963) observou que após a injeção de *C. albicans* no báculo de ratos Wistar, ocorreu aumento significativo no número de tumores malignos em vários órgãos. Extratos de *C. parapsilosis* quando injetados subcutaneamente em camundongos por 4 semanas, levaram ao desenvolvimento de sarcomas em 6 dos 16 animais; enquanto que a frequência de linfomas aumentou significativamente em animais inoculados com extratos de *C. albicans* e *Trycophyton sp* (BLANK et al., 1968). YEMMA & BERK (1994) demonstraram que a inoculação intraperitoneal de *C. albicans* leva ao surgimento de lesões tumorais e abscessos em órgãos vitais de rato.

A ação promotora da *C. albicans* na carcinogênese foi demonstrada quando ratos e camundongos recém-nascidos injetados com metilcolantreno, desenvolveram tumores subcutâneos com maior frequência, em períodos mais curtos e de maior diâmetro, quando foram estimulados concomitantemente por injeções de glicoproteínas de *C. albicans* (MANKOWSKI, 1971). Células de fibrossarcoma de camundongo, infectadas por *C. albicans* e injetadas em camundongos singênicos, resultam no desenvolvimento, invasão e ocorrência de metástases mais rápida e frequentemente que nos animais injetados com células de fibrossarcoma não infectadas (GINSBURG et al., 1987).

Alguns biotipos de *C. albicans* estão implicados na etiologia do câncer bucal devido à produção de nitrosaminas endógenas. Em algumas regiões da China é alto o índice de carcinoma de esôfago, provavelmente relacionado com a alta concentração de nitrato e nitrito na água, os quais constituem os precursores do carcinógeno benzilmetilnitrosamina. *C. albicans* é freqüentemente isolada desses indivíduos. HSIA et al. (1981) demonstraram que biotipos de *C. albicans* têm a capacidade de aumentar a produção de benzilmetilnitrosamina, através de seus precursores, sugerindo um papel da *C. albicans* no desenvolvimento de carcinoma de esôfago nesses paciente.

## **5 Carcinoma bucal provocado pelo 4NQO em ratos**

As observações pioneiras de Sir Percival Pott relacionando câncer de escroto em limpadores de chaminé com fuligem, estimularam a verificação da potencialidade de hidrocarbonetos em causar câncer de pele em animais de experimentação. Enquanto os resultados na derme foram positivos, a mucosa bucal mostrou-se resistente a ação destas substâncias. Entretanto quando injetadas na submucosa ou tecido ósseo provocava formação de sarcomas.

Considerou-se que a mucosa era mais resistente que a pele pela ação protetora da saliva, assim como pela ausência de folículos pilosos e glândulas sebáceas. Entretanto, esporádicos casos de carcinoma na boca foram descritos. Em 1925 BONNE observou que camundongos tratados com alcatrão na pele, desenvolviam papilomas na boca e no estômago, visto que ingeriam o carcinógeno devido ao hábito de lambe a pele. Em 1927 BONNE novamente relatou o desenvolvimento de 3 carcinomas de palato entre os 50 camundongos tratados com alcatrão durante um ano. Leucoplasias foram descritas em coelhos tratados por períodos longos com fumaça de cigarro (ROFFO, 1930). Em 1935, OYAMA injetou 16 coelhos na língua com alcatrão; em 2 houve formação de carcinomas. LEVY, em 1948, aplicou metilcolantreno na gengiva de camundongos, entretanto nenhum desenvolveu carcinoma, assim como 20-metilcolantreno e benzopireno aplicados por 6 meses na boca de camundongos, não causaram carcinoma (GOLDHABER, 1957). Portanto, as tentativas de se provocar carcinoma bucal em animais de experimentação não foram bem sucedidas.

O primeiro modelo usado com sucesso foi descrito por SALLEY em 1954, consistindo na aplicação de um hidrocarboneto policíclico aromático - DMBA (dimetilbenzantraceno) a 0.5%, diluído em acetona, na bolsa da bochecha de

hamster. Este modelo ainda é bastante usado, havendo a formação de alterações epiteliais progressivas como hiperplasia epitelial, papiloma, carcinoma *in situ* e carcinoma de células escamosas. Entretanto este modelo é criticado por alguns autores porque a bolsa de hamster tem estrutura diferente da mucosa bucal. Quando o DMBA foi usado na mucosa bucal de hamster e outros animais, não houve desenvolvimento de carcinoma com a mesma frequência. Mais recentemente vários trabalhos descreveram a formação de carcinoma de língua, causado pelo DMBA, na língua de ratos.

4-nitroquinolina-1-óxido, um potente agente carcinogênico, foi sintetizado por OCHIAI et al. (1943). Em 1957 NAKAHARA et al., causaram carcinoma de pele em camundongos pincelados com 4NQO. Quando usado no subcutâneo, intraperitonalmente ou endovenosamente causava vários tipos de cânceres em diferentes tecidos, como pulmão e pâncreas. Em 1965 FUJINO et al., aplicaram 4NQO no lábio de camundongos e descreveram carcinomas no lábio e língua. O modelo experimental com 4NQO tornou-se mais usado, quando em 1973 WALLENIS & LEKHOLM introduziram o uso da nitroquinolina (4NQO), diluída a 0.5% em propilenoglicol na boca de ratos. A nitroquinolina é hidrossolúvel, e quando aplicada no palato de ratos provoca a formação de carcinomas no palato e na língua. Alguns autores continuam a usar 4NQO em

camundongos (STEIDLER & READE, 1984), embora trabalhos em ratos sejam mais comuns. Juntamente com o DMBA na bolsa de hamster, é o modelo mais usado para o estudo da carcinogênese bucal em animais de experimentação.

### 5.1 Método de aplicação do 4NQO

O 4NQO na boca foi inicialmente usado a 0.25% em benzeno no lábio de camundongos (FUJINO et al., 1965). Para o estudo de carcinomas de boca, o 4NQO é geralmente usado a 0.5% em propilenoglicol e aplicado com auxílio de pincel no palato de ratos 3X por semana (WALLENIS & LEKHOLM, 1976). Nesta concentração podem ser aplicados 10µl com micropipeta, correspondendo a 0.05mg ou 255nmol. Há formação de carcinomas do palato e/ou língua depois de 7-11 meses. O 4NQO também pode ser usado na água de beber a 0,001% (KITANO et al., 1992) ou na concentração de 5, 10 e 20 ppm (TANAKA et al., 1986, 1990,1995). Na água de beber, o rato sobrevive cerca de 190 dias. Está bem estabelecido que o carcinoma causado pelo 4NQO é dependente da dose e do período de aplicação.

O período de aplicação do 4NQO, assim como a concentração, modifica a quantidade e o tempo de formação das lesões. 4NQO aplicado durante 12

semanas ou mais, resulta na formação de carcinomas após 8 a 21 semanas depois da cessação de aplicação do carcinógeno. De acordo com SVENSSON & HEIDEN (1982) carcinomas no palato de rato desenvolvem após 30-35 semanas, aplicando-se 4NQO por 12 ou 22 semanas. Tratamento por 1 a 6 semanas prolonga o período para 51 a 80 semanas. WONG & WILSON (1983), aplicaram 4NQO por 4, 8, 12, 16, 20 e 24 semanas, com desenvolvimento de carcinomas em 85% dos animais após 24 semanas. Observações semelhantes foram feitas em camundongos por STEIDLER & READE (1984), verificando que a incidência de carcinomas é proporcional ao período de aplicação do carcinógeno. FISHER (1990) mostrou a correlação entre a frequência de aplicação do 4NQO e o grau de hiperplasia epitelial do palato de ratos. Estudo detalhado da relação entre a quantidade do carcinógeno e o tempo necessário para o desenvolvimento de carcinoma foi feito por FISHER et al., (1987). Grupos de 48 animais receberam 10 µl (255nmol) de 4NQO 18, 12, 6 e 2 vezes. Com 2 aplicações, o primeiro carcinoma ocorreu após 12 meses e atingiu 25% dos animais em 30 meses; com 6X, o primeiro carcinoma ocorreu após 12 meses, estando presente em 50% dos animais em dois anos e com 12 e 18X, ocorreu o primeiro carcinoma depois de 4-5 meses, atingindo 50% dos animais após 12

meses. Estima-se que na água de beber cada rato consome 0.6mg de 4NQO até a formação de carcinoma, em cerca de 1 ano.

## 5.2 Lesões causadas pelo 4NQO

A aplicação no palato ou o consumo na água de beber, causa carcinomas no palato, língua e mandíbula, envolvendo geralmente a gengiva. Antecedendo aos carcinomas há formação de hiperplasias, hiperqueratose, leucoplasias, papilomas, displasia focal acantolítica (DFA), displasias e carcinoma *in situ*. Entretanto ainda não está bem determinado a evolução destas alterações para os carcinomas invasivos. Por exemplo, a DFA não é considerada pré-cancerosa.

## 5.3 Alterações macroscópicas causadas pelo 4NQO no palato

No palato os carcinomas se desenvolvem na região entre os molares, geralmente envolvendo a gengiva palatina. Considera-se que o freqüente envolvimento gengival seja devido a trauma crônico, como impactação de pelos, ração e penetração da droga no sulco gengival. Os carcinomas são bem diferenciados, ricos em queratina, invadindo o tecido ósseo, raramente causando

metástases regionais ou a distância. FISHER et al. (1984) classificou os carcinomas de palato em escamosos e verrucosos, sendo estes últimos mais diferenciados, mais queratinizados e com superfície verrucosa. Antecedendo o carcinoma ocorrem várias alterações epiteliais, mas não está bem determinado quais evoluem para carcinoma. Inicialmente predominam as hiperplasias, seguidas de hiperqueratose, displasias, incluindo displasia focal acantolítica e carcinoma *in situ*.

#### 5.4 Aspecto microscópico das alterações causadas pelo 4NQO

##### Hiperplasia

A hiperplasia epitelial geralmente está associada a hiperqueratose. A camada córnea está mais espessa e a interface epitélio-conjuntivo mais longa e interdigitada. De acordo com KITANO et al. (1992) após 4 semanas, há aumento de metáfases e de células marcadas com BrdU. O aumento de espessura do epitélio é devido principalmente ao compartimento basal. Quando o carcinógeno é aplicado por algumas semanas, carcinomas se desenvolvem depois de 12-18 meses, indicando que alterações irreversíveis ocorrem durante a fase

hiperplásica, mas que ainda não foram caracterizadas. Nesta fase não há marcadores que indiquem quais células sofrerão transformação maligna. Na realidade não há características macro ou microscópicas que possam determinar o potencial maligno de uma lesão epitelial de forma inequívoca, ou seja, células aparentemente normais já podem ter alterações irreversíveis.

### **Hiperqueratose**

Nas regiões de hiperqueratose e displasia verificou-se por histoquímica aumento de lipídios das células epiteliais, e nos carcinomas a diminuição (MATTHEWS et al., 1986, PITIGALA-ARACHCHI et al., 1988).

### **Displasia**

As projeções epiteliais estão mais longas e mais largas, com queratinização de células individuais, acantólise, hipercromatismo e pleomorfismo. RICH & READE (1988) descreveram após 12-16 semanas displasias semelhantes às que ocorrem em humanos, baseando-se nos critérios de SMITH & PINDBORG (1969), o que foi confirmado por NAUTA et al. (1995). As displasias eram freqüentes nas áreas com bolsas gengivais. Através da morfometria nuclear observou-se aumento do volume nuclear nas displasias, com diminuição nas áreas

de carcinoma, com evidências de que variação na forma do núcleo, mas não da área ou volume, podem ser significantes na carcinogênese do palato de ratos (RICH & READE, 1996).

### **Disqueratose Focal Acantolítica**

A DFA é comum principalmente no palato após aplicação de 4NQO (PRIME et al., 1986, PHILIPSEN & FISHER, 1983, NAVARRO et al., 1993). O padrão histológico é semelhante ao que ocorre na Doença de Darier descrito em 1972 por Ackerman na pele de humanos. Caracteriza-se pela presença de fendas suprabasais, contendo células acantolíticas e disqueratóticas eosinófilas. Há associação com hiperqueratose, paraqueratose e hiperplasia da camada basal. De acordo com PRIME et al. (1986) há aumento do número de áreas de DFA no palato e na língua de ratos com o aumento do tempo de exposição ao 4NQO. Segundo NAVARRO et al., 1993, a sialoadenectomia favorece o desenvolvimento de DFA no palato e na língua de ratos. Considera-se que a DFA causada pela 4NQO não evolui para carcinoma.

## Carcinoma

Os carcinomas que se desenvolvem no palato e língua são do tipo escamoso, diferenciados, com células atípicas e grande quantidade de queratina e pérolas de queratina. São mais queratinizados do que os carcinomas bucais em humanos. Dependendo da extensão do processo, há áreas de necrose e acúmulo de células inflamatórias. No palato é comum o envolvimento ósseo, levando às vezes a deformidades faciais. A perfusão sanguínea em carcinomas de palato de ratos mostrou que há diminuição da perfusão da periferia para o centro da lesão, com valores de 5.7ml/min/100g, 15.0 até 32.3 nas áreas mais periféricas.

No palato é freqüente carcinoma com características de carcinoma verrucoso, apresentando hiperplasia epitelial, hiperqueratose, interdigitações papilomatosas profundas, epitélio bem diferenciado com áreas de displasia e membrana basal intacta. Pode ocorrer transformação do carcinoma verrucoso em escamoso (FISKER & PHILIPSEN, 1984). Há indicações de que altas doses de 4NQO favorecem o desenvolvimento de carcinoma verrucoso.

Na língua geralmente são exofíticos, atingindo diâmetro de 20mm e profundidade de 4.5mm. Através da marcação com ouro coloidal, heparan sulfato estava distribuído mais esparsamente na lâmina basal das áreas de

carcinoma em relação aos normais, em ratos tratados com 4-NQO (JIANG et al., 1996).

### 5.5 Carcinoma causado pelo 4NQO

A carcinogênese experimental é dividida em 2 fases: inicial e promotora. Na inicial as alterações celulares são irreversíveis, e as células se comportam como tumorais latentes. A dose inicial de um carcinógeno completo é definida como a maior na qual não causa tumor. A dose iniciadora de 4NQO é considerada por FISHER et al. (1987) de 10µl de 0.5% (255nmol), após 2.5 anos de observação, ou seja uma dose maior provoca carcinoma, sem agente promotor.

Há diferenças de suscetibilidade entre espécies e entre raças de ratos à ação de carcinogênicos químicos e ao 4NQO. Sete raças de ratos foram tratados com 4NQO a 0.001% na água de beber até apresentarem estado geral de caquexia (KITANO et al., 1992). Todos desenvolveram carcinomas de boca e outras partes do trato digestivo. Formaram-se múltiplos carcinomas na língua, gengiva inferior e superior, faringe e em algumas raças na faringe, laringe e traquéia. Poucos casos ocorreram no estômago, e observou-se uma metástase regional e nenhuma a distância. A raça Dark-Agouti apresentou menor sobrevivência,  $171,10 \pm$

30 dias; Sprague-Dawley 186,21 e os de raça Wistar/Furth tiveram maior sobrevida, 238,24 dias (KITANO ET AL., 1992).

Camundongos também são suscetíveis ao 4NQO, desenvolvendo displasias e carcinomas após aplicação de 4NQO de 2 a 16 vezes e observação após 50 semanas. Com 2 aplicações, 20% dos animais tinham displasias epiteliais, com 8, 100% tinham displasias epiteliais e 60% dos animais apresentavam carcinomas e com 16 aplicações, 100% dos camundongos tinham displasias epiteliais e carcinomas (STEIDLER & READE, 1984)

Como já descrito, o 4NQO é efetivo no rato e no camundongo, mas não causou carcinoma quando aplicado na língua de hamster (EVESON & MacDONALD, 1977). Por outro lado, o DMBA usado na boca de ratos causou a formação de carcinomas em 30% dos animais após 16 meses. Após a inibição completa da salivação todos os animais apresentaram carcinoma após 11 meses (WALLENIIUS 1966). O DMBA também é efetivo na pele de rato, mas a pele tornou-se resistente quando transplantada para o interior da boca (WALLENIIUS 1965).

## 5.6 Efeitos da xerostomia na carcinogênese pelo 4NQO

Desde as observações iniciais da maior resistência da mucosa bucal em relação a pele à ação de carcinógenos, considerou-se que a saliva é um fator protetor importante. Animais xerostômicos desenvolvem carcinomas na boca mais facilmente do que os normais, usando-se 4NQO ou DMBA. Também foi observado por WALLENIUS & LEKHOLM (1973) que a aplicação de saliva na pele (orelha) retarda a formação de carcinomas causados pelo 4NQO.

DMBA a 0.05% aplicado na mucosa oral de ratos, causou carcinoma em 30% dos animais, enquanto que nos xerostômicos o índice foi de 100% (WALLENIUS 1965, 1966). Estes dados foram confirmados em ratos sialoadenectomizados, que desenvolveram carcinomas causados por 4NQO mais rapidamente do que animais normais (NAVARRO, 1992).

## **Proposição**

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da xerostomia e da aplicação de 4NQO no desenvolvimento de candidose bucal em rato.

## **Material e Métodos**

## Material e Métodos

### 1 Animais

Foram utilizados 60 ratos machos, Wistar, pesando 200-350g divididos em 4 grupos: normal (norm.); sialoadenectomizado (sialo); normal tratado com 4NQO (norm./nqo) e sialoadenectomizado tratado com 4NQO (sialo./nqo), como mostrado na tabela 1. 40 ratos foram pincelados com 4NQO 3x/semana, em dias alternados, durante 4 meses. Após cada aplicação, os animais eram privados de água por 2h, para que houvesse maior contato do carcinógeno com a mucosa. Os animais foram pesados semanalmente e a boca examinada mensalmente durante os 4 meses de aplicação do 4-NQO e quinzenalmente a partir desse período, para se verificar a presença de lesões clínicas. Os ratos tratados com 4NQO foram sacrificados quando apresentaram clinicamente sinais evidentes de carcinoma na boca.

Tabela 1- Número de ratos normais e sialoadenectomizados, tratados ou não com 4NQO, utilizados no experimento.

Grupos	norm.	norm./nqo	sialo.	sialo./nqo
Nº de animais	10	20	10	20*

\* - 1 rato morreu durante o experimento e foi descartado.

## 2 Sialoadenectomia

A remoção das glândulas salivares maiores parótidas, submandibulares e sublinguais foi realizada, através da técnica cirúrgica descrita por CHEYNE em 1939. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,4 ml/100g de peso corporal de hidrato de cloral a 10% e após tricotomia e antissepsia da região cervical mediana, realizou-se incisão na pele, removendo os tecidos subjacentes, expondo primeiramente as glândulas salivares submandibulares e sublinguais, que foram removidas simultaneamente por formarem uma massa única. A remoção foi realizada após prévia ligadura dos ductos e vasos. As glândulas parótidas estão localizadas na região massetéica, estendendo-se até a altura da clavícula; apresentam-se em forma de Y, com seu maior eixo na direção céfalo-caudal. As glândulas parótidas foram removidas divulsionando-se o tecido com auxílio de uma pinça clínica.

A seguir, a incisão foi suturada e novamente desinfetada com álcool-iodado a 2%. Os animais foram mantidos sob aquecimento durante o período de efeito do anestésico. Os animais foram utilizados no experimento após 15 dias da cirurgia, para o completo reestabelecimento.

### **3 Aplicação do 4NQO**

Nitroquinolina diluída a 0.5% em propilenoglicol foi pincelada no palato dos ratos, não anestesiados, com auxílio de pinça anatômica e pincel n<sup>o</sup> 4, três vezes por semana, em dias alternados. A aplicação foi feita com um único movimento, da região posterior para a anterior do palato. Estima-se que a quantidade do carcinógeno aplicada seja de 14µg (FISKER et al., 1982). Após cada aplicação do carcinógeno, os animais eram privados de água por 2 horas.

### **4 Observações macroscópicas e microscópicas**

Os ratos normais e sialoadenectomizados tratados com 4NQO foram mortos quando da presença de carcinoma na cavidade bucal, determinado no exame clínico. Os ratos que não receberam aplicação de 4NQO foram sacrificados após 6 meses do início do experimento. Durante os exames macroscópicos após o sacrifício dos animais, foi observada a presença de leucoplascias e papilomas, na língua dos ratos, mesmo quando da presença de carcinomas nestes sítios.

Os animais foram mortos por inalação excessiva de éter etílico. A língua, maxila, mandíbula e estômago foram fixados em formol salino a 10% e analisados macroscopicamente em lupa estereoscópica Zeiss e posteriormente fotografados. Para o processamento histológico, a língua foi dividida ao meio no sentido longitudinal e ambas as partes incluídas em parafina. O palato, mandíbula e estômago foram processados apenas para confirmar a presença ou não de carcinoma. Os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes de 5  $\mu$ m, foram corados pela técnica de H&E. As documentações fotográficas dos aspectos macroscópicos foram realizadas em lupa estereoscópica Zeiss e os aspectos histológicos documentados em fotomicroscópio Zeiss.

## **5 Recuperação de *C. albicans* e candidose bucal**

Os ratos que desenvolveram carcinoma na língua foram inoculados com suspensão de *C. albicans*. Posteriormente realizou-se a recuperação da levedura da cavidade bucal desses animais e observou-se o desenvolvimento de candidose em cortes histológico da língua. Os procedimentos empregados serão descritos a seguir.

### 5.1 - Presença de *C. albicans* na boca de ratos

No início do experimento foi verificada a presença de leveduras do gênero *Candida* na boca de todos os animais. Com um *swab* previamente esterilizado coletou-se saliva da cavidade bucal, que a seguir foi semeada em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose adicionado de 0,1ml de cloranfenicol 0,1 mg/ml de meio (Quemacetina Succinato, Carlo Erba). Após incubação por 48 horas a 37 °C, verificou-se o crescimento de colônias características de *Candida*. Nos ratos sialoadenectomizados, esse procedimento foi repetido 2 semanas após a cirurgia. Nenhum animal apresentou-se portador.

### 5.2 - Suspensão de *C. albicans*

*C. albicans* F72, proveniente do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, isolada de paciente portador de candidose por prótese total, foi semeada em ágar Sabouraud Dextrose de modo a se obter um crescimento maciço e incubada por 48 horas a 37°C. O crescimento foi transferido para tubo de ensaio, suspenso em 5 ml de solução fisiológica esterilizada e centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos e o

sobrenadante desprezado. As células de *Candida* foram lavadas mais uma vez e o precipitado suspenso em solução fisiológica de modo que a suspensão final apresentasse a concentração de  $5 \times 10^8$  células viáveis de *C. albicans*/ml. O número de células de *C. albicans* viáveis na suspensão foi determinado mediante contagem em câmara de Neubauer, após coloração prévia com azul de metileno a 0,05%.

### 5.3- Inoculação de *C. albicans*

Nos ratos normais e sialoadenectomizados tratados com 4NQO e que desenvolveram carcinoma na língua receberam inoculação única de *C. albicans*. O volume de 0,2ml de suspensão contendo  $5 \times 10^8$  células/ml, foi inoculado 24 e 48h antes do sacrifício dos ratos com carcinoma na língua. Nos ratos normais e sialoadenectomizados não tratados com 4NQO a inoculação foi realizada após 6 meses do início do experimento. Os animais que desenvolveram carcinoma em outros locais da boca não foram inoculados com *Candida*.

A suspensão foi inoculada na cavidade bucal dos ratos não anestesiados, com auxílio de uma seringa de 1 ml e espalhada principalmente sobre a língua, com um *swab* previamente esterilizado e embebido na suspensão de *Candida*, para

que não houvesse alteração no número de leveduras inoculadas, o que ocorreria se o algodão do swab estivesse seco. Após cada inoculação os animais eram privados de água por 1 hora.

#### 5.4 - Recuperação de *C. albicans*

A recuperação de *Candida* da cavidade bucal dos animais consistiu na determinação do número de leveduras presentes na boca dos ratos nos períodos de tempo determinados, 24 e 48h após a inoculação. O número de colônias de *Candida* foi obtido a partir da semeadura de amostras de saliva em ágar Sabouraud Dextrose.

Apenas os animais normais e sialoadenectomizados tratados com 4NQO que desenvolveram carcinoma na língua foram inoculados com a suspensão de *Candida*, seguindo-se o procedimento descrito no item 5.3.

A saliva foi coletada com uma “bolinha de algodão” previamente esterilizada e pesada, que foi mantida na boca dos ratos, não anestesiados, durante 5 minutos, com auxílio de uma pinça hemostática. A seguir, o algodão foi novamente pesado, determinando-se assim o volume de saliva coletado. O algodão foi transferido para um tubo de ensaio e o volume completado para 2 ml

com solução fisiológica esterilizada. Após homogeneização por 2 minutos, foram feitas diluições decimais até  $10^{-3}$ , das quais alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (Quemíctina Succinato, Carlo Erba). As placas semeadas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. A contagem das colônias características de *Candida* foi realizada nas placas que apresentavam entre 30 e 300 colônias e o número de ufc/ml de *Candida* presente na cavidade bucal dos ratos determinado a partir da quantidade de saliva e do número de colônias obtido na melhor diluição.

### 5.5- Candidose

A presença de candidose na língua dos animais foi observada 24 e 48h após a inoculação da suspensão de *Candida*. Candidose foi caracterizada pela presença de pseudohifas de *C. albicans* no interior do epitélio da língua. Candidose foi verificada em 2 cortes cortes histológicos da língua, obtendo-se a média por animal. Os cortes foram corados pela técnica de PAS-hematoxilina. Para cada área de candidose encontrada, foram contados o número de papilas envolvidas. Em cada grupo foi considerado também o número de animais positivos. A extensão da candidose foi determinada considerando-se o número de papilas

linguais envolvidas. Dependendo da quantidade de hifa, cada área de candidose foi classificada em leve (+) quando apresentava poucas hifas no interior da queratina; moderada (++), quando tinha quantidade moderada e intensa (+++) quando a candidose era formada por abundantes hifas de *C. albicans* no interior da camada de queratina do epitélio.

## **Resultados**

**Candidose em carcinomas de língua causados pelo 4NQO**

## Resultados

### 1 Animais

#### 1.1 Peso corporal

Na tabela 1 encontram-se os pesos corporais (em gramas) dos animais dos grupos normal; sialo; normal/nqo e sialo/nqo no início e término do experimento. Os ratos dos grupos normal e sialo, que não receberam tratamento com 4NQO, apresentaram aumento de peso durante todo o período de observação, que foi de 6 meses. Quando do sacrifício dos 20 animais do grupo normal./nqo, 40% tinham peso menor em relação ao inicial, enquanto que dos 19 do grupo sialo/nqo, isto ocorreu em 78.94%. Para todos os ratos dos grupos normal/nqo e sialo/nqo que tiveram aumento de peso, os valores foram inferiores em relação aos que não receberam tratamento com 4-NQO. Os valores se refletiram nas médias dos 2 grupos. No normal/nqo as médias inicial e final foram semelhantes, enquanto que nos sialo/nqo houve diminuição estatisticamente significativa.

**Tabela 1** - Peso corporal dos ratos normais e sialoadenectomizados tratados ou não com 4NQO, no início (I) e fim (F) do experimento.

Rato	normal		sialo		normal/nqo*		sialo/nqo*	
	peso		peso		peso		peso	
	I	F	I	F	I	F	I	F
1	323	404	304	415	275	167	315	319
2	323	400	315	387	286	291	240	174
3	356	451	323	420	346	265	340	248
4	343	435	311	389	218	346	397	391
5	305	396	309	400	324	268	346	178
6	360	474	373	450	400	440	360	254
7	281	372	346	460	263	200	238	351
8	357	538	346	460	277	232	386	269
9	278	390	295	349	350	361	246	245
10	288	400	295	388	332	370	393	288
11	-	-	-	-	348	405	277	184
12	-	-	-	-	367	528	253	385
13	-	-	-	-	262	258	354	254
14	-	-	-	-	280	244	315	304
15	-	-	-	-	355	381	420	265
16	-	-	-	-	276	355	315	285
17	-	-	-	-	388	456	230	374
18	-	-	-	-	279	222	376	199
19	-	-	-	-	320	322	364	364
20	-	-	-	-	330	222	-	-
<b>Média</b>	<b>321.4</b>	<b>426.0</b>	<b>321.7</b>	<b>411.8</b>	<b>313.8</b>	<b>316.6</b>	<b>332.0</b>	<b>279.1**</b>
<b>DP</b>	<b>±32.19</b>	<b>±50.0</b>	<b>±25.54</b>	<b>±36.46</b>	<b>±47.88</b>	<b>±95.67</b>	<b>±59.12</b>	<b>±68.09</b>

\* - Os animais tratados com 4NQO foram numerados em ordem crescente, de acordo com o período de desenvolvimento dos carcinomas.

\*\* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao peso inicial dos animais do mesmo grupo em 5% pelo teste "t" de Student.

## 2 Carcinoma de boca

Os ratos dos grupos normal e sialo não apresentaram alterações macroscópicas na boca. O tempo necessário para o desenvolvimento dos carcinomas e a localização das lesões na cavidade bucal, de cada rato dos grupos normal/nqo e sialo/nqo estão demonstrados na tabela 2. Dos 20 ratos normal/nqo 10 desenvolveram carcinoma na língua; 2 na língua e palato duro; 2 na língua e mandíbula; 4 no palato duro e 2 na mandíbula. Dos 19 sialo/nqo, 12 desenvolveram carcinoma na língua; 2 na língua e mandíbula; 2 no palato duro; 2 na mandíbula e 1 no palato mole (Tab. 3).

A língua apresentou carcinoma num total de 14 ratos normal/nqo (70%) e 14 sialo/nqo (73.6%); no palato duro ocorreram carcinomas em 6 (30%) e 2 (10.5%) ratos; na mandíbula em 4 (20%) e 4 (21%) ratos normal/nqo e sialo/nqo respectivamente e no palato mole em 1 (5.3%) sialo/nqo (Tab.3). Nos ratos normal/nqo o menor período para o desenvolvimento de carcinoma foi observado naqueles que desenvolveram na mandíbula. Nos sialo/nqo, o rato que desenvolveu carcinoma no palato mole apresentou o menor período de desenvolvimento de carcinoma e o mais longo foi no palato duro.

**Tabela 2** - Período (dias) de desenvolvimento dos carcinomas e localização das lesões na cavidade bucal de ratos normal/nqo e sialo/nqo. (L= língua, PD= palato duro, M= mandíbula, PM= palato mole).

Rato	Normal/nqo		sialo/nqo	
	Período	Localização	Período	Localização
1	251	M	224	M
2	263	PD	243	L
3	277	L	248	L
4	277	L	251	L
5	277	L	255	L/M
6	306	L	263	L
7	309	M	263	PM
8	311	L/M	270	L
9	311	L	270	L
10	338	L/PD	291	PD
11	354	L/M	293	L
12	363	L	293	L
13	363	L	305	L
14	363	PD	306	L/M
15	364	PD	306	L
16	377	L/PD	308	L
17	385	L	309	L
18	385	L	338	PD
19	385	PD	345	M
20	437	L	-	.*
<b>Média</b>	<b>334.7±50.4</b>		<b>283.2±32.7**</b>	

\* - O rato 20 do grupo sialo/nqo morreu antes do final do experimento e foi excluído.

\*\* - Estatisticamente significante em 5% pelo teste "t" de Student em relação ao norm./nqo

**Tabela 3** - Número de animais normais e sialoadenectomizados divididos de acordo com a localização dos carcinomas na cavidade bucal e média e desvio padrão do período para o desenvolvimento dos carcinomas nesses animais.

Localização	normal/nqo		sialo/nqo	
	nº de carcinoma	período (dias)	nº de carcinoma	Período (dias)
Língua	10	338.1±56.16	12	279.9±25.20
Língua/palato duro	2	357.5±27.57	0	-
Língua/mandíbula	2	332.5±30.41	2	280.5±36.06
Palato duro	4	343.7±54.78	2	314.5±33.23
Mandíbula	2	280.0±41.01	2	284.5±85.55
Palato mole	0	-	1	263.0
<b>Média</b>	<b>20</b>	<b>330.4±29.64</b>	<b>19</b>	<b>284.5±18.7**</b>

\*\* Estatisticamente significativa em 5% pelo teste "t de Student em relação ao norm/nqo.

### 1.3 Observações macroscópicas

Na língua, os carcinomas desenvolveram-se principalmente na região do tubérculo intermolar; em 12 ratos normal/nqo e 13 sialo/nqo. Em 1 rato normal/nqo e 1 sialo/nqo a lesão estava localizada principalmente na região faríngea da língua; enquanto que no outro rato normal/nqo, o carcinoma ocorreu na parte anterior da língua.

Os carcinomas de língua apresentavam basicamente 2 aspectos. O mais freqüente era a presença de nódulo com crescimento exofítico e endofítico,

delimitado por bordas elevadas e esbranquiçadas, podendo a superfície estar ou não ulcerada e necrosada. O segundo aspecto mais freqüente foi de uma lesão de crescimento exofítico, sem limite nítidos de suas bordas, com superfície ulcerada e necrosada, atingindo o tubérculo intermolar e a região faríngea da língua . Tanto no palato duro quanto na mandíbula, os carcinomas tinham início ao redor dos dentes molares, na forma de ulcerações delimitadas por bordas elevadas e esbranquiçadas, que avançavam para as faces palatina e lingual ou vestibular dos dentes. Na maioria dos casos, os carcinomas foram unilaterais e causaram mobilidade dental.

Nos ratos que foram mortos por apresentarem carcinoma apenas no palato ou mandíbula, a superfície dorsal da língua apresentava aspecto irregular, devido à presença de áreas de atrofia das papilas linguais, leucoplasias, papilomas e ulcerações. As áreas de atrofia das papilas linguais consistiam de regiões nas quais a superfície dorsal da língua apresentava-se lisa, avermelhada e brilhante. As leucoplasias apareceram clinicamente como regiões irregulares com superfície esbranquiçada e levemente opaca. Os papilomas apresentavam-se como crescimento epitelial exofítico em forma de dedos de luva, com diâmetro de cerca de 3-4 mm. As ulcerações mediam cerca de 4 mm, com forma arredondada e contendo material necrosado.

No palato, quando os carcinomas estavam ausentes observou-se retração gengival, perda de definição das rugosidades palatinas, espessamento (hiperplasia) e aparência irregular da região intermolar, além da presença de papilomas.

#### 1.4 Observações microscópicas

Microscopicamente, os carcinomas eram bem diferenciados, com grande quantidade de queratina. Nos carcinomas de língua, as lesões invadiam o conjuntivo subjacente com células neoplásicas nos tecidos mais profundos, como músculos, nervos e glândulas salivares. A superfície das regiões centrais dos carcinomas apresentava-se com áreas de ulceração, necrose e acúmulo de bactérias. As bordas dos carcinomas eram elevadas, com intensa hiperqueratose e hiperplasia, com células mostrando intensa displasia, caracterizando muitas vezes carcinoma com pequena invasão do tecido conjuntivo subjacente. Nas línguas com carcinoma também observou-se áreas com hiperqueratose, com a superfície plana ou hiperqueratose acompanhando a forma das papilas.

Nos animais dos grupos norm./nqo e sialo/nqo que não apresentavam carcinoma de língua, confirmou-se microscopicamente a presença de leucoplasias

e papilomas. As leucoplasias apresentavam-se como áreas de acantose e hiperqueratose, mas também observou-se áreas de disqueratose focal acantolítica, papilomas, displasias e carcinoma *in situ*. A hiperqueratose na superfície da língua dos ratos ocorreu em dois padrões distintos: Hiperqueratose e hiperplasia das papilas linguais, nas quais o aumento da camada de queratina acompanhava a forma das papilas, dando um aspecto papilomatoso à superfície epitelial. O segundo padrão observado foi menos freqüente e caracterizou-se por áreas de hiperqueratose e acantose, com aplainamento das papilas linguais. No primeiro caso era possível distinguir as queratinas dura e mole que compõem as papilas, enquanto que no segundo, a queratina tinha aspecto mais homogêneo e ligeiramente basófila, possivelmente mistura dos dois tipos. Os dois padrões de hiperqueratose também foram observados nas bordas dos carcinomas de língua.

## 2 Recuperação de *Candida* e Candidose

Os 14 ratos normal/nqo e 14 sialo/nqo que desenvolveram carcinoma de língua foram inoculados com 0,2ml de  $5 \times 10^8$  células/ml de suspensão de *C. albicans*. A levedura foi recuperada da cavidade bucal de 7 ratos norm./nqo e 7

sialo/nqo 24 e 48h após a inoculação. Como controle foram usados 5 ratos normais e 5 sialoadenectomizados para cada período.

## 2.1 Recuperação de *Candida*

Os resultados da recuperação de *Candida* estão demonstrados na tabela 4. Em ambos os períodos, os ratos sialo e sialo/nqo, apresentaram número de ufc/ml de *Candida* maior que os ratos normais. No período de 24 para 48h, nos ratos do grupo normal, houve diminuição de 54 vezes e nos sialo de 15 vezes no número de ufc/ml de *Candida*.

Após 24h, os ratos com carcinoma de língua, normal/nqo e sialo/nqo apresentaram número de ufc/ml de *Candida* de  $0.62 \pm 0.69$  e  $6.74 \pm 0.98$  e após 48h, os valores subiram para  $1.68 \pm 2.00$  e  $31.45 \pm 8.21$  respectivamente. Portanto, o tratamento com 4NQO diminuiu o número de ufc/ml recuperado no período de 24h, mas aumentou no de 48h.

**Tabela 4** - Média e desvio padrão do número de ufc/ml ( $\times 10^4$ ) de *C. albicans* recuperado da cavidade bucal de ratos normal/nqo e sialo/nqo, com carcinoma de língua, 24 e 48h após inoculação única da levedura.

Grupos Período	normal	normal/nqo	sialo	sialo/nqo
24h	4.90±3.80	0.62±0.69	15.50±15.60	6.74±0.98
48h	0.09±0.07	1.68±2.00	1.00±1.45	31.45±8.21*

\* Estatisticamente significativa em 5% em relação ao controle do mesmo grupo pelo teste "t" de Student.

## 2.2 Candidose

Nenhum dos animais do grupo normal apresentou áreas de candidose. Dos 5 sialo, 2 apresentaram candidose após 48h, sendo 3 áreas na porção anterior da língua e 2 no tubérculo intermolar. As áreas atingiam 9 papilas na porção anterior da língua e 2 no tubérculo intermolar, na região das papilas verdadeiras (Tab. 5). As hifas de *Candida* estavam localizadas na queratina, perpendicularmente à superfície do epitélio. Não foram observadas alterações evidentes nas camadas basal e espinhosa do epitélio ou a presença de microabscessos.

Dos 7 animais do grupo normal/nqo, no período de 24h, 5 apresentaram um total de 7 áreas de candidose no tubérculo intermolar, nas papilas verdadeiras. Após 48h, 7 ratos apresentaram 5 áreas na porção anterior, região das papilas

cônicas e 19 no tubérculo intermolar. Os 7 ratos sialo/nqo com carcinoma no período de 24h apresentaram 22 áreas de candidose, sendo 5 na porção anterior da língua e 17 no tubérculo intermolar. No Período de 48h foram observadas 22 áreas, 4 na porção anterior e 18 no tubérculo intermolar (Tab. 5). As papilas gigantes, localizadas no tubérculo intermolar, também apresentaram candidose, entretanto na maioria dos casos foi observada nas papilas verdadeiras.

**Tabela 5** - Número de áreas de candidose na língua de ratos normal; sialo; normal/nqo e sialo/nqo. Após uma inoculação intraoral de *C. albicans*, os animais foram sacrificados após 24 e 48h. Os valores entre parênteses correspondem à extensão das áreas de candidose em número de papilas envolvidas.

Grupo	normal		normal/nqo		Sialo		sialo/nqo	
	PCS	TI	PCS	TI	PCS	TI	PCS	TI
24h	-	-	-	7(37)	-	-	5(41)	17(26)
48h	-	-	5(30)	19(92)	3(9)	2(2)	4(63)	18(30)

PCS = papilas cônicas simples, nos 2/3 anteriores da língua

TI = tubérculo intermolar, papilas verdadeiras e gigantes no 1/3 posterior da língua.

A tabela 5.1 resume os dados da tabela 5. Nos ratos normal/nqo, observa-se um aumento significativo no número de áreas de candidose e papilas envolvidas, do período de 24 para o de 48h, enquanto que nos sialo/nqo, os valores foram semelhantes nos dois períodos. Também foi semelhante o número

total de áreas de candidose e de papilas, quando comparado os grupos normal/nqo e sialo/nqo.

**Tabela 5.1** - Número de áreas de candidose e papilas envolvidas, nos períodos de 24 e 48h após a inoculação de *Candida*, no dorso da língua de ratos normais e sialoadenectomizados, tratados ou não com 4-NQO.

Período (h)	normal	normal/nqo	sialo	sialo/nqo
24	-	7(37)	-	22(67)
48	-	24(122)	5(11)	22(93)
<b>Total</b>	-	<b>31(159)</b>	<b>5(11)</b>	<b>44(160)</b>

A tabela 6 mostra a localização das candidoses, considerando-se a presença das hifas na queratina em áreas de hiperqueratose e em regiões de carcinoma plenamente desenvolvidos. A presença de candidose predominou nas áreas de hiperqueratose. A presença de hifas de *Candida* no interior dos carcinomas foi pouco frequente, mesmo naqueles com abundante produção de queratina, tendo sido observada nos períodos de 24 e 48h, apenas nos ratos sialoadenectomizados.

**Tabela 6** - Candidose na língua de ratos portadores de carcinoma bucal. A localização da candidose foi considerada como sendo em áreas de hiperqueratose (H) ou em carcinoma francamente desenvolvido (C). A candidose foi avaliada em 28 ratos, 14 normal/nqo e 14 sialo/nqo, sendo 7 animais para cada período de 24 e 48 horas.

Rato	normal/nqo				sialo/nqo							
	24h		48h		24h		48h					
	PCS	TI	PCS	TI	PCS	TI	PCS	TI				
	H	C	H	C	H	C	H	C				
1	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	5	0
2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
3	0	0	0	0	1	0	5	0	1	0	3	1
4	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	2	1
5	0	0	2	0	1	0	5	0	0	0	3	0
6	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	3	0
7	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	1	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>2</b>

A tabela 6.1 mostra os dados da tabela 6, considerando-se em conjunto os resultados dos animais normal/nqo e sialo/nqo nos períodos de 24 e 48h. A incidência de candidose foi cerca de 18 vezes maior nas áreas de hiperqueratose em relação às áreas de carcinoma.

**Tabela 6.1-** Número de áreas de candidose em áreas de hiperqueratose e de carcinoma no dorso da língua de ratos norm./nqo e sialo/nqo, 24 e 48h após a inoculação de *C. albicans*.

Grupo	normal/nqo		sialo/nqo		Total
	24h	48h	24h	48h	
Hiperqueratose	7	24	20	20	71
Carcinoma	0	0	2	2	4
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>75</b>

Dos animais não tratados com 4NQO (normal e sialo), 10% apresentaram candidose, num total de 5 áreas e média de 0.25 áreas por animal. 26 (92.8%) dos ratos com carcinoma (normal/nqo e sialo/nqo) apresentaram áreas de candidose, com média de 2.68 áreas por animal. As candidoses dos animais com carcinoma bucal ocorreram, como já descrito, principalmente em áreas de hiperqueratose, e foram mais extensas do que nos ratos sem carcinoma (Tab. 7).

**Tabela 7** - Número (%) de ratos normais e sialoadenectomizados com candidose, número total de áreas de candidose e média de áreas se candidose/animal.

Grupos	Nº de ratos	Ratos com candidose	Áreas de candidose	Média de candidose/rato
norm. e sialo	20	2 (10%)	5	0.25
normal/nqo e sialo/nqo	28	26 (92.8%)	75	2.68

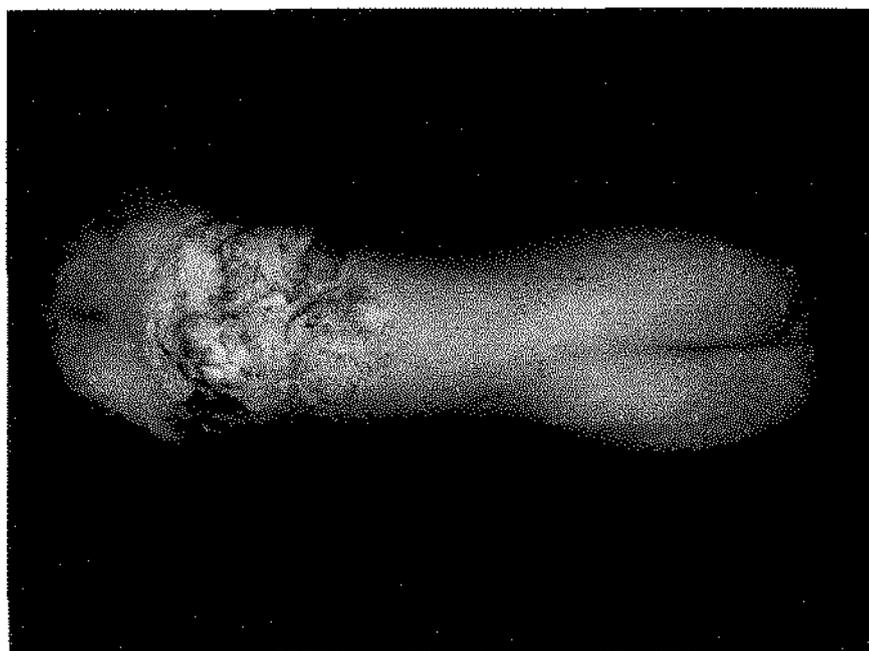
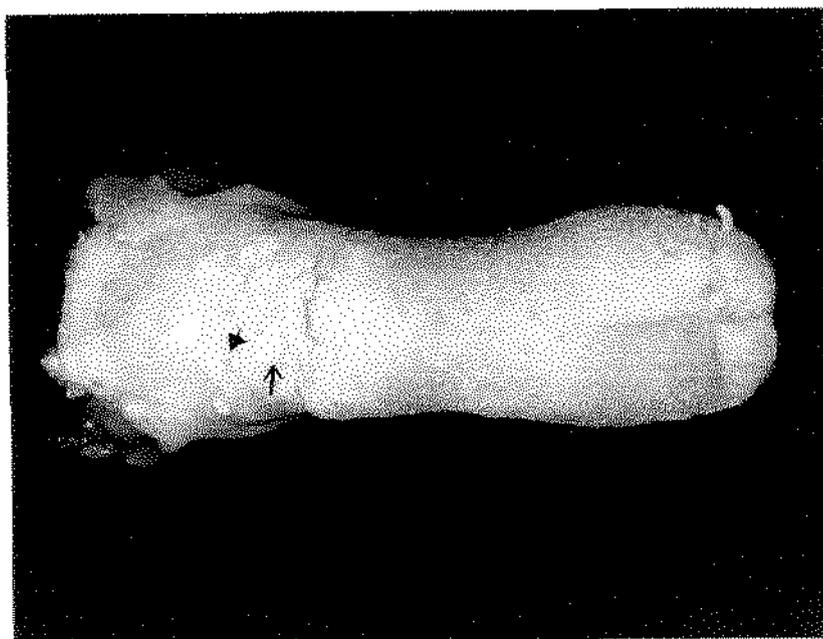
As áreas de candidose foram classificadas, subjetivamente, de acordo com o número de hifas no interior da queratina, dando-se os valores de (+) para as candidoses leves, ou seja, presença de poucas hifas; (++) para as candidoses com moderada quantidade de hifas e (+++) para as áreas com intensa infiltração de hifas. Nessas áreas considerou-se também a presença de microabscessos intraepiteliais. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 9. Tanto no grupo normal/nqo quanto no sialo/nqo, predominou as áreas de candidose leve (+). Os microabscessos foram mais freqüentes nos períodos de 48h. Nos ratos normal/nqo, no período de 24h, observou-se 5 áreas leves e 2 moderadas. Das

24 áreas de candidose do período de 48h, 16 eram leves, 3 moderadas e 5 intensas e 7 apresentavam microabscessos intraepiteliais. No grupo sialo/nqo, das 22 áreas do período de 24h, 12 eram leves, 7 moderadas e 2 intensa; sendo que apenas 3 áreas apresentavam microabscessos. No período de 48h, das 22 áreas, 12 eram leves, 7 moderadas e 4 intensas e 13 apresentavam microabscessos intraepiteliais (Tab.8). Portanto no grupo normal/nqo candidose predominou no período de 48h, enquanto que no grupo sialo/nqo a incidência foi semelhante nos dois períodos. A maioria dos microabscessos ocorreu, nos dois grupos, após 48h, embora no grupo sialo/nqo a incidência tenha sido maior.

**Tabela 8** - Classificação das áreas de candidose de acordo com o número de hifas: leve (+), moderada (++) e intensa (+++) e número de áreas de candidose com microabscessos.

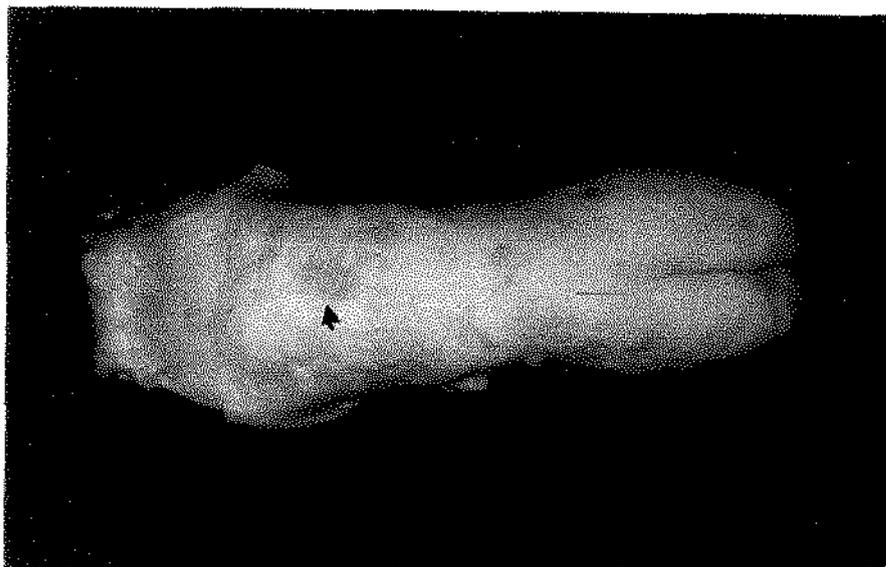
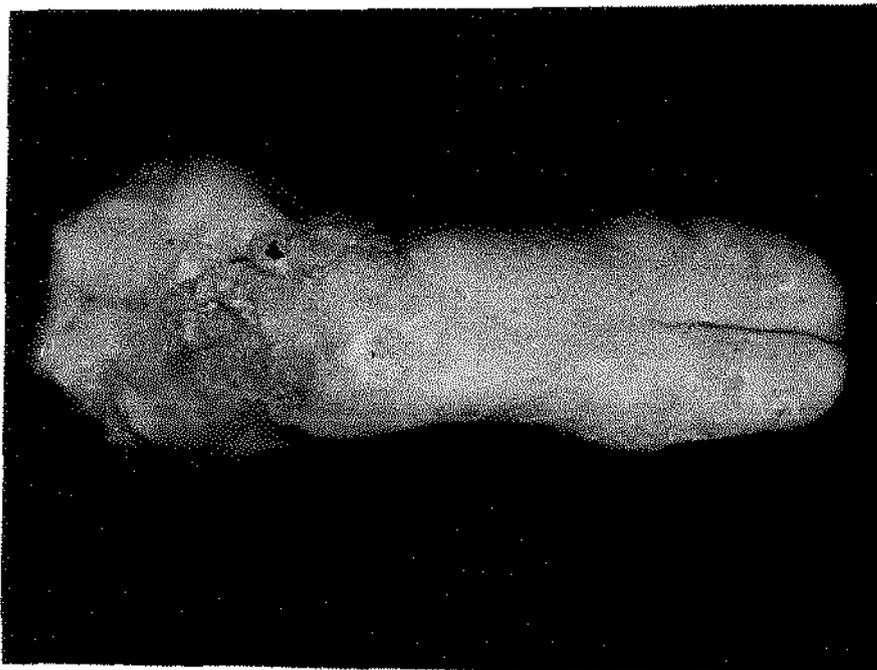
Candidose	normal/nqo			sialo/nqo		
	24h	48h	Total	24h	48h	Total
Leve (+)	5	16	21	12	12	24
Moderada (++)	2	3	5	7	7	14
Intensa (+++)	0	5	5	2	4	6
Áreas com microabscessos	0	7	7	3	13	26
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>31</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>44</b>

**Figuras**



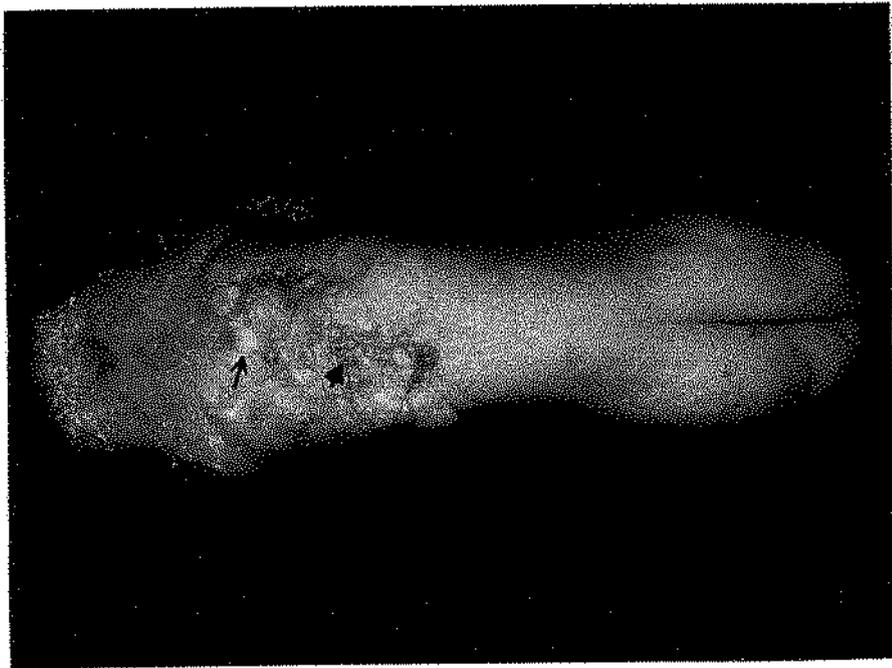
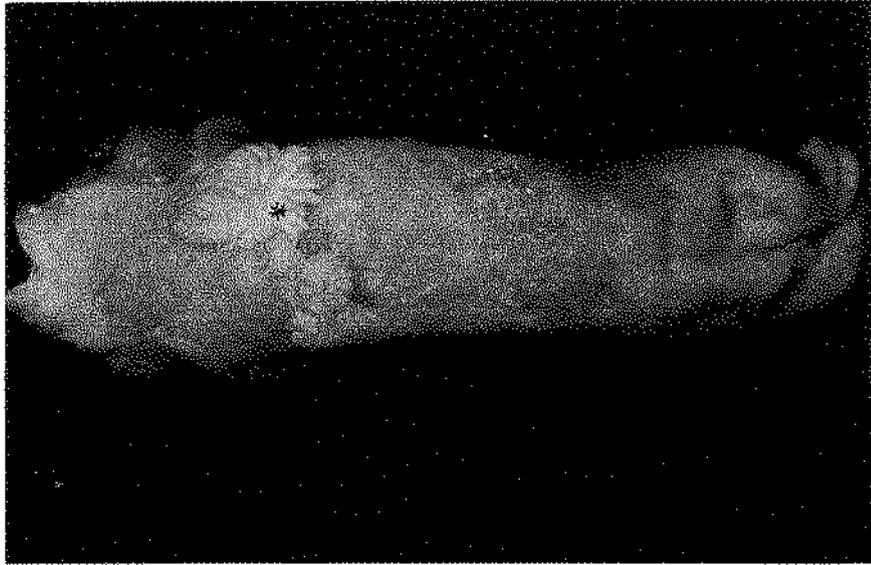
**Fig. 1** - Aspecto clínico da língua de rato do grupo norm./nqo que desenvolveu carcinoma de palato. A superfície do tubérculo intermolar apresenta-se irregular, com áreas leucoplásicas (seta) e áreas com atrofia das papilas linguais (cabeça de seta) (3X).

**Fig. 2** - Superfície da língua de rato norm./nqo que desenvolveu carcinoma no palato. Observa-se na região do tubérculo intermolar a presença de áreas leucoplásicas (seta), atróficas e projeções epiteliais papilomatosas (asterisco) (3X).



**Fig. 3** - Aspecto clínico da língua de rato do grupo sialo/nqo que desenvolveu carcinoma no palato. A superfície está hiperplásica, com áreas leucoplásicas e presença de um papiloma (asterisco) (3X).

**Fig. 4** - Língua de rato do grupo sialo/nqo, que desenvolveu carcinoma de mandíbula. A superfície do tubérculo intermolar apresenta-se irregular, com uma área de atrofia das papilas na região central (cabeça de seta) (3X).

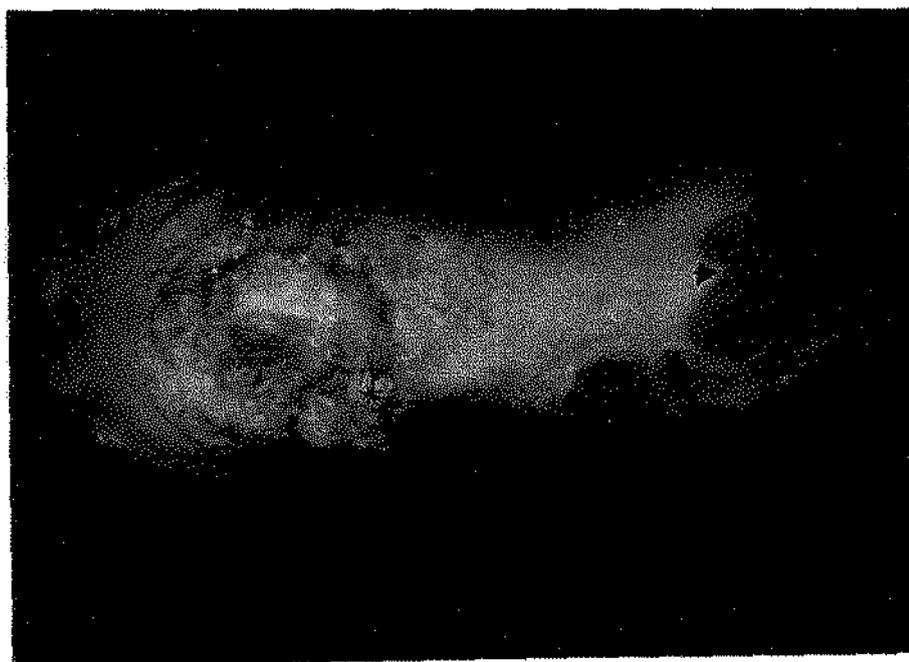


**Fig. 5** - Língua de rato do grupo norm./nqo que desenvolveu carcinoma na mandíbula. Presença de papilomas (asterisco) na região do tubérculo intermolar (3X).

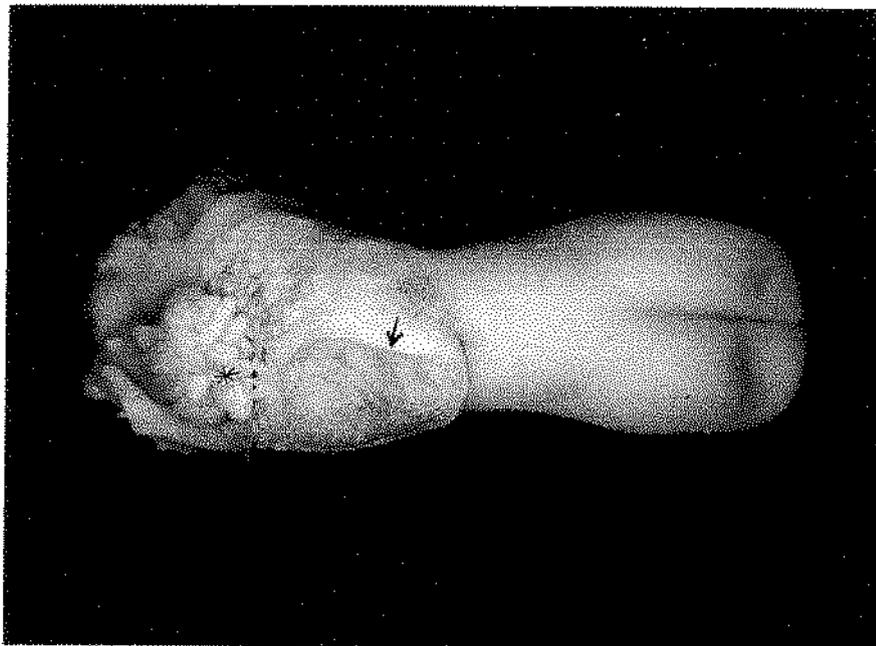
**Fig. 6** - Língua de rato sialo/nqo que desenvolveu carcinoma no palato mole. A região do tubérculo intermolar apresenta áreas de leucoplasia (seta) e atrofia das papilas linguais (cabeça de seta) (3X).



**Fig. 7** - Carcinoma de língua de rato do grupo sialo/nqo, apresentando-se como um nódulo, localizado na região faríngea da língua (seta). O tubérculo intermolar apresenta-se hiperplásico e com áreas de atrofia das papilas linguais (3X).

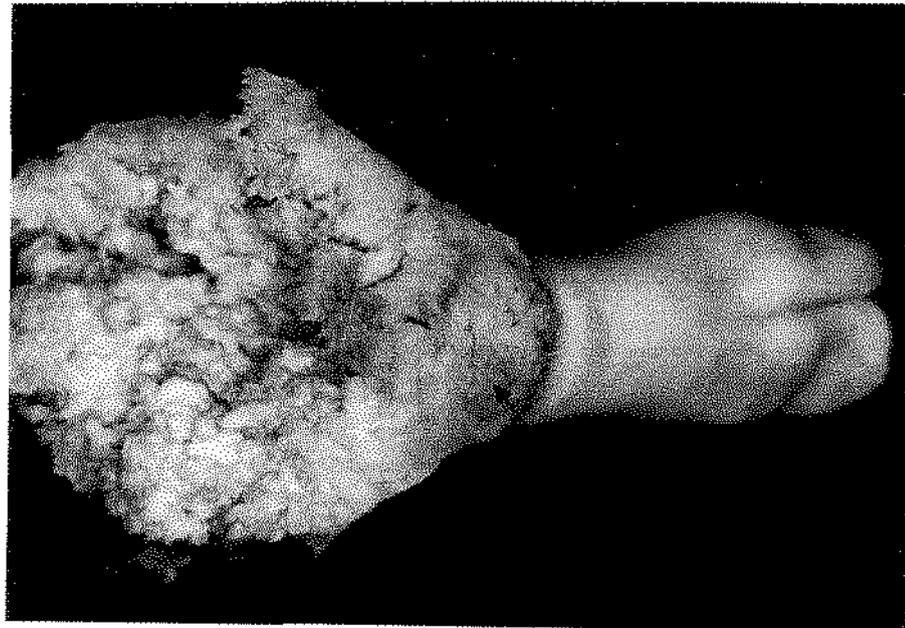
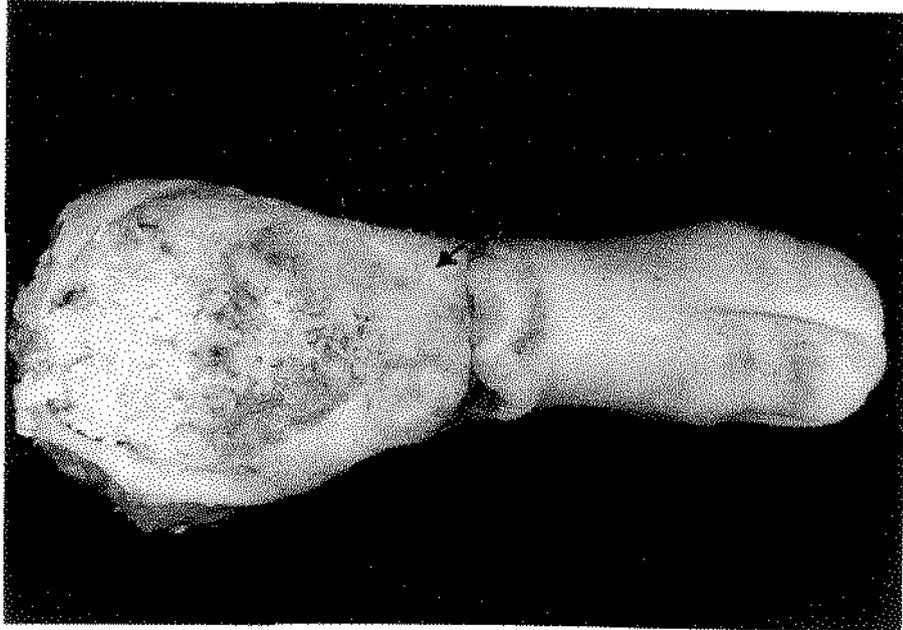


**Fig. 8** - Língua de rato sialo/nqo com lesão nodular, delimitada e de superfície ulcerada (seta) e um papiloma (asterisco) no tubérculo intermolar. A ponta da língua apresenta extensa ulceração (cabeça de seta). Para ambas as lesões, o diagnóstico de carcinoma foi confirmado histologicamente (3X).



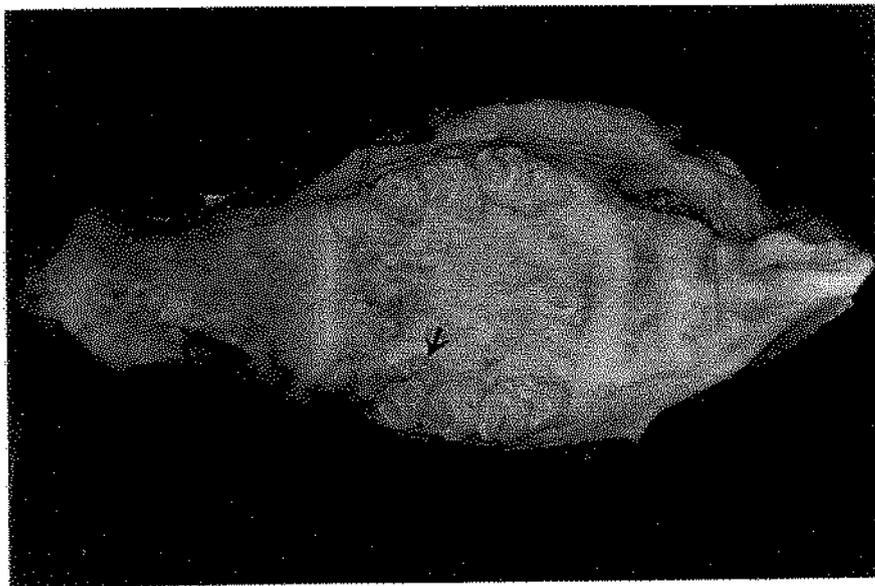
**Fig. 9** - Carcinoma de língua de rato norm./nqo localizado no tubérculo intermolar (seta). A lesão apresenta-se como nódulo de crescimento exofítico, delimitado por bordas elevadas e esbranquiçadas e superfície lisa. Presença de papiloma (asterisco), medindo cerca de 4mm, localizado na região entre o tubérculo intermolar e a região faríngea da língua (3X).

**Fig. 10** - Carcinoma de língua de rato norm./nqo, tomando todo o tubérculo intermolar, com superfície ulcerada (seta) (3X).



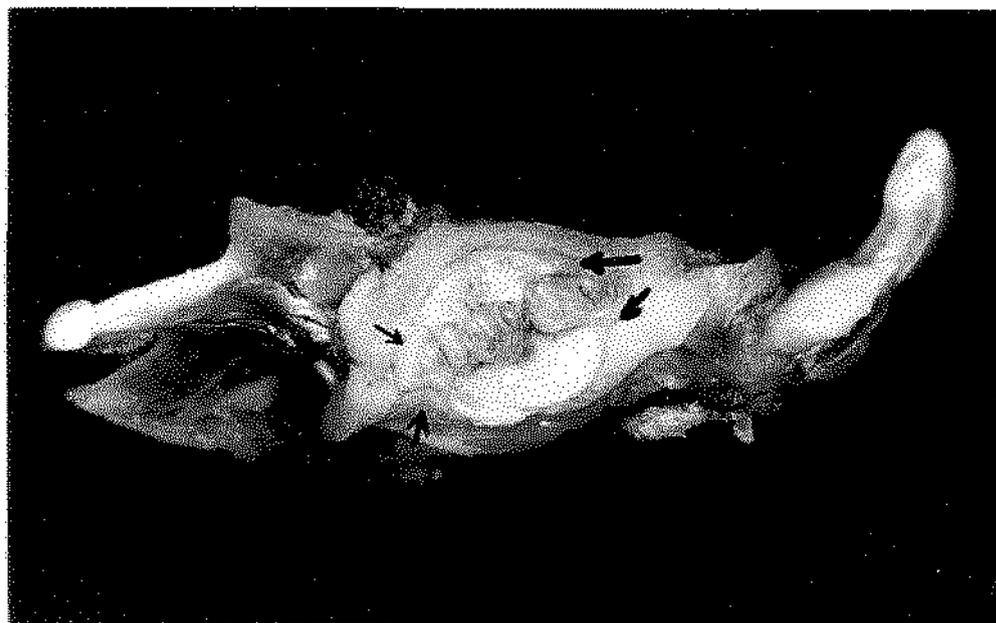
**Fig. 11** - Carcinoma de língua de rato sialo/nqo, apresentando crescimento exofítico, tomando todo o tubérculo intermolar (seta). A lesão é delimitada e apresenta superfície ulcerada e necrosada (3X).

**Fig. 12** - Carcinoma de língua de rato sialo/nqo (seta). Lesão exofítica tomando todo o tubérculo intermolar e região faríngea da língua, apresentando superfície irregular, com tecido necrótico(3X).



**Fig. 13** - Aspecto macroscópico do palato de rato norm./nqo que desenvolveu carcinoma na língua. Observa-se espessamento ao redor dos molares (seta), perda das rugosidades palatinas e um papiloma (asterisco) (3X)

**Fig. 14** - Aspecto macroscópico do palato de rato do grupo sialo/nqo que desenvolveu carcinoma na língua. A superfície intermolar apresenta-se espessa, com retração gengival acentuada (seta) (3X)



**Fig. 15** - Carcinoma de palato de rato sialo/nqo (seta). Lesão localizada do lado esquerdo, ao redor dos dentes molares, com crescimento para as faces vestibular e palatina. A lesão é delimitada por bordas elevadas e esbranquiçadas, com superfície contendo material necrótico. A região ao redor dos molares direito encontra-se espessa, com retração gengival pronunciada (3X).

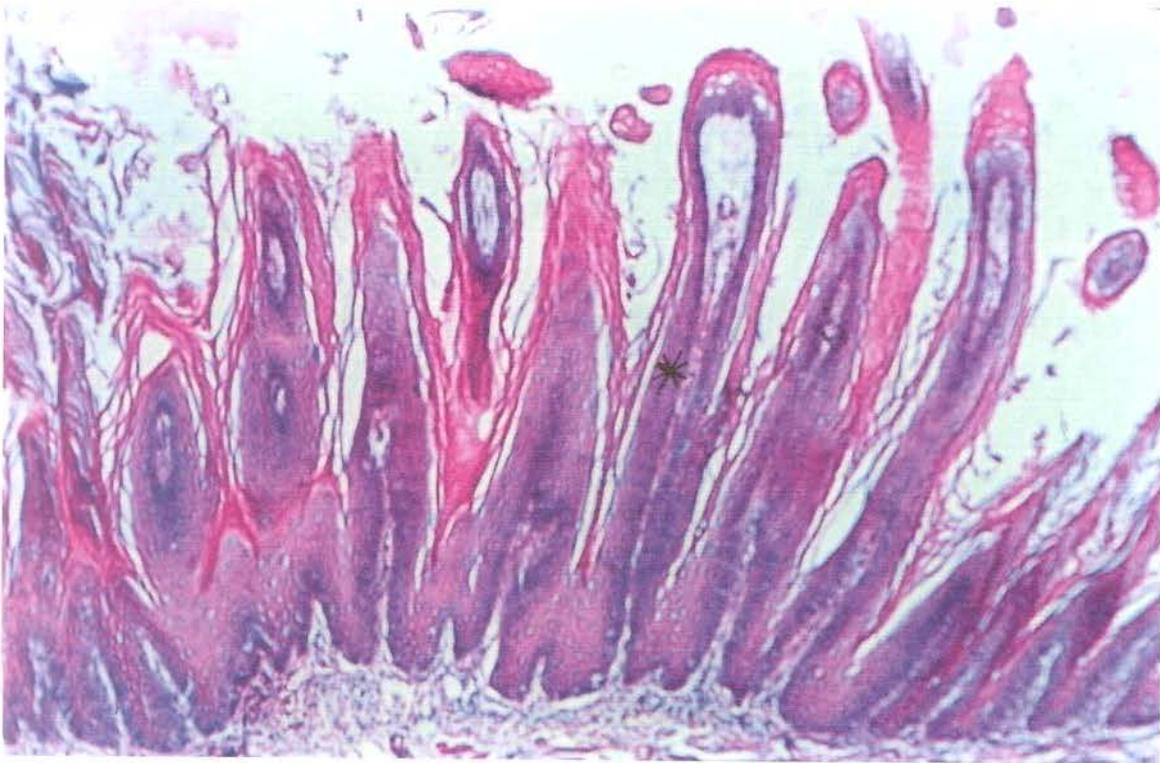
**Fig. 16** - Aspecto característico dos carcinomas de mandíbula, em rato norm./nqo, apresentando crescimento para as faces vestibular e lingual dos molares (seta). A lesão é delimitada, com superfície necrosada (3X).



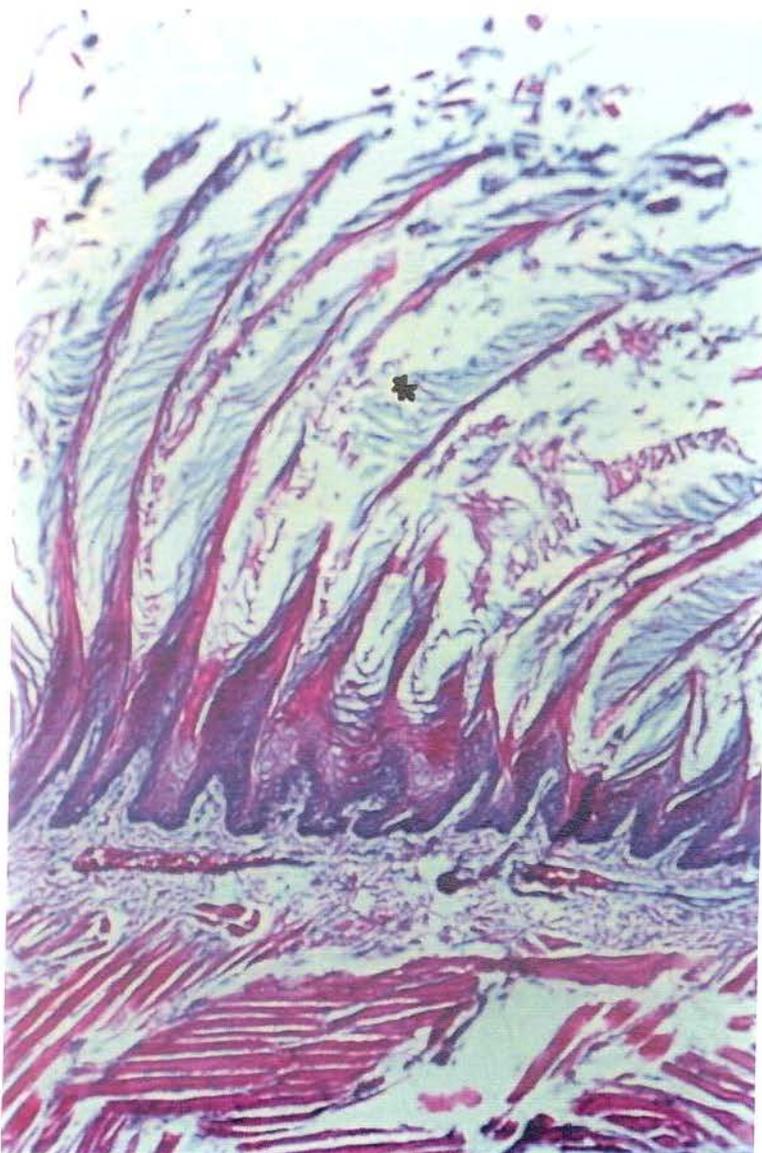
**Fig. 17** - Superfície da língua de rato sialo/nqo. Epitélio acantótico, com áreas de intensa hiperqueratose e aplainamento das papilas verdadeiras (\*). Os tecidos subjacentes apresentam-se aparentemente normais (315X, H&E).



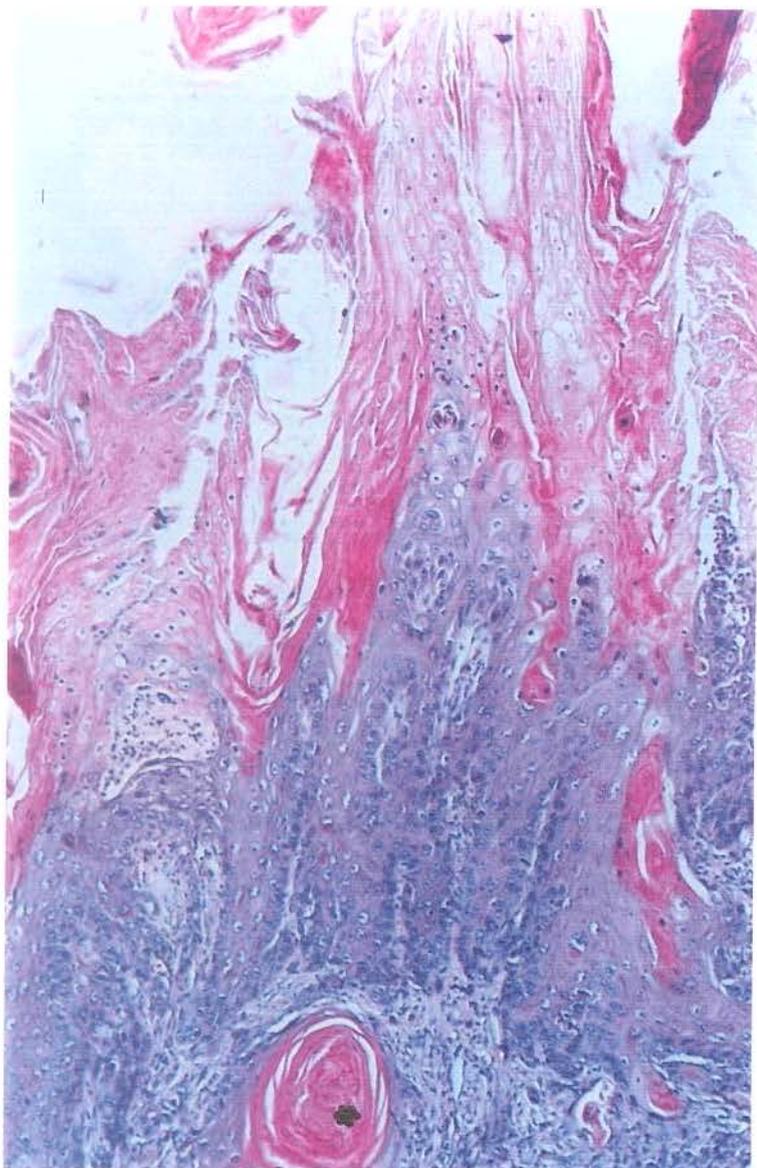
**Fig. 18** - Papilas verdadeiras de rato sialo/nqo. Observa-se alongamento das papilas verdadeiras, hiperqueratose e descamação da queratina (\*) (315X, H&E).



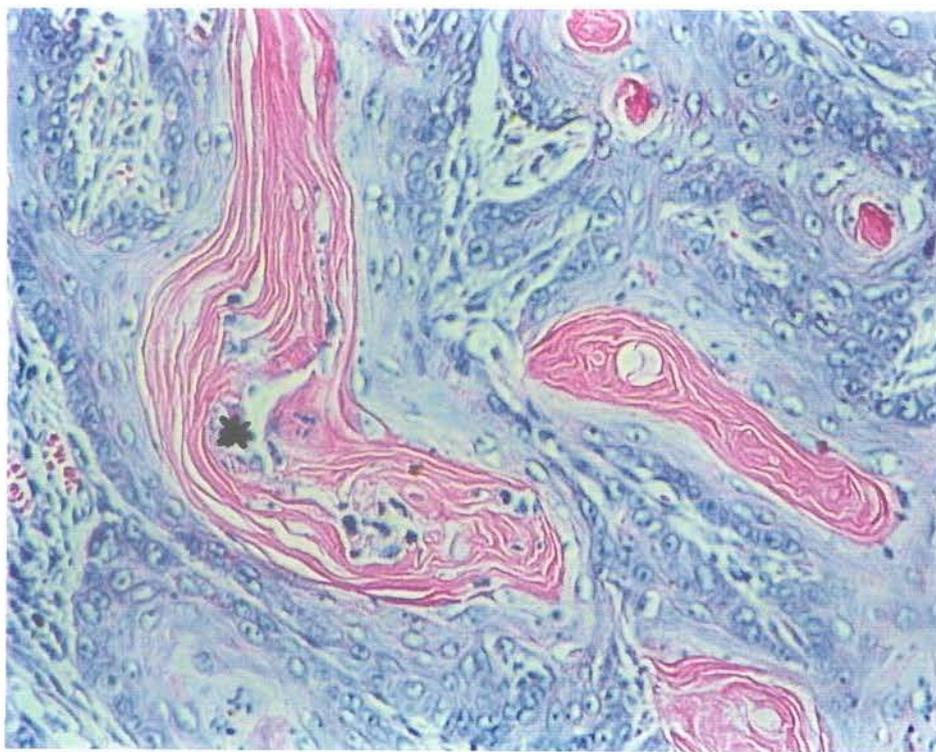
**Fig. 19** - Área papilomatosa na língua de rato do grupo norm/nqo (\*). Projeções epiteliais em forma de dedos de luva, com superfície hiperqueratótica (800X, H&E).



**Fig. 20** - Superfície da língua de rato norm./nqo, apresentando as papilas verdadeiras bastante alongadas, com hiperqueratose e descamação da queratina (\*) (78X, H&E).



**Fig. 21** - Área de carcinoma bem diferenciado de rato do grupo sialo/nqo, mostrando superfície com epitélio displásico e hiperqueratótico (seta). Presença de pérolas de queratina ( \* ) (800X, H&E)



**Fig. 22** - Carcinoma de língua de rato do grupo norm./nqo, mostrando células epiteliais neoplásicas no interior do tecido conjuntivo e intensa formação de pérolas de queratina ( \* ) (2000X, H&E).

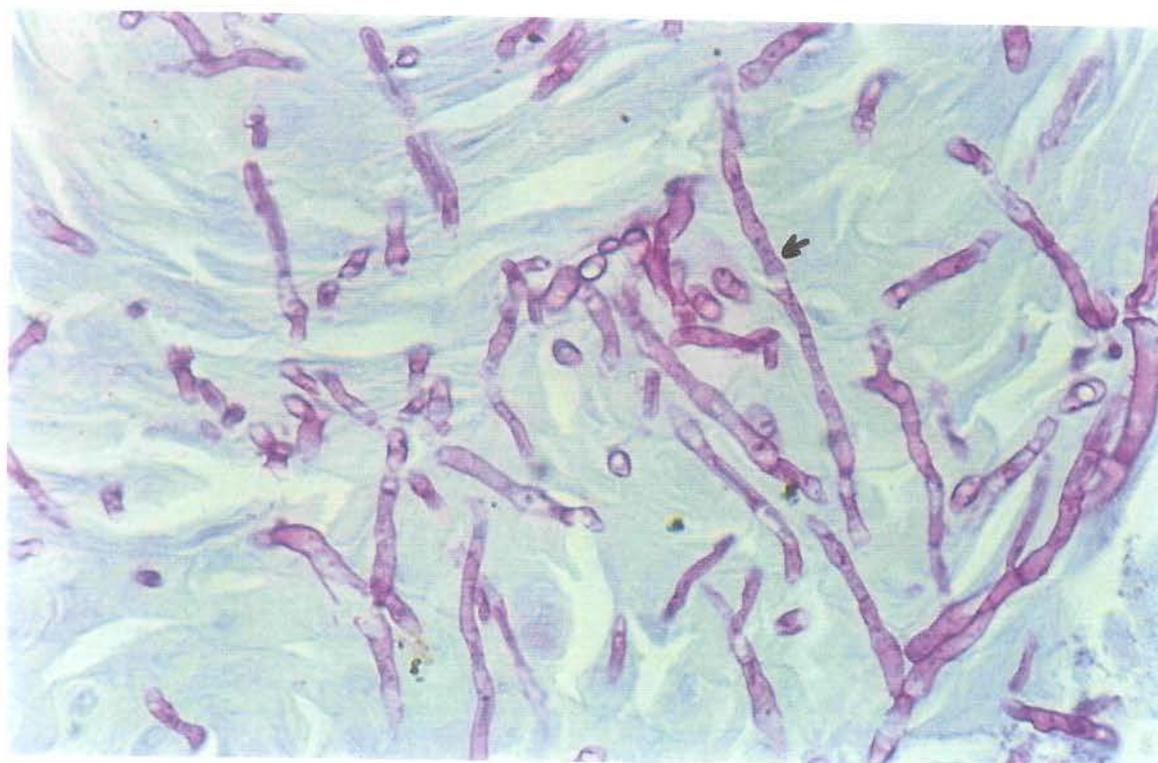
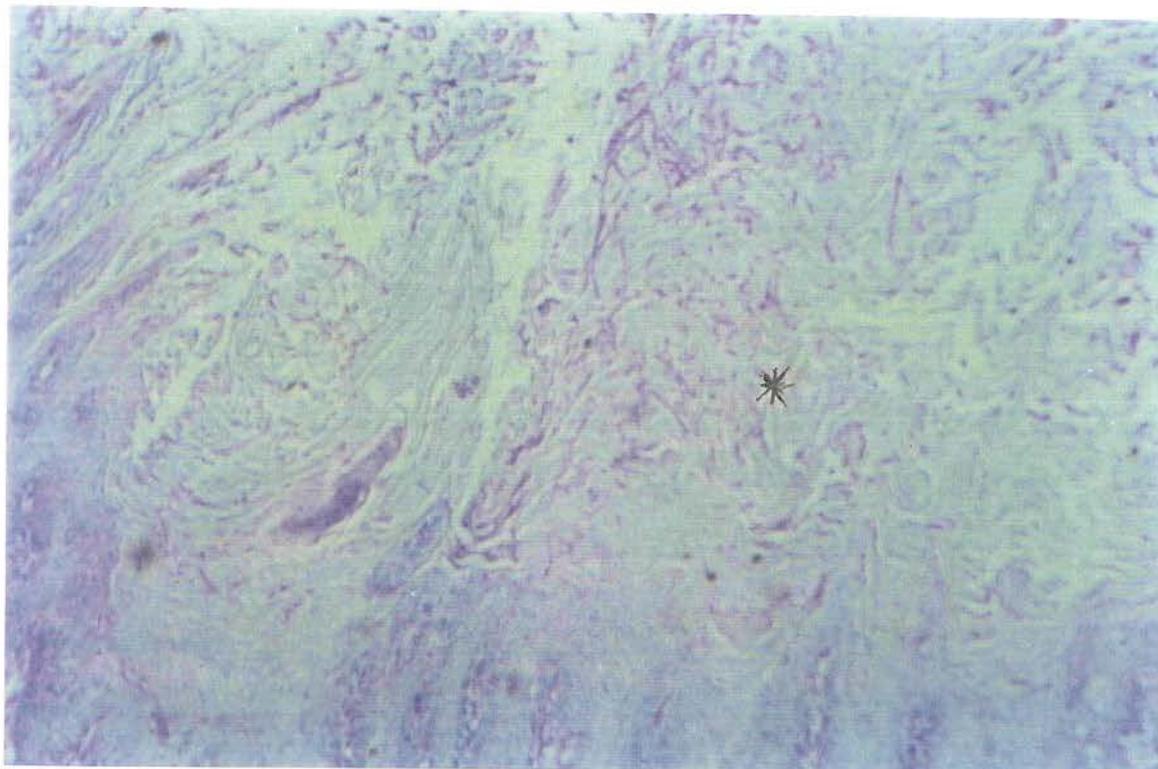


Fig. 23 - Candidose na língua de rato norm./nqo, 48h após a inoculação de *C. albicans*. A candidose está localizada na superfície do epitélio, em área de hiperqueratose (\*) (315X, PAS-H).

Fig. 24 - Maior detalhe da figura anterior, mostrando a infiltração da queratina por hifas de *C. albicans* (seta) (2000X, PAS-H).

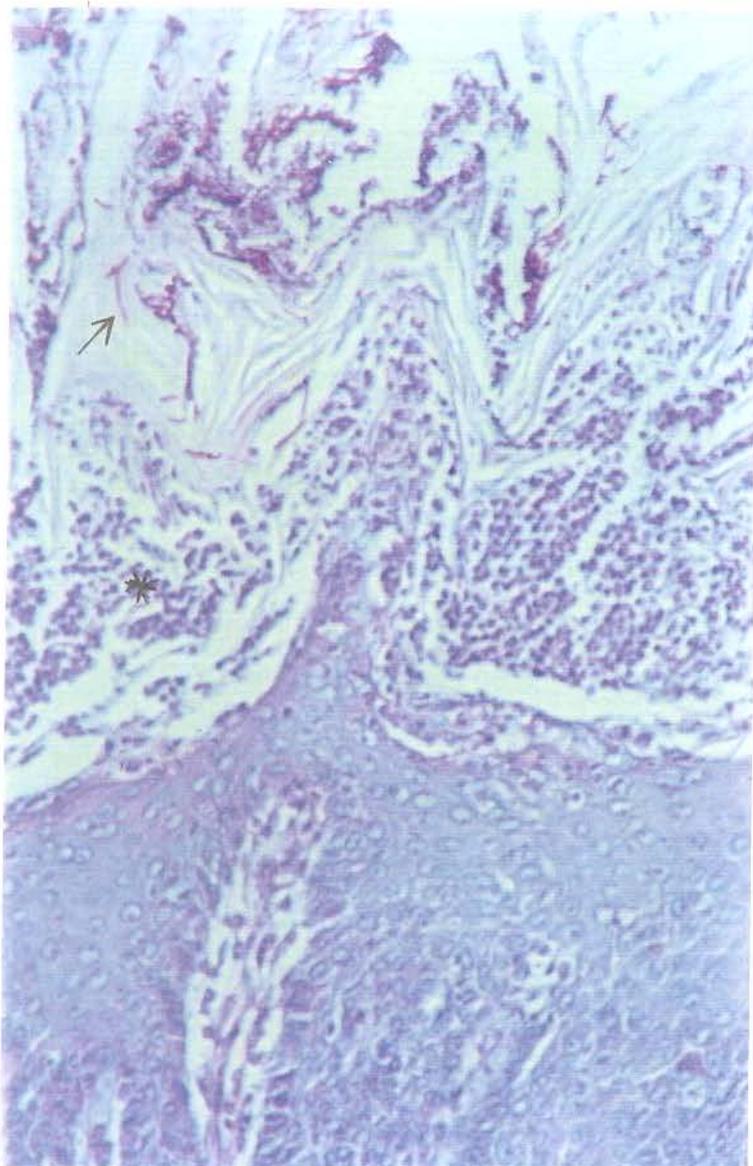


Fig. 25 - Candidose na língua de rato sialo/nqo, 48h após a inoculação da levedura. Epitélio hiperqueratótico, com superfície coberta por placa bacteriana. Hifas de *C. albicans* (seta) e intenso infiltrado de PMN, com formação de microabscessos ( \* ) podem ser observados na superfície do epitélio (800X, PAS-H).

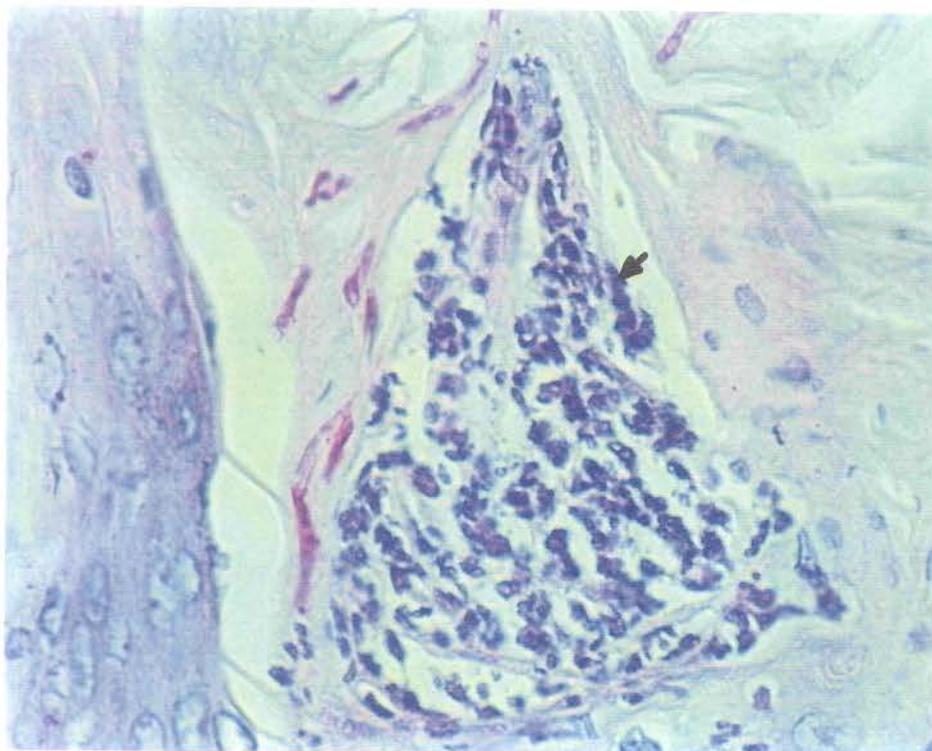


Fig. 26 - Candidose com formação de microabscesso (eta) intraepitelial, observado em animal sialo/nqo, 48h após inoculação da *Candida* (800X, PAS-H).

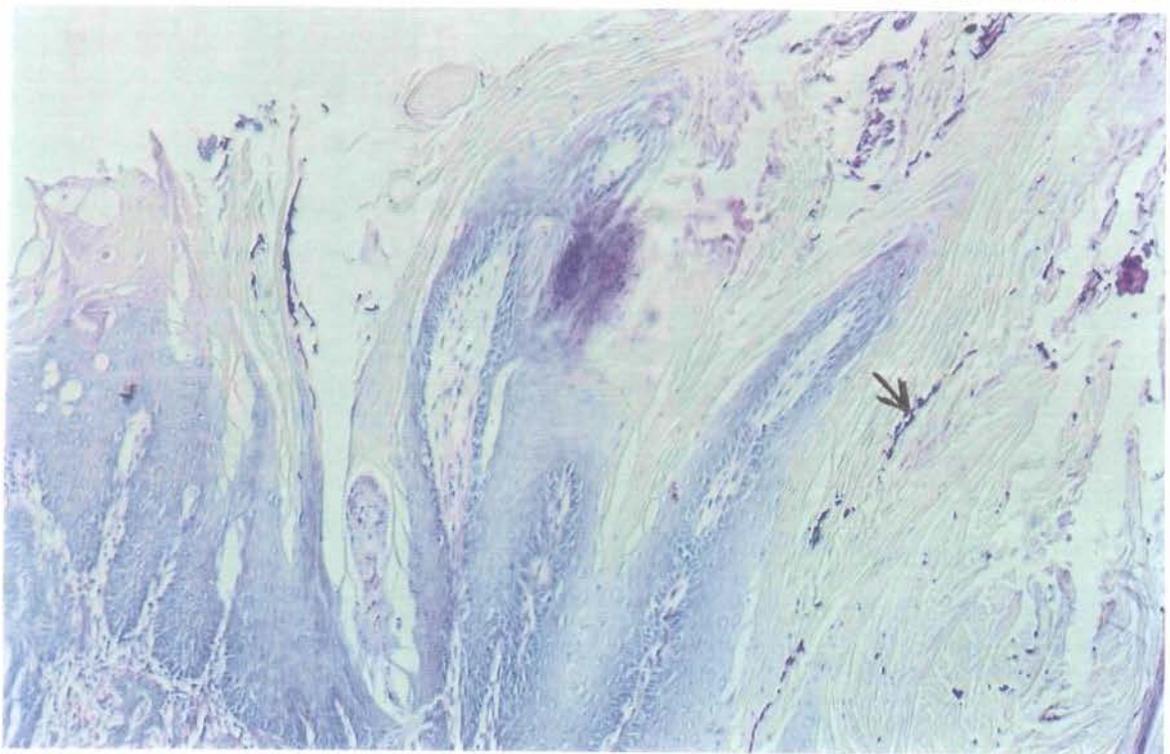
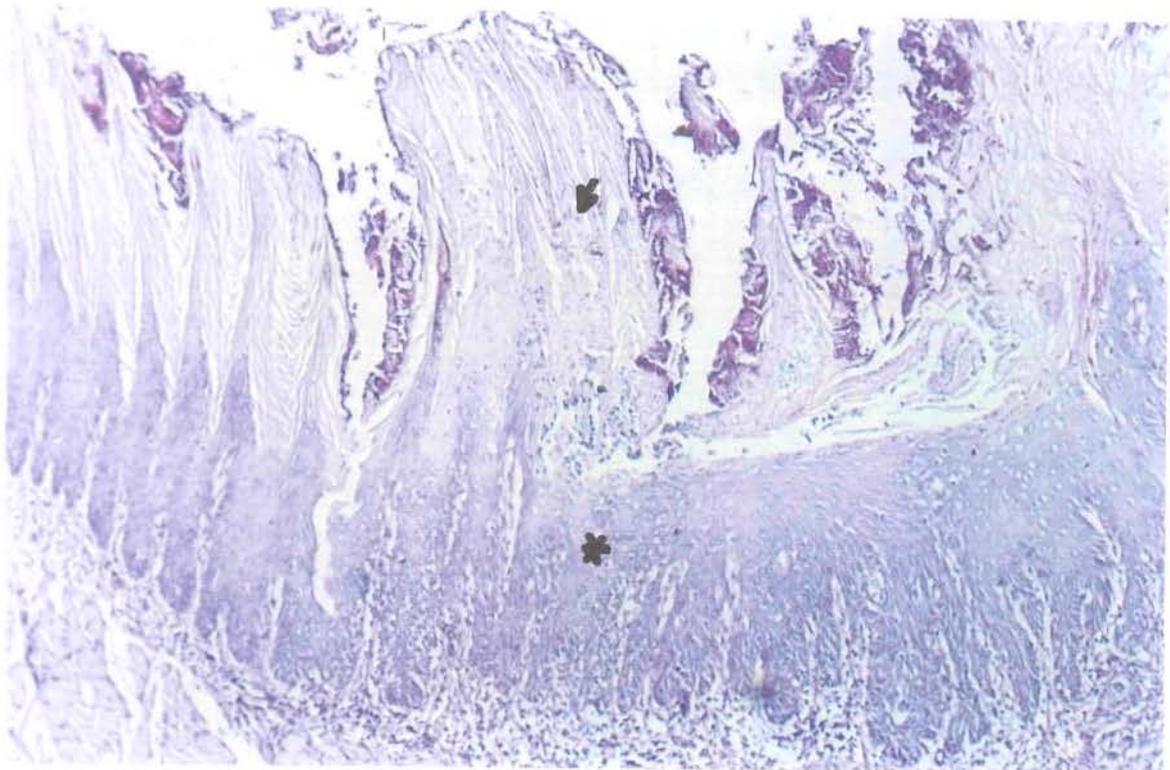
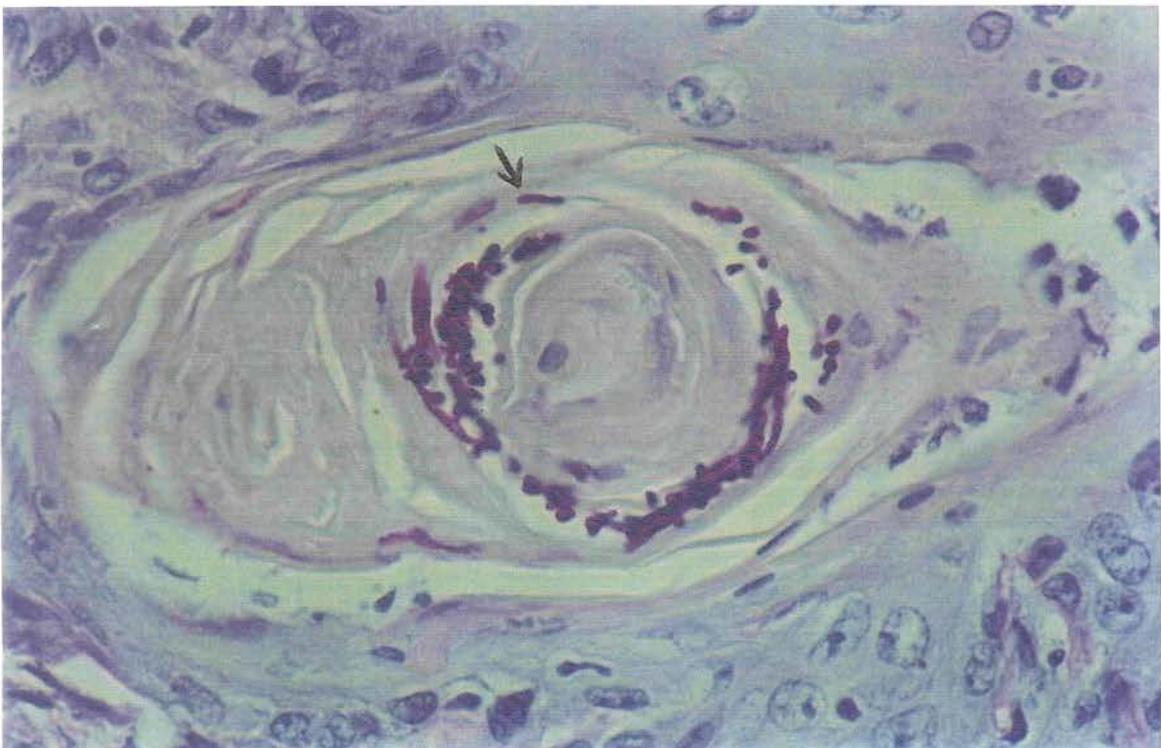
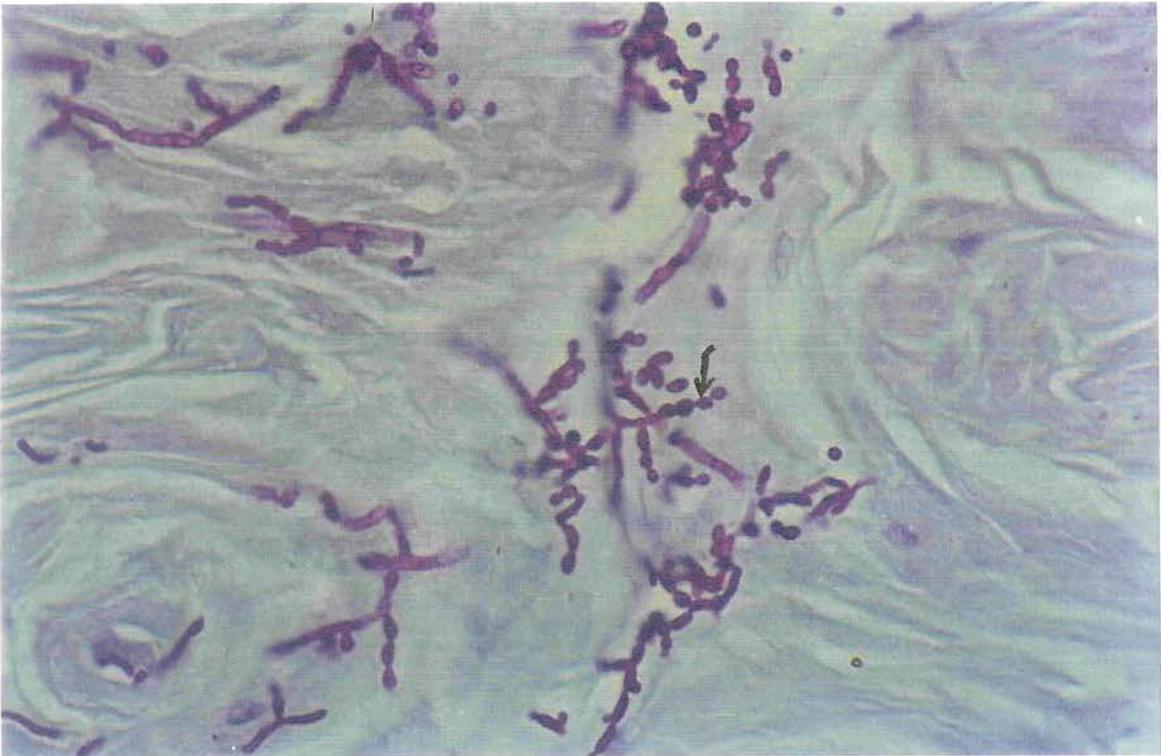


Fig. 27 - Superfície da língua de rato sialo/nqo, 24h após a inoculação de *C. albicans*. O epitélio apresenta-se acantótico e displásico (\*), com superfície apresentando papilas verdadeiras alongadas, com hiperqueratose. Presença de hifas de *Candida* (seta), infiltrado de PMN e abundantes bactérias (315X, PAS-H).

Fig. 28 - Candidose na superfície de papiloma na língua de rato sialo/nqo, 24h após a inoculação da levedura (315X,PAS-H).



**Fig. 29** - Candidose na superfície hiperqueratótica do epitélio da língua de rato do grupo norm./nqo, 24h após a inoculação, mostrando abundantes brotamentos (seta) (2000X, PAS-H)

**Fig. 30** - Mesmo animal da figura anterior, mostrando a presença de hifas e brotamentos de *C. albicans* no interior de uma pérola de queratina (seta) num carcinoma bem diferenciado (2000X, PAS-H).

## **Discussão**

## Discussão

O modelo de carcinogênese bucal experimental utilizado neste estudo foi introduzido por WALLENIUS & LEKHOLM (1973). A aplicação de 4NQO no palato de ratos leva ao desenvolvimento de carcinomas num período de 7 a 9 meses.

Durante o tratamento com 4NQO os ratos normais e sialoadenectomizados apresentaram desenvolvimento semelhante aos respectivos controles (grupos norm. e sialo), e os sinais de debilidade física, com perda de peso corporal, foram observados após o estabelecimento dos tumores malignos na cavidade bucal, o que também foi relatado por WALLENIUS (1966; 1977) e STEIDLER & READE (1984). Ao término do experimento os ratos do grupo sialo/nqo apresentaram média de peso corporal estatisticamente menor que os do grupo norm/nqo, sugerindo menor resistência dos ratos xerostômicos à presença das ulcerações na cavidade bucal causadas pelo 4NQO. Ambos os grupos sialo/nqo e norm./nqo apresentavam peso corporal inferior aos respectivos controles, sugerindo maior dificuldade de alimentação e conseqüente emagrecimento dos ratos com lesões bucais causadas pelo 4NQO.

Neste estudo, com a aplicação de 4NQO por 4 meses e acompanhamento clínico, os carcinomas foram observados após 7 a 14 meses em 100% dos animais. Nos sialoadenectomizados, os carcinomas ocorreram mais precocemente, sendo estatisticamente significante em relação aos que tinham salivação normal. Está bem estabelecido que o desenvolvimento dos carcinomas pelo 4NQO é dependente da dose e do período de aplicação do carcinógeno. O período e a dose modificam a quantidade e o tempo de formação das lesões. SVENSON & HEIDEN (1982) após aplicação de 4NQO no palato de ratos por 12 a 22 semanas, obtiveram carcinomas após 30 a 35 semanas. Estudo mais detalhado sobre a relação entre a dose e o tempo de aplicação do carcinógeno e o período de desenvolvimento de carcinomas foi realizado por FISKER et al. (1987). Os autores demonstraram que quanto menor a dose do carcinógeno, maior o tempo para surgimento do primeiro carcinoma. Com 2 aplicações o primeiro carcinoma surge após 12 meses e com 18 aplicações após 4 a 5 meses. Neste estudo, com 4 meses de 4NQO o primeiro carcinoma foi observado após 3 meses, totalizando 7 meses desde o início da aplicação do 4NQO.

A xerostomia favoreceu o desenvolvimento dos carcinomas, demonstrando assim a ação da saliva na proteção da cavidade bucal frente a

carcinógenos químicos. A saliva não impede o desenvolvimento dos carcinomas, porém dificulta a ação do 4NQO, retardando o aparecimento das neoplasias malignas. A xerostomia pode causar ressecamento da mucosa bucal, fissuras na língua e lábios e ulcerações (GLASS, 1984), que podem favorecer a penetração do carcinógeno. Além disso em ratos xerostômicos o carcinógeno pode permanecer por mais tempo na cavidade bucal, uma vez que não será removido rapidamente pela saliva que está em quantidade diminuída. Os dados obtidos confirmam os achados de NAVARRO (1992) e SANTOS (1995) que demonstraram que ratos sialoadenectomizados desenvolveram carcinomas mais precocemente que ratos com salivagem normal.

O principal sítio da cavidade bucal atingido pelos carcinomas foi a língua, seguido pelo palato e mandíbula. Apesar do número relativamente pequeno de carcinomas em outros locais que não a língua, não houve diferenças de tempo entre o surgimento dos carcinomas nos vários locais da boca. Embora o 4NQO seja aplicado na mucosa palatina, esta alta incidência de carcinomas na língua pode ser explicada pelo íntimo contato da região posterior da língua com a área de aplicação do carcinógeno, fazendo com que ambos os sítios recebam quantidade semelhante de carcinógeno.

Carcinomas na porção anterior da língua foram infreqüentes, sendo mais comuns áreas leucoplásicas e atrofia das papilas linguais. O desenvolvimento de carcinomas na porção anterior da língua é raro, sendo necessário o uso de agentes promotores potentes ou a aplicação do carcinógeno sobre superfícies submetidas a traumas e escoriações (FUJITA et al., 1973). A maior resistência observada na porção anterior da língua deve-se provavelmente à presença de espaços interpapilares pronunciados na região das papilas cônicas simples, os quais são recobertos por queratina mecanicamente mais resistente do que aquela que recobre a extremidade das papilas. Já na região do tubérculo intermolar, as papilas filiformes verdadeiras e gigantes estão distribuídas muito próximas umas das outras, conseqüentemente apresentam espaços interpapilares reduzidos, além de apresentarem camada de queratina com composição diferente daquela encontrada nos espaços interpapilares (KUTUZOV & SICHER, 1951).

O aspecto clínico dos carcinomas de língua, palato e mandíbula foi semelhante ao descrito na literatura. Na língua as lesões desenvolveram principalmente como nódulos de crescimento exofítico e endofítico, delimitado por bordas elevadas e esbranquiçadas e com superfície ulcerada e necrosada. Com o desenvolvimento e expansão das lesões, todo o tubérculo intermolar e a região faríngea da língua eram atingidos. Os carcinomas de palato e mandíbula

tinham início ao redor dos dentes molares; apresentando-se como ulcerações, geralmente delimitadas por bordas elevadas esbranquiçadas, com expansão para as faces palatina e lingual e vestibular dos molares. Histologicamente, os carcinomas que se desenvolveram na língua e palato foram do tipo escamoso, diferenciados, com células atípicas e grande quantidade de queratina. Dependendo da extensão do processo, observou-se áreas de necrose e acúmulos de células inflamatórias e ilhas de células neoplásicas invadindo músculos e glândulas. No palato observou-se por vezes envolvimento ósseo. As características histológicas dos carcinomas bucais causados pelo 4NQO já foram descritos por NAVARRO (1992), SANTOS (1995). FISHER & PHILIPSEN (1990) relatam que no palato é frequente o desenvolvimento de carcinoma verrucoso, que apresentam hiperplasia epitelial, hiperqueratose, interdigitações papilomatosas profundas, epitélio bem diferenciado, com áreas de displasia e membrana basal intacta. Esta característica parece estar relacionada com altas doses de 4NQO. Entretanto estas características não são predominantes na língua.

Durante a aplicação do 4NQO até o sacrifício dos animais, os exames clínicos da cavidade bucal mostraram a presença de alterações que antecederam os carcinomas. As primeiras alterações podem ser observadas, na língua e no

palato após dois meses de aplicação do 4NQO e caracterizam-se por áreas de leucoplasia, atrofia das papilas linguais e papilomas na língua e perda das rugosidades da região intermolar do palato. A progressão destas alterações já foram descritas por WALLENIUS (1966); WALLENIUS & LEKHOLM (1973); LEKHOLM & WALLENIUS (1976); SVENSON & HEYDEN (1982). Ainda não está bem determinado se os carcinomas evoluem a partir destas alterações.

A permanência de *Candida albicans* na cavidade bucal foi estudada nos ratos normais e sialoadenectomizados. Na maioria dos estudos relatados na literatura, a inoculação de *Candida albicans* na cavidade bucal dos animais é feita por três a quatro dias consecutivos (TOTTI, 1994; JORGE, 1991); entretanto neste estudo optou-se pela utilização de apenas uma inoculação da levedura, pois dessa forma os resultados obtidos poderiam melhor representar o comportamento das células inoculadas; enquanto que após 3 ou 4 dias os resultados refletem um processo de colonização resultante da sobreposição de inoculações múltiplas.

Com relação a permanência da *Candida albicans* na cavidade bucal após 24 e 48h. da inoculação, observou-se que a xerostomia e as alterações causadas pelo 4NQO favoreceram a permanência da *Candida* na cavidade bucal de ratos. Os ratos sialoadenectomizados apresentaram número significativamente maior de leveduras na cavidade bucal em ambos os períodos. Os efeitos da xerostomia na

colonização da mucosa foram estudados por MEITNER et al. (1990); TOTTI (1994); JORGE (1991). MEITNER et al. (1990) observaram maior número de leveduras aderidas às células da mucosa bucal e do esôfago de ratos com fluxo salivar reduzido. Em ratos submetidos à sialoadenectomia, JORGE (1991) observou que após inoculação de  $10^8$  células /ml de *C. albicans* por 3 dias consecutivos os ratos sialoadenectomizados apresentavam maior número de *Candida* na cavidade bucal que os ratos com salivagem normal. Resultados semelhantes foram obtidos por TOTTI (1994); após quatro inoculações sendo que a quantidade de leveduras foi maior nos ratos xerostômicos até trinta dias após a última inoculação.

Nos ratos com diminuição da salivagem, a remoção mecânica das leveduras pela saliva fica comprometida e provavelmente este seja o principal fator responsável pela implantação do fungo na boca (JORGE et al., 1993; 1997). Vários fatores estão envolvidos na permanência e colonização bucal pela *C. albicans*. Um dos primeiros e mais importantes, é a capacidade de aderência das leveduras às células epiteliais. A aderência ocorre principalmente pela interação entre adesinas do microrganismo e receptores específicos nas células epiteliais (DOUGLAS, 1987; KENEDY, 1988, OLSEN, 1990). A aderência é necessária para a colonização inicial e contribui para persistência da *Candida* no hospedeiro.

Sem se aderir, a taxa de crescimento de *C. albicans* é insuficiente para manter o fungo na boca. A maioria dos estudos sobre aderência de *C. albicans* às células epiteliais é realizado *in vitro* e demonstram que vários fatores podem influenciar na aderência da levedura às células epiteliais. Dentre esses fatores, a microbiota indígena é de grande importância, uma vez que pode favorecer a aderência, agindo como ponte bacteriana entre a levedura e as células epiteliais (BAGG & SILVERWOOD, 1986; MAKRIDES & MacFARLANE, 1983); ou dificultar a aderência, ligando-se a possíveis adesinas de *C. albicans* (SEKI, 1997).

O maior número de leveduras nos ratos xerostômicos também pode ser explicado pela presença de maior quantidade de bactérias nas papilas linguais dos ratos xerostômicos em relação aos animais com salivagem normal. Segundo SCOTT et al. (1985) e MAKRIDES & MacFARLANE (1983), *E. coli* e *K. aerogenes* favorecem a aderência de *Candida* e ratos por serem coprófagos podem apresentar um grande número dessas bactérias na cavidade bucal.

Não foram encontrados na literatura dados referentes à aplicação de 4 NQO e a permanência de *Candida* na cavidade bucal de ratos. Neste estudo observou-se que os ratos normais e sialoadenectomizados tratados com 4 NQO apresentaram um número menor de *Candida* na boca em relação aos não tratados no período de 24h após a inoculação, ocorrendo aumento após 48h. O número

reduzido de *Candida* no período de 24h nos ratos tratados com 4NQO pode ser explicado pela presença dos carcinomas. Os carcinomas que se desenvolveram na língua dos animais apresentavam na sua maioria, ulcerações e necrose, que não favorecem a aderência de *C. albicans*. Causando a diminuição do número de ufc/ml recuperado após 24h. Além disso, a expressão das adesinas de *Candida* pode estar modificada nas células neoplásicas, prejudicando a aderência e permanência da *Candida* na boca dos animais. Os tecidos adjacentes aos carcinomas apresentavam intensa hiperqueratose, que foram as principais áreas de colonização por *C. albicans*. O aumento no número de células de *Candida* recuperada da cavidade bucal observado após 48h da inoculação deve-se provavelmente à multiplicação das leveduras, principalmente daquelas aderidas nas áreas adjacentes aos carcinomas onde a aplicação do 4NQO resultou em hiperqueratose acentuada.

A candidose bucal foi estudada apenas nos ratos com carcinoma na língua, por ser o principal reservatório da *Candida* na boca e provavelmente possuir maior quantidade de receptores para a levedura, favorecendo a aderência e o desenvolvimento da infecção pela *Candida*.

A colonização secundária de carcinomas bucais pela *Candida* e seu papel na carcinogênese não é bem compreendido. ZHANG et al. (1994) induziram

alterações epiteliais na mucosa bucal de hamster através da aplicação de DMBA, que variavam de hiperplasia à displasia com vários graus de severidade e posteriormente inocularam *Candida albicans*. Os autores verificaram que *Candida albicans* induziu displasia em hiperplasia benigna e pode promover transformação maligna em casos de displasia epitelial. Segundo HSIA (1981) e KROG et al. (1990), *Candida albicans* pode favorecer o desenvolvimento de carcinomas na boca e esôfago pela produção de nitrosaminas endógenas. SEOANE et al. (1996) relatam a progressão de região de queilite angular crônica com constante presença de *Candida* para carcinoma epiteliomatoso. YEMMA & BERK (1994) demonstraram que a inoculação intraperitoneal de *C. albicans* produziu numerosas lesões semelhantes a tumores e abscessos em ratos e ainda que o dano tecidual é causado pela liberação inicial de enzimas lisossômicas pelos tecidos afetados pela infecção por *Candida*.

Foi observado neste estudo que os ratos dos grupos norm/nqo e sialo/nqo, com carcinoma de língua, apresentaram maior número de candidose que os ratos dos grupos norm. e sialo, demonstrando que as alterações no epitélio da língua dos ratos causadas pelo 4NQO favorecem a infecção. Entretanto, como ficou demonstrado nas tabelas 6 e 7 dos resultados, as candidoses predominaram nas áreas de hiperqueratose no epitélio adjacente aos

carcinomas e não nos carcinomas já desenvolvidos. O epitélio da língua dos ratos adjacente aos carcinomas apresentava áreas de intensa hiperqueratose que frequentemente estavam invadidas por hifas de *Candida*, enquanto que as áreas de candidose no interior dos carcinomas foram raras, mesmo naqueles com abundante produção de queratina. A *Candida albicans* é queratófílica e isso pode explicar a maior incidência de candidose nas áreas hiperqueratóticas da superfície epitelial adjacente aos carcinomas. É possível que a queratina dos carcinomas seja diferente, além das áreas de necrose e ulceração dificultarem a invasão pela *Candida*.

É interessante enfatizar que em humanos, vários trabalhos indicam que a *Candida* é mais frequente em áreas de hiperqueratose, principalmente dispásicas do que em regiões de carcinomas (CAWSON, 1966). JONES e RUSSEL (1973), relataram que embora confinada à camada córnea, a candidose está associada à alterações significativas nos tecidos epitelial e subepitelial, o que sugere pelo menos um papel co-causativo da infecção por *Candida* em alguns casos de leucoplasias em humanos. LIPPERHEIDE et al (1996) estudaram a prevalência de *Candida* em 35 casos de leucoplasias e isolaram a levedura de 43.7% dos pacientes, sendo a *C. albicans* sorotipo A a espécie predominante, estando presente em 76% das amostras de leucoplasia. Estes autores observaram que a

presença de lesões orais estava associada à diminuição no número de espécies e biotipos de *C. albicans* isolados, sugerindo que a *C. albicans* e particularmente alguns de seus biotipos mostram alto potencial de adaptação às alterações associadas com o desenvolvimento de leucoplasias e liquen plano. Outro aspecto importante a ser observado é que a aderência da *Candida* aos queratinócitos é seletiva e dependente da presença de receptores específicos na superfície das células. Assim a menor incidência de candidose em áreas de carcinoma também pode ser explicada pela possível alteração ou destruição desses receptores no tecido necrótico da superfície dos carcinomas enquanto que estes receptores podem estar expressos em maior quantidade nas áreas de hiperqueratose. COTTER et al. (1997) demonstraram in vitro que alterações nas membranas celulares nos estágios iniciais de apoptose induzida por agentes quimioterápicos, estão diretamente relacionadas à diminuição da aderência de *Candida*.

O tipo de queratina também está relacionado com a aderência e conseqüentemente com a colonização do epitélio pela *Candida*. A aderência ocorre predominantemente na queratina “mole” da face convexa das papilas enquanto que na queratina “dura” da face oposta a aderência é extremamente rara. A queratina produzida pelas células neoplásicas pode estar modificada, o que

explicaria a baixa incidência de candidose nas pérolas de queratina dos carcinomas.

No período de 24h as áreas de candidose foram mais freqüentes nos ratos sialo, enquanto que após 48h, tanto os ratos normais quanto sialo apresentaram número semelhante de áreas de candidose; o que pode ser devido provavelmente ao maior número de células presentes na cavidade bucal desses animais em relação aos normais. Após 48h observou-se maior incidência de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, com formação de microabscessos intraepiteliais, provavelmente devido ao aumento da candidose e do dano aos tecidos. Aumento semelhante no período de 48h após a inoculação de *Candida* foi observado por LACASSE et al. (1990).

Os carcinomas, mais que a sialoadenectomia isoladamente, favoreceram a candidose, uma vez que 92% dos ratos norm./nqo e sialo/nqo desenvolveram candidose, enquanto que apenas 10% dos ratos sialo foram positivos. Observa-se ainda que os ratos tratados com 4NQO tiveram além de maior número de áreas de candidose, áreas mais extensas que os não tratados.

A partir dos dados obtidos, concluiu-se que carcinomas de língua de ratos favorece a infecção secundária por *C. albicans*, principalmente nas regiões de hiperqueratose. Estes dados estão de acordo com dados na literatura que indicam

associação entre a presença de *Candida* e displasias epiteliais de boca. O modelo usado portanto, parece ser adequado para outros estudos que possam colaborar para melhor compreensão da participação das candidoses nas leucoplasias e carcinomas de boca.

## **Conclusões**

## Conclusões

- 1 A xerostomia favoreceu a permanência de *C. albicans* e o desenvolvimento de candidose na língua dos ratos.
- 2 Candidose foi mais frequente nos ratos normais e sialoadenectomizados tratados com 4NQO e que apresentavam carcinoma de língua.
- 3 A presença de candidose foi mais frequente nas áreas de hiperqueratose na superfície epitelial, adjacentes ao carcinomas que no interior das neoplasias.

**Aderência de *Candida albicans* na superfície da língua de ratos normais e xerostômicos tratados com tetraciclina**

## Introdução

## Introdução

A candidose bucal é uma infecção oportunista causada pelo gênero *Candida*, principalmente pela espécie *C. albicans*, em pacientes normais e imunossuprimidos (SANGERORZAN,1994; REICHART, 1995). A *C. albicans* é um comensal da cavidade oral, sendo encontrada em 20-40% dos indivíduos normais (ODDS, 1988). Como em outras infecções, a aderência de *Candida* às células epiteliais é considerada etapa fundamental para o desenvolvimento da doença (MACURA, 1987). Várias adesinas, particularmente do tipo manoproteína, foram descritas na *C. albicans* (SEGAL et al., 1987; CALDERONE, 1993), mas o mecanismo de aderência ainda não está bem estabelecido. Xerostomia e antibioticoterapia favorecem o desenvolvimento de candidose bucal (OLSEN, 1990; JORGE et al., 1993;), mas não é conhecido se interferem nos mecanismos de aderência. Como os estudos de aderência de *Candida* são geralmente feitos *in vitro*, usando suspensões de células epiteliais ou materiais de próteses (VASILAS, 1997), o objetivo deste trabalho foi verificar a aderência de *Candida albicans in vivo* na língua de ratos, assim como avaliar os efeitos da xerostomia e do tratamento com tetraciclina.

## **Material e Métodos**

## Material e Métodos

Foram utilizados 160 ratos Wistar machos, pesando cerca de 200g . Antes do início do experimento, os animais foram submetidos à pesquisa de leveduras do gênero *Candida* na boca. Um "swab" previamente esterilizado foi passado na cavidade bucal dos ratos e a seguir semeado em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose contendo cloranfenicol a 0,1 mg/ml de meio (Quemacetina Succinato, Carlo Erba). As placas foram incubadas a 37°C por 48h e a seguir pesquisou-se a presença de colônias características de *Candida*.

Oitenta ratos foram submetidos a sialoadenectomia das glândulas salivares maiores, parótida, submandibular e sublingual (CHEYNE, 1939). Quarenta ratos normais e 40 sialoadenectomizados receberam tetraciclina a 2% na água de beber durante 4 dias. Doze horas após a suspensão da administração da tetraciclina, os animais foram inoculados com 0,2 ml de suspensão contendo  $5 \times 10^8$  células de *C. albicans* na cavidade bucal, com auxílio de uma seringa de 1 ml e o inóculo espalhado sobre a língua com um *swab* previamente esterilizado e embebido na suspensão. Os restantes, normais e xerostômicos, receberam apenas aplicação de *C. albicans*. Os animais foram mortos 5, 15, 30, 60 min. e 4, 12, 24 e 48h após a inoculação. A língua foi retirada, lavada em solução fisiológica e fixada em formol a 10%. Antes da inclusão em parafina, a língua foi cortada no sentido

transversal, separando os dois terços anteriores do terço posterior e longitudinalmente na porção central. Os cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram corados pelas técnicas de H&E e PAS-hematoxilina.

A quantidade de bactérias foi avaliada subjetivamente considerando-se os ratos controles como ++. O número de leveduras aderidas foi determinado mediante contagem das células com auxílio de objetiva de 40X e ocular de 10X, na região das papilas verdadeiras, cônicas e gigantes em dois cortes da língua, 20 campos por tipo de papila, totalizando 60 campos por animal. O número de campos microscópicos com a presença de pseudohifas no interior do epitélio, caracterizando candidose, foi determinado nas mesmas regiões observadas para aderência da levedura, com uma média de 60 campos por animal. As contagens foram realizadas sempre no sentido da ponta para a região faríngea da língua.

Nos períodos de 4, 12, 24 e 48 horas, antes do sacrifício, *C. albicans* foi recuperada da cavidade bucal dos animais através da coleta de saliva com auxílio de uma “bolinha de algodão” previamente esterilizada e pesada que foi mantida na boca dos ratos por 5 min. e a seguir novamente pesada para se determinar o volume de saliva coletado. O algodão foi transferido para um tubo de ensaio onde o volume de saliva foi completado para 2 ml com solução fisiológica esterilizada. Após homogeneização, as amostras foram submetidas à diluições

decimais até  $10^{-3}$  e semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48h. O número de ufc/ml recuperado da boca dos animais foi determinado mediante contagem das colônias características de *C. albicans* na melhor diluição considerando-se o volume de saliva coletado. Nos períodos de 15 a 60 min a recuperação não foi feita porque este procedimento poderia interferir com a aderência das leveduras na superfície da língua. Todos os procedimentos realizados neste estudo quanto à sialoadenectomia e inoculação de *C. albicans* estão descritos em material e métodos da pag. 57.

## **Resultados**

## Resultados

O dorso da língua de rato é formado por papilas cônicas, verdadeiras, gigantes. Numa das faces da papila, a queratina é acidófila (queratina “dura”) e na outra, é basófila (queratina “mole”), onde observa-se acúmulo de placa formada por 3 a 4 camadas de bactérias. A antibioticoterapia sistêmica praticamente eliminou as bactérias aderidas às papilas, por outro lado, a xerostomia aumentou a quantidade de bactérias, que também foram freqüentemente observadas na queratina “dura” (Tab. 1). Após 12h da antibioticoterapia tanto no grupo controle quanto no xerostômico, bactérias foram novamente observadas nas papilas, mas em quantidade menor dos que nos respectivos controles.

Tabela 1- Presença de bactérias na superfície da língua de ratos dos grupos norm., norm./tet, xerost. e xerost./tet. O tempo foi considerado após a inoculação de *Candida* na boca, quando o tratamento com tetraciclina tinha sido interrompido (n=5).

Período	norm.	norm./tet	xerost.	xerost./tet
5 min.	++	—	+++	—
15 min.	++	—	+++	—
30 min.	++	—	+++	—
60min.	++	—	+++	—
4h	++	—	+++	—
12h	++	+	+++	+
24h	++	+	+++	+
48h	++	+	+++	++

— ausência de bactérias

(+) pouco (++) moderado (+++) abundante

Em todos os grupos, a levedura foi encontrada principalmente na superfície das papilas verdadeiras e em menor quantidade nas gigantes e cônicas respectivamente. Quando os números eram muitos pequenos os valores das papilas cônicas e gigantes eram semelhantes (Tab. 2). Assim como as bactérias, as células de *C. albicans* estavam aderidas principalmente na queratina "mole" da face convexa das papilas. Nos animais normais e xerostômicos a placa bacteriana estava bem organizada, embora mais acentuada nos ratos xerostômicos, e as leveduras foram observadas principalmente sobre as bactérias. A maior quantidade de partículas de *Candida* foi observada após 5 min., diminuindo gradativamente até 30 minutos. Após 60 min., o número já era muito baixo em relação ao inicial, assim permanecendo até 48h. A xerostomia aumentou significativamente a quantidade de *Candida* aderida, principalmente até o período de 60 min enquanto que a antibioticoterapia teve efeito oposto, causando diminuição de leveduras. Entretanto, os animais xerost./tet mostraram mais *Candida* do que os grupos norm. e norm./tet (Tab. 3). Nos ratos normais tratados ou não com tetraciclina, o número de partículas aderidas diminuiu gradativamente até o período de 60 min., quando atingiu valores próximos a zero, assim permanecendo posteriormente. Nos xerostômicos, a estabilização da contagem em valores bem baixos ocorreu após 4h.

Tabela 2 - Média e desvio padrão do número de células de *C. albicans* aderidas às papilas linguais de ratos normais e xerostômicos tratados com tetraciclina, em 20 campos microscópicos (aumento de 400X) de cada tipo papila (PV= papilas verdadeiras, PG = papilas gigantes, PCS = papilas cônicas simples) (n=5).

Período	papila	norm.	norm./tet	xerost.	xerost./tet
5min.	PV	412.2±333.8(5)	167.4±119.7(5)	1690.2±757.1(5)	579.2±840.2(5)
	PG	83.8±62.5(5)	15.8±12.9(5)*	818.6±613.0(5)	222.0±261.6(5)
	PCS	37.8±16.9(5)	8.0±11.9(5)*	554.5±366.9(5)	72.2±61.3(5)*
15min.	PV	108.0±56.0(5)	13.8±12.1(4)*	706.8±197.8(5)	648.8±759.9(5)*
	PG	25.8±15.9(5)	1.2±0.8(4)*	216.0±67.3(5)	53.8±38.3(5)*
	PCS	17.4±9.1(5)	1.0±0.7(4)*	274.2±170.4(5)	42.8±17.7(5)*
30min.	PV	80.4±25.3(5)	8.4±13.8(4)*	257.0±129.5(5)	89.0±48.5(5)*
	PG	16.4±12.9(5)	0.8±0.8(3)*	62.0±68.6(5)	27.8±20.3(5)
	PCS	17.4±9.1(5)	1.6±2.5(3)*	51.4±31.8(5)	5.6±4.8(5)*
60min.	PV	1.6±3.0(2)	3.2±5.5(1)	99.8±64.8(5)	59.2±40.0(5)
	PG	0.2±0.5(1)	0.2±0.5(1)	35.4±20.3(5)	27.8±20.3(5)
	PCS	0.2±0.5(1)	0.2±0.5(1)	32.6±17.0(5)	11.6±11.7(5)
4h	PV	1.6±1.8(3)	4.2±3.1(5)	5.2±4.1(5)	19.6±13.3(5)
	PG	0(0)	2.0±1.0(5)	0.8±1.1(2)	4.8±3.1(4)*
	PCS	0.4±0.5(2)	1.0±1.3(4)	2.0±1.6(4)	3.0±2.8(4)
12h	PV	0.6±0.6(3)	1.6±2.7(2)	4.0±1.9(4)	1.8±1.9(4)
	PG	0(0)	0.6±0.5(3)	1.4±1.9(3)	0.2±0.5(1)
	PCS	0.2±0.5(1)	0.6±0.9(2)	1.2±1.8(2)	1.0±1.0(3)
24h	PV	3.6±2.9(5)	3.4±3.5(4)	6.6±13.1(3)	8.0±10.4(4)
	PG	0.6±1.3(1)	0.2±0.5(1)	0.6±1.3(1)	2.2±2.7(3)
	PCS	0.6±0.9(2)	1.6±1.7(3)	0.8±1.1(2)	2.0±1.1(5)
48h	PV	4.2±5.2(3)	2.6±3.8(3)	1.0±1.7(2)	12.2±13.8(4)
	PG	0.4±0.9(1)	0.2±0.5(1)	0(0)	3.20±3.1(4)*
	PCS	1.2±1.3(3)	1.2±1.8(2)	4.6±3.1(5)	7.0±6.9 (4)

\* - Diferença estatisticamente significante em relação aos respectivos controles, em 5%, pelo teste "t" de Student.

Tabela 3- Média e desvio padrão do número de *C. albicans* aderidas às papilas linguais de ratos dos grupos norm., norm./tet, xerost. e xerost./tet (60 campos por animal). Entre parênteses está o número de ratos positivos (n=5).

Período	norm.	norm./tet	xerost.	xerost./tet
5min.	533.80±404.57(5)	191.20±115.(5)*	3009.20±1218.78(5)	873.40±1134(5)*
15min.	155.40±69.07(5)	16.00±13.40(4)*	1186.00±240.78(5)	743.40±815.97(5)*
30min.	114.20±37.28(5)	10.80±14.27(4)*	388.40±178.94(5)	122.40±73.60(5)*
60min.	2.00±2.82(4)	0.80±0.84(3)	167.80±92.48(5)	98.60±72.15(5)
4h	2.00±2.00(3)	7.20±5.45 (5)	8.00±4.36(5)	27.40±17.09(5)
12h	0.80±0.83(3)	3.00±2.91(4)	6.60±1.14(5)	3.00±2.55(5)
24h	4.80±3.63(5)	5.20±5.17(5)	8.00±14.05(4)	12.40±13.63(5)
48h	5.80±6.30(3)	4.00±6.67(4)	5.60±3.20(3)	22.40±23.80(5)

\* - Valores estatisticamente significantes a nível de 5% através do teste "t" de Student em relação aos respectivos controles.

Nos animais normais, a presença de *Candida* na forma de micélio foi observada em apenas um rato no período de 48h. A xerostomia facilitou discretamente o desenvolvimento de candidose, enquanto que a tetraciclina teve efeito mais pronunciado, com resultados semelhantes nos animais normais e xerostômicos. Apenas no período de 48 horas, os ratos do grupo xerost./tet tiveram valores significativamente maiores que os do grupo norm./tet (Tab.4). Histologicamente observou-se após 24h intensa infiltração da queratina por *Candida*, com hiperqueratose, acantose e aplainamento das papilas linguais. Após 48h, as áreas de candidose apresentam intenso infiltrado inflamatório, com a formação de microabscessos intraepiteliais.

A recuperação de *Candida* da boca dos ratos foi feita nos períodos de 4, 12, 24 e 48h., visto que nos períodos anteriores este procedimento poderia influir no processo de aderência da levedura. Dos animais do grupo norm. foi recuperado  $1.35 \times 10^4$  após 4h, diminuindo para 0.24 e 0.008 nos períodos de 12 e 24h respectivamente e aumentando para 0.09 após 48h. Os ratos do grupo xerost. tiveram uma dinâmica de diminuição e aumento de leveduras semelhante, mas com valores cerca de 5 vezes maiores. O tratamento com tetraciclina aumentou a quantidade de leveduras recuperadas tanto nos animais normais quanto nos xerostômicos. Deve-se ressaltar que em todos os grupos houve significativo aumento do número de leveduras no período de 48h em relação ao de 24h. Particularmente no grupo xerost./tet que teve os valores mais altos nos períodos de 48h, o aumento de ufc/ml recuperada foi acompanhado do aumento do número de áreas de candidose e partículas de *C. albicans* aderidas (Tab. 5).

Tabela 4- Média e desvio padrão do número de campos positivos para candidose em 60 campos da superfície da língua de ratos dos grupos norm., norm./tet, xerost. e xerost./tet. Entre parênteses está o número de animais positivos (n=5).

Período (horas)	norm.	norm./tet	xerost.	xerost./tet
4	0	3.4±6.54(2)*	0.2±0.45(1)	2.8±4.60(4)*
12	0	14.2±17.18(3)*	7.4±10.85(2)	3.8±5.76(2)
24	0	14.6±15.67(4)*	0.2±0.45(1)	16.8±4.76(5)*
48	0.2±0.45(1)	18.8±13.27(5)*	1.0±2.23(1)	49.4±14.69(5)*

\* - Valores estatisticamente significantes a nível de 5% através do teste "t" de Student em relação aos respectivos controles.

Tabela 5 - Média e desvio padrão de ufc/ml ( $\times 10^4$ ) de *C. albicans* recuperada da cavidade bucal de ratos norm., norm./tet, xerost. e xerost./tet (n=5).

Período(h)	norm.	norm./tet	xerost.	xerost./tet
4	1.35 $\pm$ 1.27	23.60 $\pm$ 19.34*	5.37 $\pm$ 3.82	23.20 $\pm$ 10.20*
12	0.24 $\pm$ 0.13	1.05 $\pm$ 0.85*	1.47 $\pm$ 1.24	2.30 $\pm$ 2.50*
24	0.008 $\pm$ 0.005	2.64 $\pm$ 3.68*	0.03 $\pm$ 0.04	3.50 $\pm$ 5.60*
48	0.09 $\pm$ 0.07	16.59 $\pm$ 24.52*	1.06 $\pm$ 1.44	75.20 $\pm$ 78.90*

\* - Valores estatisticamente significantes a nível de 5% através do teste "t" de Student em relação aos respectivos controles.

Os resultados obtidos do número de leveduras aderidas, o número de campos microscópicos positivos para candidose e o número de ufc/ml de *Candida* recuperado da cavidade bucal de cada animal são mostrados nas tabelas 6 e 7. A tabela 6 compara os resultados encontrados nos ratos dos grupos norm. e norm./tet e a tabela 7, os resultados encontrados nos animais dos grupos xerost. e xerost./tet. Estes dados mostram melhor a variabilidade individual dos resultados e a dificuldade de relacionar *Candida* aderida; recuperada e candidose.

Tabela 6 – Correlação entre o número de ufc/ml de *Candida*, leveduras aderidas e áreas de candidose nas papilas da língua de ratos dos grupos norm. e norm./tetraciclina, nos períodos de 5, 15, 30, 60 min., 4, 12, 24 e 48h após a inoculação da suspensão de *Candida*, (PCS = papilas cônicas; PV = papilas verdadeiras e PG = papilas gigantes) (n=5).

Período	norm.						Ufc/ml (x10 <sup>4</sup> )	norm./tet						Ufc/ml (x10 <sup>4</sup> )
	<i>Candida</i> aderida			Candidose				<i>Candida</i> aderida			Candidose			
	PCS	PV	PG	PCS	PV	PG		PCS	PV	PG	PCS	PV	PG	
5min.														
Rato 1	30	60	22	0	0	0	-	1	82	37	0	0	0	-
2	45	155	39	0	0	0	-	2	297	18	0	0	0	-
3	14	450	81	0	0	0	-	2	82	6	0	0	0	-
4	41	485	95	0	0	0	-	6	300	12	0	0	0	-
5	59	911	182	0	0	0	-	29	76	6	0	0	0	-
15min														
Rato 1	2	125	9	0	0	0	-	1	11	1	0	0	0	-
2	23	158	52	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
3	34	162	20	0	0	0	-	1	6	1	0	0	0	-
4	17	50	24	0	0	0	-	1	30	2	0	0	0	-
5	10	49	24	0	0	0	-	2	22	2	0	0	0	-
30min														
Rato 1	9	81	2	0	0	0	-	1	3	1	0	0	0	-
2	20	88	16	0	0	0	-	6	4	2	0	0	0	-
3	14	115	37	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
4	32	73	17	0	0	0	-	0	2	0	0	0	0	-
5	12	45	10	0	0	0	-	1	33	1	0	0	0	-
60min														
Rato 1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
2	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	-
3	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
4	0	7	0	0	0	0	-	0	2	0	0	0	0	-
5	0	1	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0	0	-
4h														
Rato 1	0	0	0	0	0	0	0.38	1	20	2	0	0	0	51.7
2	1	1	0	0	0	0	1.14	33	90	37	1	11	3	22.5
3	0	0	0	0	0	0	0.83	0	248	108	0	0	0	31.5
4	1	3	0	0	0	0	3.58	2	5	2	0	2	0	9.8
5	0	4	0	0	0	0	0.84	0	2	1	0	0	0	2.30
12h														
Rato 1	0	1	0	0	0	0	4.58	0	6	1	0	0	0	1.18
2	1	1	0	0	0	0	0.20	0	0	1	0	13	0	0.40
3	0	0	0	0	0	0	0.53	0	0	0	2	20	20	0.64
4	0	1	0	0	0	0	0.12	1	3	1	0	14	2	2.47
5	0	0	0	0	0	0	0.12	2	0	0	0	0	0	0.57
24h														
Rato 1	0	1	0	0	0	0	0.003	4	9	1	2	2	0	9.08
2	0	1	0	0	0	0	0.017	0	4	0	0	6	0	0.16
3	0	4	3	0	0	0	0.0079	2	0	0	2	16	11	0.50
4	1	8	0	0	0	0	0.0046	2	3	0	0	14	20	1.93
5	2	4	0	0	0	0	0.0055	0	1	0	0	0	0	1.52
48h														
Rato 1	2	2	0	0	0	0	0.21	0	0	0	6	6	5	5.32
2	1	12	0	0	0	0	0.046	4	0	0	10	0	3	3.04
3	0	0	0	0	0	0	0.057	2	3	1	7	6	0	2.36
4	0	0	0	1	0	0	0.11	0	9	0	2	20	20	7.76
5	3	7	2	0	0	0	0.044	0	1	0	6	0	3	1.85

Tabela 7 – Correlação entre o número de ufc/ml de *Candida*, leveduras aderidas e áreas de candidose nas papilas da língua dos ratos dos grupos xerost. e xerost./tet, nos períodos de 5, 15, 30, 60 min., 4, 12, 24 e 48h após a inoculação *Candida*, (PCS= papilas cônicas; PV= papilas verdadeiras e PG= papilas gigantes) (n=5).

Período	xerost.						ufc/ml (x10 <sup>4</sup> )	xerost./tet						ufc/ml (x10 <sup>4</sup> )
	<i>Candida</i> aderida			Candidose				<i>Candida</i> aderida			Candidose			
	PCS	PV	PG	PCS	PV	PG		PCS	PV	PG	PCS	PV	PG	
5min.														
Rato 1	92	1092	342	0	0	0	-	133	2060	665	0	0	0	-
2	784	1222	298	0	0	0	-	2	109	59	0	0	0	-
3	323	2857	1204	0	0	0	-	35	434	252	0	0	0	-
4	1022	1222	1703	0	0	0	-	140	231	98	0	0	0	-
5	551	2058	546	0	0	0	-	51	62	36	0	0	0	-
15min														
Rato 1	569	696	223	0	0	0	-	7	33	14	0	0	0	-
2	174	732	268	0	0	0	-	1	115	31	0	0	0	-
3	155	872	122	0	0	0	-	10	81	16	0	0	0	-
4	204	854	288	0	0	0	-	10	59	16	0	0	0	-
5	269	380	179	0	0	0	-	0	157	62	0	0	0	-
30min														
Rato 1	49	85	3	0	0	0	-	23	89	27	0	0	0	-
2	20	356	47	0	0	0	-	2	62	5	0	0	0	-
3	103	254	27	0	0	0	-	0	37	12	0	0	0	-
4	32	428	179	0	0	0	-	8	4	23	0	0	0	-
5	53	252	54	0	0	0	-	25	104	8	0	0	0	-
60min														
Rato 1	42	55	35	0	0	0	-	47	1980	45	0	0	0	-
2	18	11	2	0	0	0	-	20	250	34	0	0	0	-
3	56	150	49	0	0	0	-	64	414	67	0	0	0	-
4	15	120	37	0	0	0	-	30	103	11	0	0	0	-
5	32	163	54	0	0	0	-	53	487	112	0	0	0	-
4h														
Rato 1	2	2	0	0	0	0	7.84	6	13	5	1	0	0	33.0
2	0	3	2	0	0	0	2.64	0	23	4	0	0	1	15.4
3	1	12	2	0	0	0	13.60	2	3	0	1	0	0	10.9
4	4	3	0	0	0	0	9.16	6	39	8	7	4	0	33.2
5	3	6	0	1	0	0	7.11	1	20	7	0	0	0	23.3
12h														
Rato 1	2	2	1	0	0	0	0.97	2	1	1	11	1	1	6.41
2	4	3	0	18	5	1	1.61	0	1	0	0	0	0	2.71
3	0	3	4	0	0	0	0.19	0	2	3	0	0	0	2.01
4	0	6	0	0	0	0	12.6	2	5	5	3	2	1	0.24
5	0	6	2	11	2	0	3.12	1	0	0	0	0	0	0.64
24h														
Rato 1	2	0	0	0	0	0	0.089	2	1	0	5	7	1	0.92
2	0	30	3	0	0	0	0.044	1	0	0	7	2	3	1.26
3	0	1	0	0	0	0	0.030	3	11	1	3	19	2	13.5
4	0	0	0	0	0	0	0.39	4	25	6	5	2	10	0.80
5	2	2	0	1	0	0	0.15	2	3	4	9	9	10	1.09
48h														
Rato 1	2	1	0	0	0	0	0.59	5	7	0	12	20	10	3.68
2	4	4	0	2	2	1	3.56	18	17	1	20	5	3	78.0
3	3	0	0	0	0	0	0.030	0	0	4	19	20	20	92.2
4	4	0	0	0	0	0	0.24	9	3	3	19	20	20	5.92
5	10	0	0	0	0	0	0.62	3	34	8	20	20	20	1.96

## Figuras

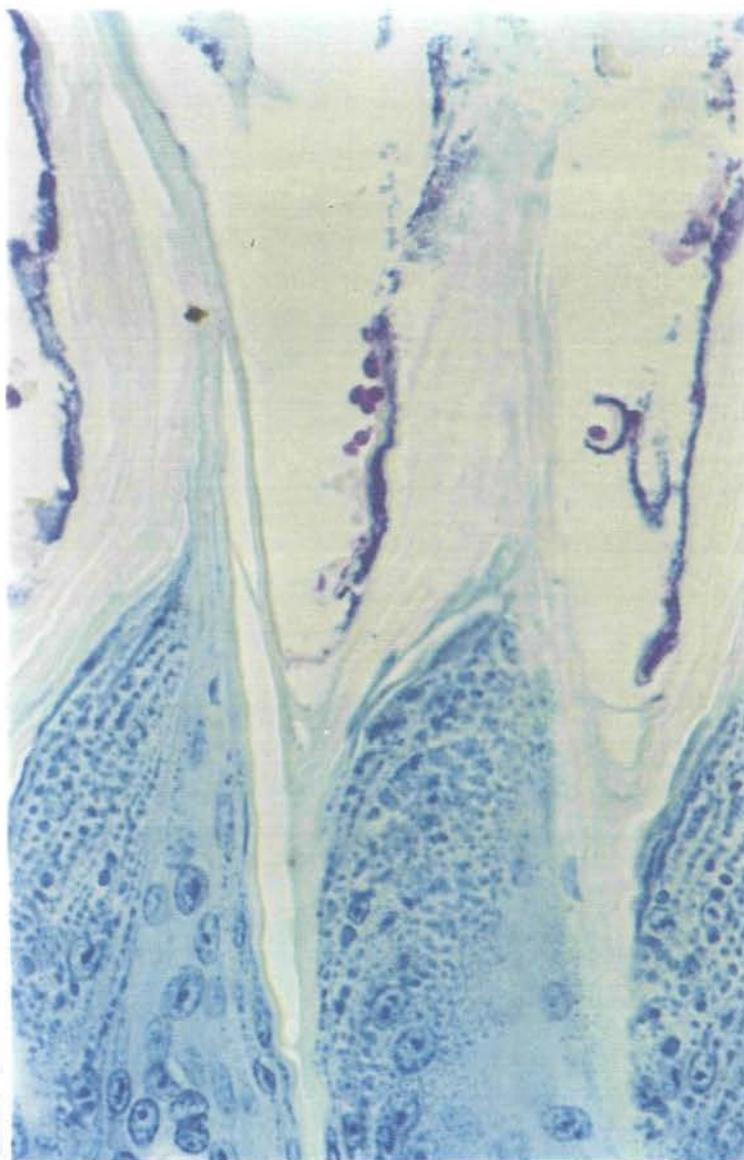
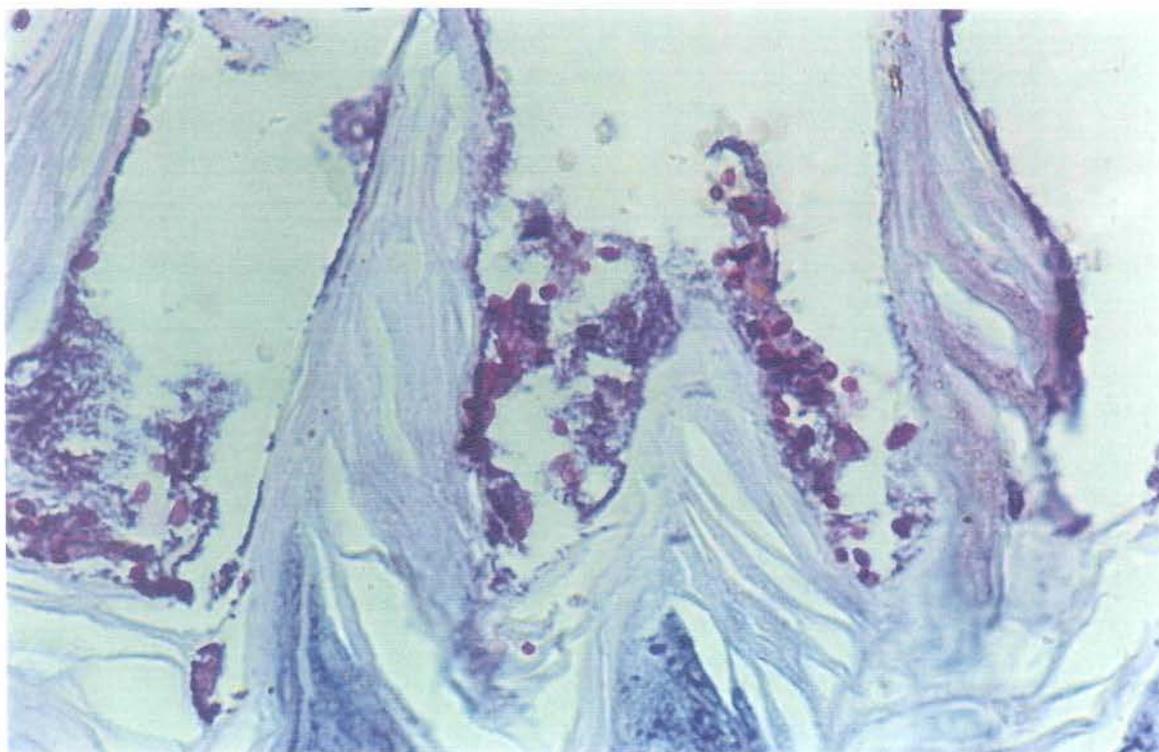
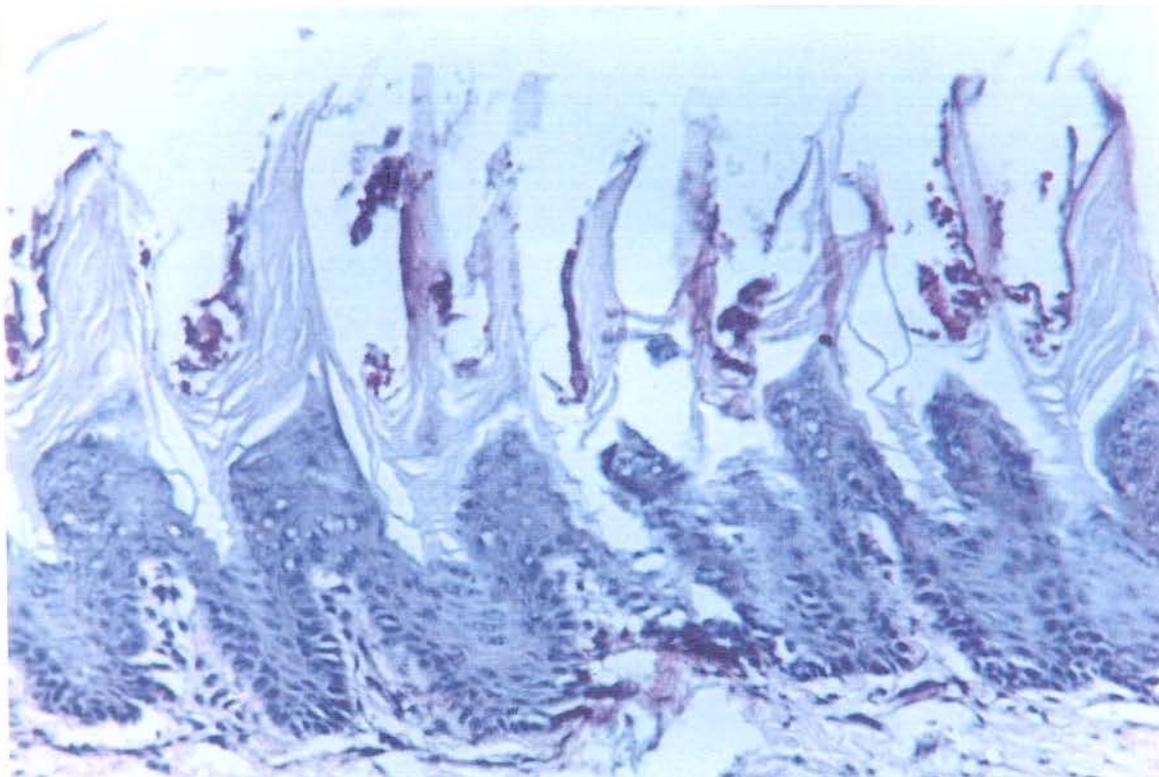


Fig. 1- Corte histológico da superfície da língua de rato normal (norm.), 15 min. após a inoculação de *C. albicans*. A aderência da levedura ocorre sobre a placa bacteriana (seta), localizada na "queratina mole da face convexa das papilas verdadeiras (800X - PAS-H).



**Fig. 2-** Aderência de *C. albicans* na superfície das papilas verdadeiras, 15 min. após a inoculação em rato xerostômico. Acúmulo de placa bacteriana pode ser observado nas 2 faces das papilas e nos espaços interpapilares (seta). A aderência de *Candida* ocorre na placa bacteriana presente principalmente na "queratina mole" da face convexa das papilas (800X, PAS-H).

**Fig. 3-** Figura 2 em maior detalhe, mostrando a aderência da *C. albicans* (seta) sobre a placa bacteriana das papilas verdadeiras. (2000X - PAS-H).

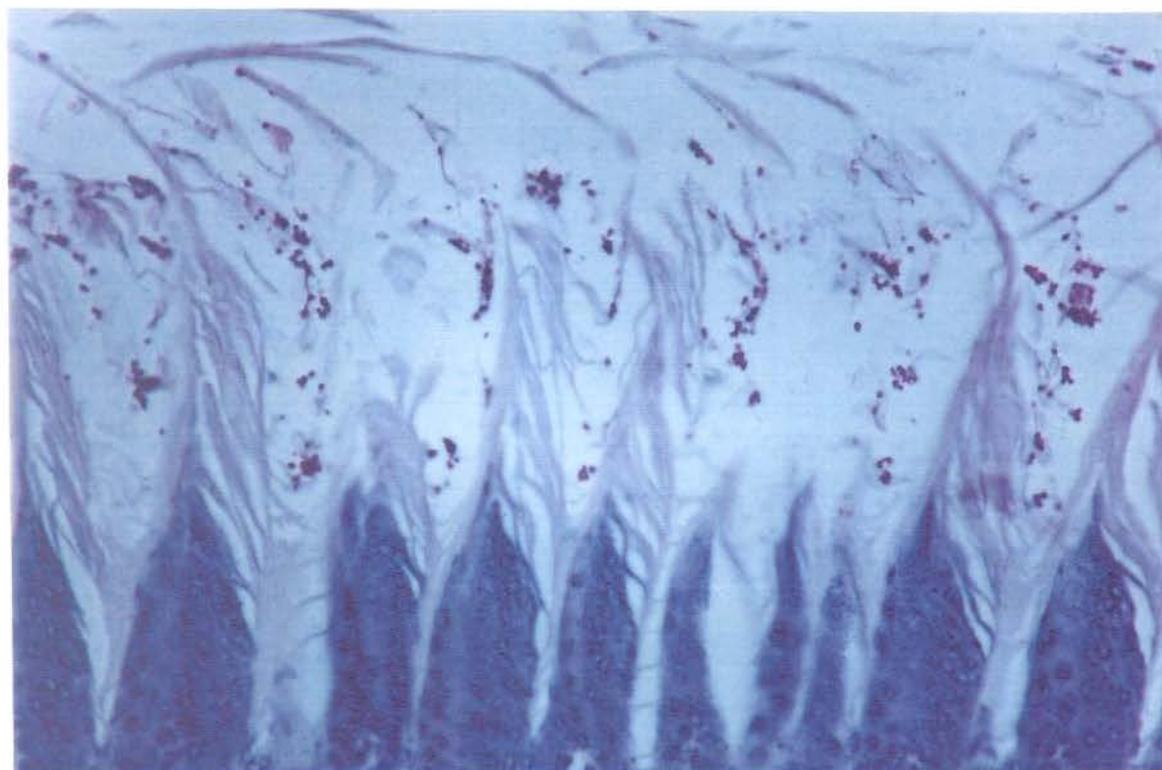
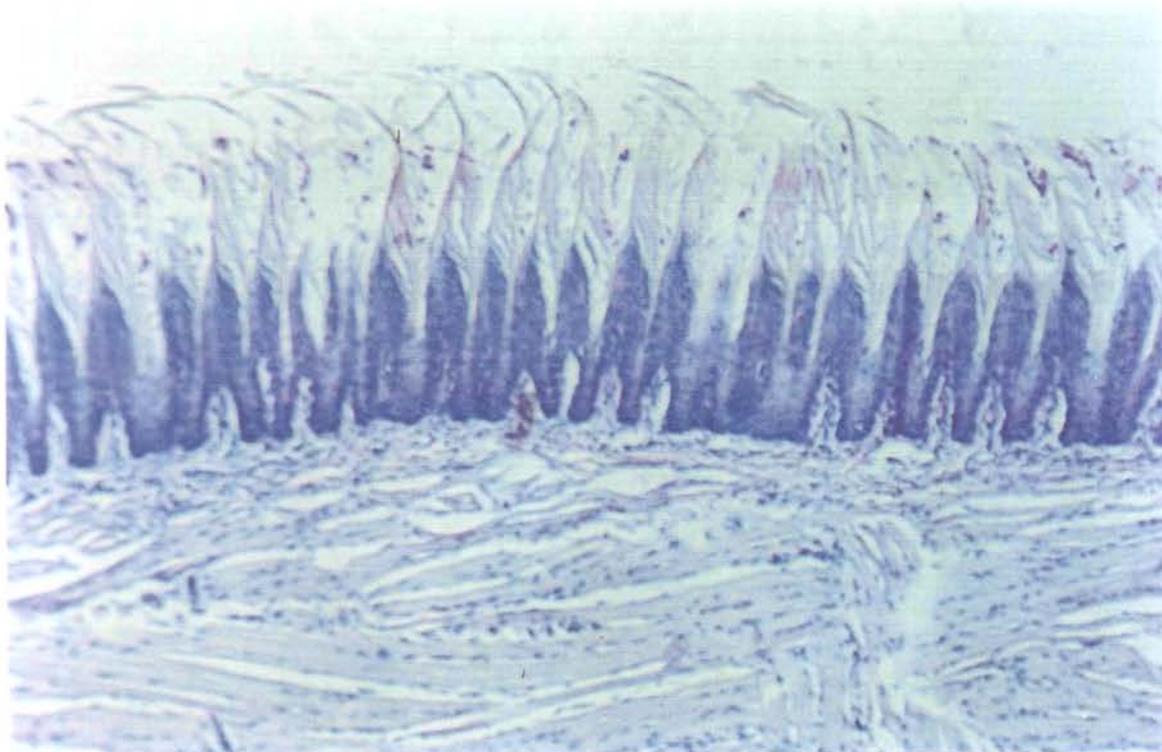
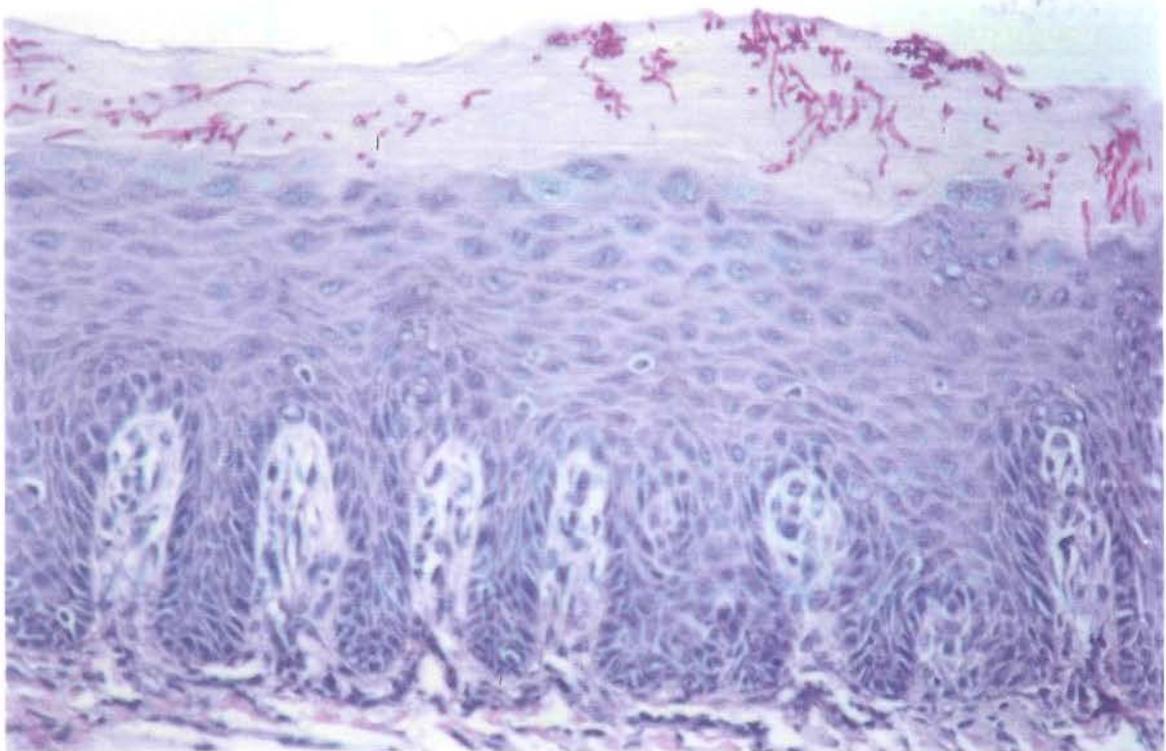
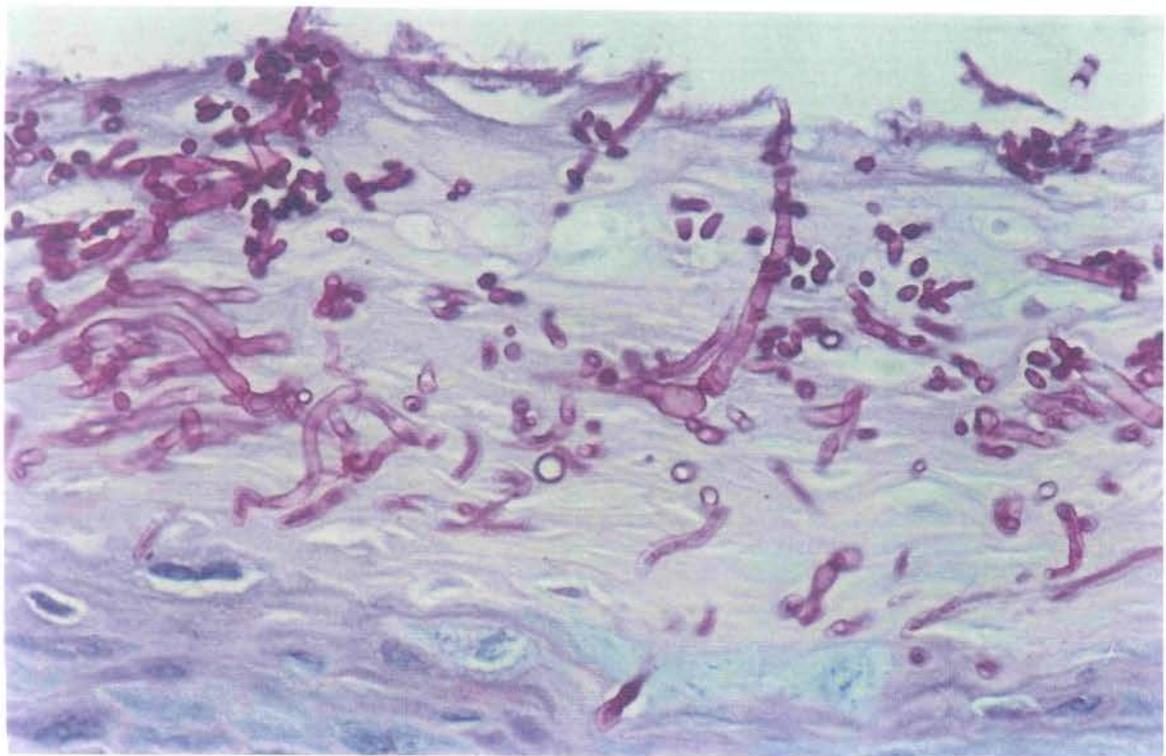


Fig. 4- Superfície da língua de rato xerost/tet, 5 min. após a inoculação da *Candida*. Observa-se ausência da placa bacteriana na superfície das papilas (seta). As papilas estão alongadas, com descamação da queratina (315X - PAS-H).

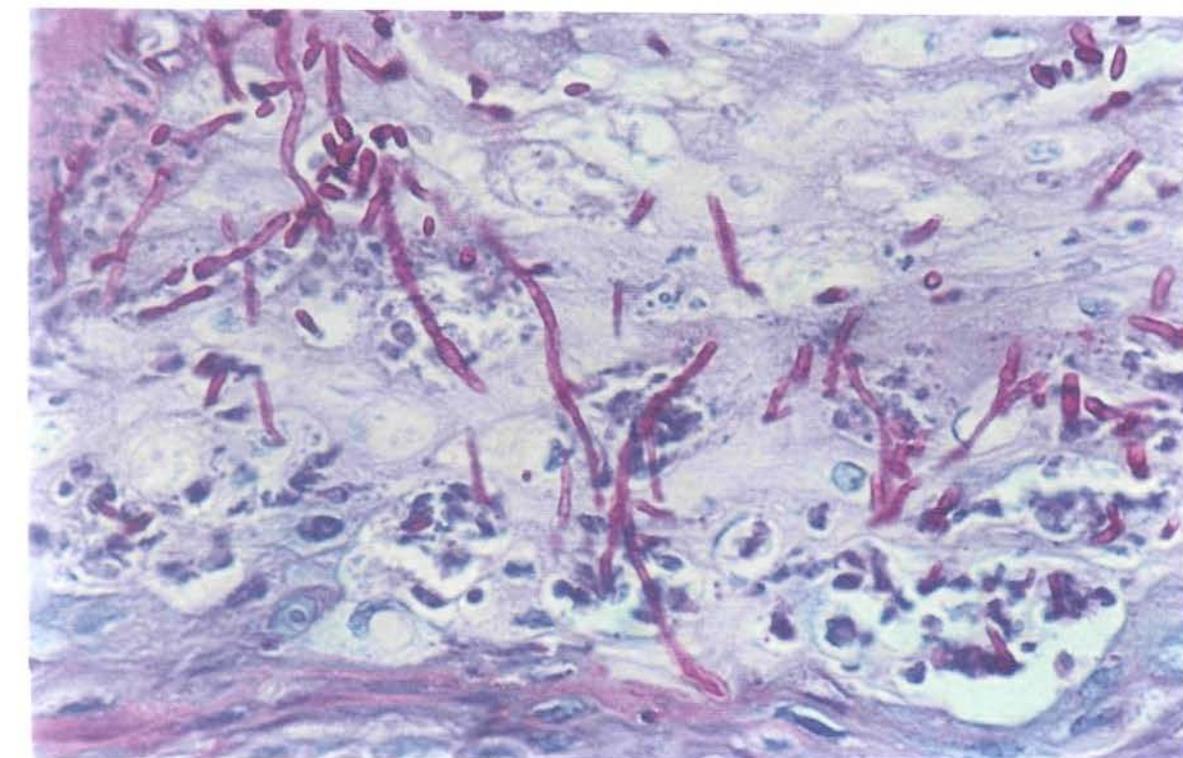
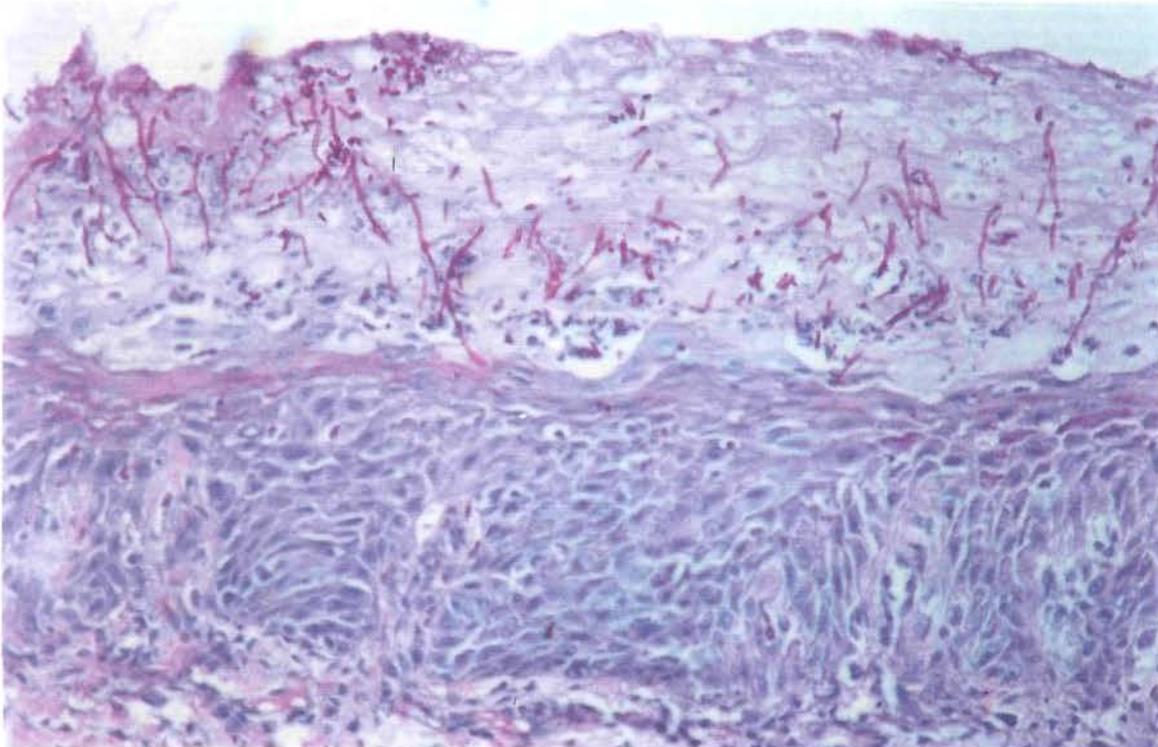
Fig 5- Maior aumento da figura anterior, mostrando ausência da placa bacteriana e leveduras, a maioria aparentemente solta (seta) (800X - PAS-H).



**Fig 6-** Candidose na língua de rato xerost/tet, 24h após a inoculação da levedura. Presença de numerosas hifas mostrando infiltração na queratina (seta) da região das papilas verdadeiras e leveduras mais superficialmente. O epitélio apresenta acantose e hiperqueratose (asterisco) (800X - PAS-H).



**Fig 7.** Maior aumento da figura 6, onde observa-se hifas da *C. albicans* apresentando vários brotamentos (seta) (2000X - PAS-H).



**Fig. 8-** Candidose na língua de rato norm/tet, na região das papilas verdadeiras, 48h após a inoculação da levedura. Numerosas hifas na queratina, com infiltração perpendicular ao epitélio (seta). Intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear, com formação de microabscessos intraepiteliais pode ser observado (cabeça de seta). O epitélio da região encontra-se displásico, com acantose e hiperqueratose (asterisco) (800X - PAS-H).

**Fig. 9 -** Maior aumento da figura anterior, mostrando a intensa presença de hifa de *C. albicans* (seta) e microabscessos intraepiteliais (cabeça de seta) (2000X - PAS-H) .

## Discussão

## Discussão

Os resultados deste trabalho confirmaram que a xerostomia facilita o desenvolvimento de candidose em ratos (MEITNER et al., 1990; JORGE et al., 1993, TOTTI, 1994). Considera-se que nos animais com hipossalivação a diminuição da remoção mecânica das partículas de *Candida* pela saliva seja o mecanismo facilitador mais importante para a implantação do fungo (JORGE, 1993, 1997). Em humanos a xerostomia causada por substâncias químicas ou por alterações glandulares como na radioterapia tem efeitos semelhantes (BROWN et al., 1975; EPSTEIN & SCULLY, 1992;). O tratamento com tetraciclina aumentou de forma acentuada a candidose tanto em animais normais quanto em xerostômicos. A tetraciclina é um antibiótico de largo espectro, alterando a microbiota bucal proporcionado maior crescimento de fungos como *Candida albicans* (RUSSEL et al., 1973). A ação da tetraciclina pode ser confirmada microscopicamente, pois a placa bacteriana presente na queratina "mole" das papilas linguais foi praticamente eliminada nos animais tratados com tetraciclina. O uso de tetraciclina é freqüente na indução de candidose em ratos (RUSSEL et al., 1976; FISHER et al., 1982; SHAKIR et al., 1986), entretanto ALLEN et al. (1985) não encontraram correlação positiva entre o uso de tetraciclina e maior incidência de candidose bucal. Outros fatores podem facilitar o desenvolvimento de candidose, como

imudepressão e diabetes mellitus (KNIGHT & FLETCHER, 1971; QUIRINO et al., 1994; GREENSPAN, 1994). Ratos recém nascidos desenvolvem candidose mais facilmente, como descrito por BYKOV (1991), com formação de tubo germinativo e invasão epitelial após 2h da inoculação. Enzimas como fosfatases, proteinases, hialuronidase e condroitin sulfatase produzidas por *C. albicans*, favorecem a penetração da levedura nos tecidos (DOUGLAS, 1987; SHIMIZU et al., 1996), não sendo conhecido se antibióticos como a tetraciclina interferem na produção destas enzimas.

Assim como na candidose, a xerostomia e principalmente o tratamento com tetraciclina aumentaram a quantidade de *Candida* recuperada da boca de rato em todos os períodos analisados. Nos animais normais e xerostômicos houve diminuição gradativa até o período de 24h, e aumento após 48h. Nos ratos tratados com tetraciclina o número de ufc/ml recuperado após 4h foi de  $23 \times 10^4$  com profunda diminuição no período de 12h. Diferentemente dos normais e xerostômicos, nos animais que receberam tetraciclina, houve tendência de aumento após 24h, sendo mais evidente no período de 48h.

Pode-se considerar que a diminuição gradativa indica simplesmente a eliminação mecânica das partículas de *Candida* pela saliva, o que é facilmente compreendido na xerostomia, mas não explica os resultados com tetraciclina. Os valores mais altos observados com a tetraciclina provavelmente refletem a maior proliferação de *Candida* na saliva, facilitada desde os períodos mais

precoces pelo desequilíbrio da microbiota bucal. É possível que a tetraciclina também diminua a eliminação de leveduras por outros mecanismos ainda não determinados. A reversão de diminuição para aumento de *Candida* também pode ser atribuída a proliferação de *Candida*, que pode agora estar diretamente relacionada à presença de candidose.

Além de receptores nas células epiteliais e saliva, a aderência da *C. albicans* em bactérias da microbiota bucal pode ser etapa importante no desenvolvimento da candidose. A aderência de *C. albicans* à superfície epitelial envolve múltiplos mecanismos como adesinas e forças hidrofóbicas, que podem ser modulados por vários fatores como pH, temperatura, antibioticoterapia, bactérias comensais, tipo de tecido, produção de enzimas e formação de tubo germinativo (DOUGLAS, 1987; BAILEY et al., 1995; ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 1998). Forças hidrofóbicas podem ser relevantes nas etapas iniciais da interação adesina-receptor, visto que são estabelecidas à distâncias maiores. De fato, *C. albicans* com forças hidrofóbicas mais fortes aderem-se mais às células epiteliais (HAZEN & HAZEN, 1988). A transformação de leveduras em hifas favorece a aderência pois está associada a alterações na expressão de adesinas e hidrofobicidade na superfície celular (WELLMER & BERNHARDT, 1997).

Os resultados deste trabalho mostram claramente que a aderência de partículas de *Candida* na superfície da língua de ratos é dependente da placa

bacteriana presente na queratina "mole" das papilas linguais, que atua como "ponte bacteriana" entre as leveduras e o epitélio (BAGG & SILVERWOOD, 1986; TOKONUGA et al., 1990). Pela metodologia usada não é possível determinar o grau de aderência, embora antes da fixação em formol, a língua tenha sido lavada em água para eliminação de partículas não aderidas. De acordo com MARRIE & COSTERTON (1981) a interação entre *Candida* e células epiteliais pode ser classificada em frouxa, mediada por matriz positiva para vermelho de rutênio, ou forte, entre fibrilas da superfície da *Candida* e interdigitações das células epiteliais. A parede da *C. albicans* é lisa, hidrofóbica, com 100-300nm de espessura, sendo formada por até 8 camadas distintas. Considera-se que a parede seja formada de 0.8-10% de proteínas e 70-97% de carboidratos. Manoproteínas ligadas a  $\beta$ -1-6 glucano, glicomanoproteínas fazem parte da parede externa, sendo antigênicas e possivelmente manose e as porções protéicas são as adesinas mais importantes. Manose é o açúcar principal, glicose e glicosaminas também estão presentes nas glicoproteínas da parede da *C. albicans*. Outras adesinas foram parcialmente caracterizadas, como lipídios e moléculas de fimbrias (LAW et al., 1997). De um modo geral a interação adesina-receptor pode ser por proteína-proteína, proteína-carboidrato, carboidrato-carboidrato.

Na mucosa bucal a *C. albicans* adere-se a receptores da superfície dos epitélios queratinizado e paraqueratinizado. Como no caso das adesinas, vários

receptores foram descritos nas células epiteliais, principalmente carboidratos de glicolípídeos e glicoproteínas como seqüência de açúcares encontrados em todos os grupos sanguíneos do sistema ABO(H) (BRASSART et al., 1991), glicosídeos (fucose e galactose) e glicoesfingolípídeo (YU et al., 1994).

O extrato córneo é formado de células ricas em queratina, embebidas em matriz rica em ceramidas, colesterol e ácidos graxos. A membrana celular é formada de lipídeos e proteínas, e *C. albicans* produz enzimas que desorganizam estas moléculas, facilitando a invasão. Na pele há película formada principalmente de lipídeos oriundas das glândulas sebáceas, e na boca por mucina e glicoproteínas das glândulas salivares. Moléculas destas secreções podem ser receptores importantes, como também podem ter propriedades anti-aderentes. O'SULLIVAN et al. (1997) descreveram proteínas ricas em prolina da saliva da parótida com propriedades de receptores para *C. albicans*. *C. albicans* também tem adesinas para vários peptídeos da matriz extracelular, laminina e fibronectina, e fibrinogênio que facilitam as infecções profundas e disseminadas (CRITCHLEY & DOUGLAS, 1987; YU et al., 1994; PENDRAK & KLOTZ, 1995; CAMERON & DOUGLAS, 1996).

As formas de interação com as bactérias provavelmente são mediadas por polissacarídeos, mas ainda não foram descritas as principais adesinas envolvidas. Sabe-se que diferentes tipos de bactérias têm maior ou menor afinidade para aderência de *Candida albicans*. *C. albicans* tem afinidade por

diversas espécies de estreptococos orais, em particular a *S. gordonii*, mas também a *S. orallis* e *S. sanguis*, mas não a *S. mutans* e *S. salivarius* (HOLMES et al., 1995). Espécies como *E. coli* e *K. aerogenes* favorecem a aderência de *Candida* (SCOTT et al., 1985), e ratos por serem coprófagos apresentam grande número de enterobactérias na cavidade bucal; portanto a placa das papilas pode ser formada por estas bactérias. Nos animais xerostômicos que apresentaram maior quantidade de placa bacteriana, o número de partículas de *Candida* aderidas também foi maior. O tratamento com tetraciclina teve efeito oposto, ou seja diminuiu a quantidade de placa e também de *Candida* aderida. Em todos os grupos valores mais altos foram observados no período de 5min, com diminuição gradativa até 1h, quando número pequeno de partículas foi observado.

Nos períodos subsequentes o número de *Candida* aderida continuou baixo. Nas áreas de candidose, caracterizadas por hifas intraepiteliais, praticamente não observou-se leveduras na superfície epitelial. É provável que as leveduras formadas na candidose se transformem rapidamente em hifas, ou sejam lançadas na saliva ao invés de ficarem na superfície do epitélio.

Em resumo, a xerostomia aumentou a quantidade de bactérias, *Candida* aderida, candidose e de ufc/ml recuperadas. O tratamento com tetraciclina aumentou candidose e ufc/ml recuperadas, mas diminuiu bactérias e *Candida* aderidas. Há relação direta entre quantidade de leveduras que permanecem na

boca por tempo mais prolongado, seja por diminuição da remoção e/ou aumento da proliferação e candidose. Entretanto não houve correlação entre *Candida* aderida e candidose. Algumas hipóteses podem ser consideradas para entender este paradoxo. Células não viáveis também podem aderir, e segundo GORMAN et al. (1996), as não viáveis têm maior capacidade de aderência do que as viáveis às células epiteliais de boca *in vitro*, ocupando receptores das viáveis, com potencial de formarem hifas. A maior parte das leveduras aderidas durante os primeiros 15 a 30 min. após a inoculação são rapidamente removidas, e as áreas de candidose se desenvolvem a partir de pequeno número de leveduras que permanecem aderidas em áreas a serem melhor determinadas. Estes dados estão de acordo com SANDIN (1987) que postulou que a aderência de *C. albicans* ocorre em duas etapas, durante os primeiros 20 min. há associação inespecífica, seguida por interação específica envolvendo adesinas.

Sabe-se que *in vitro* o número de leveduras aderidas às células epiteliais aumenta em função do tempo até um período de 2h (KIMURA & PEARSAL, 1988), ao invés de diminuir. Nestas condições as leveduras estão sempre em contato com as células epiteliais, e não há mecanismos que dificultem ou desfaçam a aderência.

A tetraciclina pode atuar diretamente sobre as leveduras ou superfície das células epiteliais dificultando a aderência, mas estes efeitos diminuem

rapidamente, visto que depois de 24h da interrupção do tratamento observa-se a neoformação de placa bacteriana nas papilas linguais. Sabe-se que tratamento com agentes antimicrobianos como clorhexidina e cetilperidínio reduz a aderência de *C. albicans* às células epiteliais (JONES et al. 1995). A placa bacteriana das papilas linguais facilita a aderência, mas poderia servir de barreira para a formação de hifas intraepiteliais. De acordo com KENNEDY & VOLTZ (1985), as bactérias podem bloquear sítios específicos de aderência de *C. albicans* nas células epiteliais, importantes para o desenvolvimento da candidose. Sem dúvida é relevante o desenvolvimento de metodologia para caracterizar melhor o processo de aderência e se possível determinar os fatores que determinam a formação de hifas no epitélio.

## Conclusões

## Conclusões

- 1 A aderência de *C. albicans* no dorso da língua de ratos ocorre principalmente na “queratina mole” das papilas verdadeiras.
- 2 As bactérias que formam uma placa sobre as papilas linguais de rato são os principais sítios de aderência de *C. albicans*, servindo de ponte entre a célula epitelial e a levedura.
- 3 A xerostomia facilitou a aderência de *C. albicans*, aumentou a quantidade de candidose e o número de leveduras recuperado da cavidade bucal dos ratos
- 4 O tratamento com tetraciclina diminuiu a aderência, mas aumentou a candidose e a recuperação de *C. albicans*.
- 5 Em todos os grupos estudados, normal e xerostômico, com ou sem tratamento com tetraciclina, houve diminuição gradativa da recuperação de *C. albicans* até 24h, aumentando no período de 48h.

## **Resumo**

A candidose é a micose mais comum da boca, estando associada a fatores predisponentes locais ou sistêmicos. Neste estudo verificamos o desenvolvimento de candidose em ratos portadores de carcinoma de língua. É controvertido na literatura a ocorrência e a relevância da infecção por *Candida* em lesões bucais como liquen plano, leucoplasias e carcinomas espinos celulares. De acordo com alguns trabalhos, a maior presença de *Candida* em leucoplasias está associada a maior severidade de displasias epiteliais (RENSTRUP, 1970; JONES & RUSSEL., 1973; ZHANG et al., 1994). Ratos normais e sialoadenectomizados foram pincelados com 4NQO por 4 meses e posteriormente acompanhados até o desenvolvimento de carcinoma de língua. Suspensão de *C. albicans* foi então inoculada na boca de ratos normais e portadores de carcinoma e a ocorrência de candidose verificada histologicamente após 24 e 48h. Nos mesmos períodos, leveduras foram recuperadas da boca de todos os animais e os dados foram expressos em ufc/ml. A sialoadenectomia aumentou a quantidade de leveduras recuperadas, assim como o número de áreas de candidose. Os animais portadores de carcinoma de língua tiveram maior quantidade de leveduras na boca e de áreas de candidose, em relação aos respectivos controles. Nos animais com carcinoma, as candidoses ocorreram principalmente nas áreas de hiperqueratose, sendo pouco frequentes nas regiões de carcinoma francamente invasivos. Concluiu-se que lesões hiperqueratóticas da boca são mais susceptíveis à infecção por *C. albicans* em relação ao epitélio normal, mas o papel no desenvolvimento de displasias epiteliais precisa ser melhor determinado. Num estudo paralelo ao acima descrito verificou-se a aderência de *C. albicans*, a permanência e o desenvolvimento de candidose na boca de ratos. A aderência de microrganismos

é considerada etapa fundamental para o desenvolvimento de infecções. Os estudos de aderência de *Candida* são feitos *in vitro*, não havendo na literatura relatos da aderência *in vivo*. Ratos normais ou sialoadenectomizados, tratados ou não com tetraciclina foram inoculados na boca com suspensão de *C. albicans* e a aderência das leveduras no dorso da língua e o desenvolvimento de candidose foram avaliados histologicamente após 5, 15, 30, 60 min., e 4, 12, 24 e 48h. Também foi feita a recuperação da levedura presentes na boca nos períodos de 4 a 48h.. Os resultados mostraram que a aderência de *C. albicans* ocorre principalmente na queratina mole das papilas verdadeiras, sobre a placa bacteriana presente nesta área. A xerostomia aumentou a quantidade de placa bacteriana nas papilas linguais e facilitou a aderência da *C. albicans*, assim como o desenvolvimento de candidose, aumentando também o número de leveduras recuperadas. O tratamento com tetraciclina diminuiu a aderência de *Candida*, mas aumentou a recuperação de *C. albicans* e o desenvolvimento de candidose. Concluiu-se que a aderência de *C. albicans* ocorre principalmente através de bactérias e que o desenvolvimento de candidose está associado a maior quantidade de leveduras presentes na boca, que no caso deste trabalho ocorreu pela xerostomia e/ou antibioticoterapia. Outros estudos são necessários para se determinar quais são os mecanismos envolvidos numa aderência transitória ou que caminhe para a formação de candidose.

## Summary

## Summary

Candidosis is the most common fungal infection in the oral cavity, usually associated with local and systemic predisposing factors. In this study we verified the development of candidiasis in the tongue of rats with carcinomas provoked by 4NQO. The occurrence and relevance of candidal infection in oral lesions such as lichen planus, leukoplakias and carcinomas are still to be understood. It is interesting that according to some works, the prevalence of *Candida* in leukoplakia is associated with more severe epithelial displasia (RENSTRUP, 1970; JONES & RUSSEL, 1973; ZHANG et al., 1994). Normal and sialoadenectomized mice were painted with 4NQO during 4 months and thereafter they were observed until the development of carcinomas in the tongue, when they were inoculated in the mouth with a suspension of *C. albicans*. The development of candidosis was verified histologically after 24 and 48h. Yeasts were recovered from the oral cavity of all rats and the results were expressed in ufc/ml. Sialoadenectomy alone increased the number of yeasts recovered from the mouth and of areas with candidosis. Rats, normal and sialoadenectomized, bearing carcinoma of the tongue had a higher number of yeasts in the mouth and of candidosis than the respective controls. Candidosis was observed mainly in areas with hiperqueratosis and was less frequente in regions of carcinoma. We concluded that hiperqueratotic lesions of the mouth are more susceptible to candidal infection than normal epithelium, but the role of *C. albicans* in the development of epithelial displasia must be better understood.

In a parallel study we verified the adherence of *C. albicans*, its recovery from saliva and the development of candidosis in the rat tongue. The adherence of microorganisms is considered a fundamental step in infection. Most of the studies about candidal adherence to epithelial cells are *in vitro* and there are no records about the mechanisms *in vivo*. In this study, normal and sialoadenectomized rats, treated or not with tetracycline received one oral inoculation of a suspension of *C. albicans* and the adherence of the yeasts and the development of candidosis were verified histologically after 5, 15, 30 and 60 min., and 4, 12, 24 and 48h. The results showed that the adherence of *C. albicans* occurred in the "soft"keratin of the true papillae of the tongue, and mainly on the bacterial plaque present on this area. Xerostomia caused an increase in bacterial plaque of the papillae and facilitated the adherence of *C. albicans* and the development of candidosis. The treatment with tetracycline decreased bacterial plaque and the adherence of *Candida* to epithelial cells, but increased the number of yeasts recovered from the mouth of rats and the number of areas of candidosis. We concluded that the adherence of *C. albicans* occurs mainly on the bacterial plaque of the papillae and that the development of candidosis is related to an increased number of yeasts present in the mouths of rats, caused in this study by xerostomia and/or antibiotic therapy.

## **Referências Bibliográficas**

## Referências Bibliográficas \*

- 1 ALLEN, C.M. Animal models of oral candidiasis: a review. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.78, p.216-21, 1994.
- 2 ALLEN, C.M. Diagnosing and managing oral candidiasis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.123, p.77-8, 1992.
- 3 ALLEN, C.M. et al. Resolution of candidal lesions of the dorsal rat tongue by ketoconazole. **J. Oral Pathol.**, v.17, p.158-63, 1988.
- 4 ALLEN, C.M. et al. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongue. **Infect. Immun.**, v.17, p.158-63, 1985.
- 5 ALLEN, C.M.; BECK, F.M. Differences in mucosal reaction related to *Candida albicans* isolates. **J. Oral Pathol.**, v.16, p.89-93, 1987.
- 6 ANTLEY, P.P.; HAZEN, K.C. Role of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. **Infect. Immun.**, v.56, p.2884-90, 1988.
- 7 ARENDORF, T.M., WALKER, D.M. *Candida albicans*: Its association with dentures, plaque and the oral mucosa. **J.Dent. Assoc. S. Afr.**, v.35, p.563-9, 1987.
- 8 ARENDORF, T.M., WALKER, D.M. Tobacco smoking and denture wearing as local aetiological factors in median rhomboid glossites. **Int. J. Oral Surg.**, v.13, p.411-5, 1984.

---

(\*) - Baseado em:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, Rio de Janeiro, Referências bibliográficas NBR 6023. Rio de Janeiro, 1989.19p.

Abreviaturas de periódicos de acordo com Index Dental Literature e Index Medicus.

- 9 ARENDORF, T.M., WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch. Oral Biol.**, v.25, p.1-10, 1980.
- 10 ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Oral candidal populations in health and disease. **Br. Dent. J.** v.147, p.276-72, 1979.
- 11 ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M.; KINGDON, R.J. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leukoplakia. **Br. Dent.**, v.155, p.340-43, 1983
- 12 ARONSON, I.K.; SOLTAMI, K. Chronic mucocutaneous candidosis: a review. **Mycopathologia**, v.60, p.17-25, 1976.
- 13 AXÉLL, T.; HOLMSTRUP, P.; KRAMER, I.R.H. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. **Commun. Dent. Oral Epidemiol.**, v.12, p. 145-154, 1984.
- 14 BAGG, & SILVERWOOD, Coaggregation reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. **J. Med. Microbiol.**, v.22, p.165-9, 1986.
- 15 BAILEY, A.; WADSWORTH, E.; CALDERONE, R. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells: host-induced protein synthesis and signaling events. **Infect. Immun.**, v.63, p.569-72, 1995.
- 16 BANÓCZ, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. **Commun. Dent. Oral Epidemiol.**, v.19, p.265-7, 1991.
- 17 BANÓCZ, J.; SUGAR, L. Longitudinal studies in oral leukoplakia. **J. Oral Pathol.**, v.1, p.265-72, 1972.
- 18 BARRET, A.W.; KINGSMILL, V.J.; SPEIGHT, P.M. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. **Oral Dis.**, v.4, p.26-31, 1998.

- 19 BARRET-BEE, K. et al. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J. Gen. Microbiol.**, v.131, p.1217-21, 1985.
- 19 BASTIAAN, R.J., READE, P.C. The prevalence of *Candida albicans* in the mouths of tobacco smokers with and without oral mucous membrane keratosis. **Oral Surg. Oral Med, Oral Pathol.**, v.53, p.148-51, 1982.
- 20 BENDOVA, O. The killer phenomenon in yeasts. **Folia Microbiol.**, v.31, p.422-33, 1986.
- 21 BERDICEVSKY, I. et al. Oral *Candida* in asymptomatic denture wearers. **Int. J. Oral Surg.**, v.9, p.113-5, 1980.
- 22 BERDICEVSKY, I. et al. Oral *Candida* in children. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.57, p.37-40, 1984.
- 23 BEVAN, E A., MAKOVER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proc. Intern. Congr. Genet.**, v.1, p.203, 1963.
- 24 BLANK, F., CHIN, O. JUST, G., MERANZE, D.R., SHIMKIN, M.B., WIEDER, R. Carcinogens from fungi pathogenic for man. **Cancer Res.**, v.28, p.2276-81, 1968.
- 25 BONNE, C. Sur la présence de papilomes sur les muqueuses d'animaux badigeonnés au goudron. **Comptes Rendus. Société de Biologie**, 93: 907, 1925. In: EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. **J. Oral Pathol.**, v.10, p.129-46, 1981.
- 26 BONNE, C. Über Geschwulste bei Teertieren. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 25: 1-22, 1927. In: EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. **J. Oral Pathol.**, v.10, p.29-46, 1981.

- 27 BOOTH, D.R. A relationship between intra-oral sites of 4-NQO reductase activity and chemical carcinogenesis. **Cell Tissue Kinet.**, v.23, p.331-40, 1990.
- 28 BORG, M., RÜCHEL, R. Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.28, p.3-13, 1990.
- 29 BORG, M.; RÜCHEL, R. Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.28, p.3-14, 1990.
- 30 BRASSART, D.; WOLTZ, A.GOLLIARD, M.; NESSER, J.R. In vitro inhibition of adherence of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha 1-2 beta bearing complex carbohydrates. **Infect. Immun.**, v.59, p.1605-13, 1991.
- 31 BROWN, L.; DREIZEN, S.; HANDLER, S.; JOHNSTON, D. A. Effect of radiation induced xerostomia on human oral microflora. **J. Dent. Res.**, v.54, p.740-50, 1975.
- 32 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeasts infections. **Acta Odontol. Scand.**, v.48, p.61-9, 1990.
- 33 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infection. **Acta Odontol. Scand.**, v.48, p.37, 1990.
- 34 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Immune response to *C. albicans* in monkeys with experimental candidiasis in the palate. **Scand. J. Dent. Res.**, v.81, p.360-71, 1973.
- 35 BUDTZ-JÖRGENSEN, E., STENDERUP, A., GRAABOWSKI, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v.3, p.1159, 1975.

- 36 BURFORD-MASON, A.P., WEBER, J.C.P., WILLOUGHBY, J.M.T.  
oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in health subjects. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.26, p.49-56, 1988.
- 37 BYKOV, V.L. the dynamics of the invasive growth of *Candida albicans* in the host's tissue. **Vestn. Dermatol. Venerol.**, v.4, p.25-8, p.1990.
- 38 CALDERONE, R.A. Recognition between *Candida albicans* and host cells. **Trends Microbiol.**, v.1, p.55-8, 1993.
- 39 CAMERON, B.J., DOUGLAS, L.J. Blood group glycolipids as epithelial cell receptors fo *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.64, p.891-6, 1996.
- 40 CANNON, R.D., HOLMS, A.R., MASON, A.B., MONK, B.C. Oral *Candida*: clearence, colonization or candidiasis. **J. Dent. Res.**, v.74, p.1152-61, 1995.
- 41 CAWSON, R. A. Chronic oral candidiasis and leukoplakia. **Oral Surg, Oral Med. Oral Pathol**, v.22, p.582-91, 1966.
- 42 CAWSON, R.A., LEHNER, T. Chronic hiperplastic candidiasis - Candidal leukoplakia. **Br. J. Dermatol.**, v. 156, p.777-83, 1968.
- 43 CHEYNE, V.D.A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation. **Dent. Res.**, v.18, p.457-68, 1939.
- 44 COTTER, G.; VERHAEGEN, S.; CLYNES, M.; KAVANAGH, K.  
membrane changes associated with the early stage fo apoptosis in Hep-2 cells decrease susceptibility to adherence by *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.35, p.219-24, 1997.
- 45 CRITCHLEY, I.A., DOUGLAS, L.J. Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, v.133, p.637-43, 1987.
- 46 DAFTARY, D.K.; MEHTA, F.S.; GUPTA, P.C. The presence of *Candida* in 723 oral leukoplakias among Indians villagers. **Scand. J. Dent. Res.**, v.80, p. 75-79, 1972.

- 47 DARWAZEH, A.M.G., AL-BASHIR, A. Oral candidal flora in healthy infants. **J. Oral Pathol. Med.**, v.24, p.361-4, 1995
- 48 DOUGLAS, L.J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Critical Rev. Microbiol.**, v.15, p.27-43, 1987.
- 49 DOUGLAS, L.J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.15, p.27-43, 1987.
- 50 DOUGLAS, L.J. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. **Microbiol. Sci.**, v.2, p.243-7, 1985.
- 51 DOUGLAS, L.J; McCOURTIE, J. Effect of tunicamycin treatment on the adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.16, p.199-202, 1984.
- 52 ELLEPOLA, A.N.; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. **Arch. Oral Biol.**, v.43, p.999-1007, 1998.
- 53 EPSTEIN, J.B.; SCULLY, C. The role of saliva in oral health and the causes and effects of xerostomia. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.58, p.217-21, 1992.
- 54 EVESON, J.W., MacDONALD, D.G. Effects of the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide on hamster lingual mucosa. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.44, p.600-5, 1977.
- 55 FIELD, E. A., FIELD, J.K., MARTIN, M.V. Does *Candida* have a role in oral epithelial neoplasia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.27, p.277-94, 1989.
- 57 FISHER, A.V. Experimental oral carcinogenesis: A basic model for the study of oral carcinogenesis using the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Danish. Med. Bull.**, v.37, p.433-43, 1990.
- 58 FISHER, A.V., PHILIPSEN, H.P. Verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma of the rat oral mucosa. **Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.92, p.437-45, 1984.

- 59 FISKER, A.V., PHILIPSEN, H.P., OVERVAD, K. Dose-response relationship in complete oral 4-NQO-carcinogenesis in rats. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.95, p.281-8, 1987.
- 60 FISKER, A.V., SCHIOTT, C.R., PHILIPSEN, H. P. Long term oral candidosis in rats. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.90, p.221-27, 1982.
- 61 FISKER., A.V., WEST, M.J., PHILIPSEN, H.P., ANDERSEN, A.H. Quantification of oral epithelial hyperplasia in rats after topical application of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Acta. Odontol. Scand.**, v.48, p.125-31, 1990.
- 62 FLETCHER, J. et al. Mouth lesions in iron defficient anaemia: Relationship to *Candida albicans* in saliva and to impairment of lymphocyte transformation. **J. Infect. Dis.**, v.131, p. 44-50, 1975.
- 63 FOTOS, , P.G., HELLSTEIN, J.W., VINCENT, S.D. Oral candidosis revisited. **Gen. Dent.**, v.39, p.422-30, 1991.
- 64 FOTOS, , P.G., HELLSTEIN, J.W., VINCENT, S.D. Oral candidosis. Clinical historical and therapeutic features of 100 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.74, p.41-9, 1992.
- 65 FRANCIS, C. A.; FARTHING, P.M. The response of Langerhans cells to palatal cover plates in the rat. **Arch. Oral Bio.**, v.34, p.377-81, 1989.
- 66 FRANKER, C.K. et al. Characterization of the mycroflora from oral mucosal surfaces of some HIV-infected patients. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.69, p.683-7, 1990.
- 67 FREITAS, H.R.; BIRMAN, E.G. Candidose bucal: Aspectos clínicos e terapêuticos. **Rev. Assoc. Paul. Cirurg. Dent.**, V.43, p.227-30, 1989.
- 68 FROMTLING, R.A., ABRUZZO, G.K., GILTINAN, D.M., *Candida tropicalis* infection in normal, diabetic and neutropenic mice. **J. Clin. Microbiol.**, v.25, p.1416-20, 1987.

- 69 FUJINO, H., CHINO, T., MAI, T. Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline n-oxide. **Nat. Cancer Inst.**, v.35, p.907-18, 1965.
- 70 FUJITA, K.; KAKU, T.; SASAKI, M.; ONOE, T. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9-10-dimethyl - 1-2 benzantracene. **J. Dent. Res.**, v.52, p.327-32, 1973.
- 71 GARADINER, R., PODGORSKI, C., DAY, A.W. Serological studies on the fimbriae of yeasts-like species. **Bot.Gaz.**, v.143, p.534-41, 1982.
- 72 GERGELI, L., URI, J. The micotic flora of healthy mouth. **Arch. Oral Biol.**, v.3, p.125-8, 1961.
- 73 GERSON, S.J. Oral cancer. **Crit. Rev.Oral Biol. Med.**, v.1, p.153-66, 1990.
- 74 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.**, v.35, p.249-53, 1990.
- 75 GHANNOUN, M.A., ABU-ELTEEN, K.H. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.24, p.407-13, 1986.
- 76 GHANNOUN, M.A., ABU-ELTEEN, K.H., MOTOWY, M.S. Effect of antineoplastic agents and x-ray irradiation on the adherence of *Candida* spp. To human buccal epithelial cells in vitro. **Mycopathologia**, v.104, p.171-80, 1988.
- 77 GINSBURG, I., FLIGIEL, S.E.G., KUNKEL, R.G., RISER, B.L., VARANI, J. Phagocytosis of *Candida albicans* enhances malignant behavior of murine tumor cells. **Science**, v.238, p.1573-75, 1987.

- 78 GLASS, B.J. et al. Xerostomia: diagnosis and treatment planing considerations. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.58, p.248-52, 1952.
- 79 GOLDHABER, P. The role of saliva and other local environmental factors in oral carcinogenesis. **J. Amer. Dent. Ass.**, v.54, p.517, 1957.
- 80 GORMAN, S.P.; JONES, D.S.; McGOVERN, J.G.; WOOLFSON, A.D. Frequency distribution of *Candida albicans* blastopores adhered to mucosal epithelial cells in-vitro. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.48, p.1315-9, 1996.
- 81 GREENSPAN, D. Treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. **J. Am. Acad. Dermathol.**, v.31, p.51-5, 1994.
- 82 HASENCLEVER, H.F. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* for mice and rabbits. **J. Bacteriol.**, v.78, p.105-109, 1959.
- 83 HASENCLEVER, H.F., MITCELL, W. O. Pathogenicity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Sabouraudia**, v.1, p.16-21, 1961.
- 84 HAZEN, B.W.; HAZEN, K.C. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and germ tube formation of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.56, p.2521-25, 1988.
- 85 HEIMDAHL, A.; NORD, C.E. Oral yeasts infections in immunocompromised and seriously diseased patients. **Acta. Odontol. Scand.**, v.48, p.77-84, 1990.
- 86 HENRICI, A.T., Characteristics of fungous diseases. **J. Bacteriol.**, v.39, p.113-38, 1940.
- 87 HERNANDEZ, Y.L.; DANIELS, T.E.; Oral candidiasis in Sjögren's syndrome: prevalence, clinical correlations, and treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.68, p.324-9, 1989.

- 88 HOGEWIND, W.F.C.; van der WALL, J.; van der KWAST, W.A.M.; SNOW, G.B. The association of white lesions with oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.18, p.163-164, 1989.
- 89 HOLMS, A.R., CANNON, R.D., JENKINSON, H.F. Interaction of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J. Ind. Microbiol.**, v.15, p.208-13, 1995.
- 90 HOLMSTRUP, P., AXÉLL, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, v.48, p.57-9, 1990.
- 91 HOLMSTRUP, P., BESSERMANN, M. Clinical, therapeutic, and pathogenic aspects of chronic oral multifocal candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.56, p.388-95, 1983.
- 92 HOWLETT, J.A. The infection of rat tongue mucosa in vitro five species of *Candida*. **J. Med. Microbiol.**, v.9, p.309-16, 1976.
- 93 HSIA, C.C. et al. Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzylmethylnitrosamine from its precursors by *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.78, p.1878-81, 1981.
- 94 HSIA, C.C.; SUN, T.T.; WANG, Y.Y.; ANDERSON, L.M.; ARMSTRONG, D.; GOOD, R.A. Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzylmethylnitrosamine from its precursors from *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, p.1878-81, 1981.
- 95 HURLEY, R., WINNER, H.I. The pathogenicity of *Candida tropicalis*. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.84, p.33-8, 1962.
- 96 IACOPINO, A.M., WATHEN, W.F. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.123, p.46-51, 1992.
- 97 IWATA, K. fungal toxins and their role in the etiopathology of fungal infection. In: **Recent advances in medical and veterinary micology**. Tokio: Ed. K. Iwata, 1975. P.15-33.

- 98 JENKINS, W.M.M. et al Nutricional deficiency in oral candidosis. **Int. J. Oral Surg.**, v.6, p.204-10, 1977.
- 99 JIANG, D.J., WILSON, D.F., PIERCE, A.M., WIEBRIN, O.W.  
Identification of basal lamina acidic glycoconjugates, particularly heparan sulfate proteoglycans, using poli-L-lisine-gold probe in induced oral carcinomas. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, v.30, p.8-13, 1996.
- 100 JONES, D.S.; SCHEP, L.J.; SHEPHERD, M.G. The effect of cetypyridinium chloride on the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in vitro. **Pharm. Res.**, v.12, p.1896-1900, 1995.
- 101 JONES, J.H. & RUSSEL, C. Experimental oral candidiasis in wealing rats. **J. Den. Res.**, v.52, p.182, 1973.
- 102 JONES, J.H., et al. Tetracycline and the colonization and infection of the mouths of gem-free and conventionalized rats with *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.2, p.247-53, 1976.
- 103 JONES, J.H., RUSSEL, C. The histology of cronic candidal infection of the rat's tongue. **J. Path.**, v.113, p.97-100, 1974.
- 104 JORGE, A.O.C. Efeitos da sialoadenectomia na presença de *Candida albicans* e candidose na cavidade bucal de ratos. Piracicaba, 1991. 235p. Tese (doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- 105 JORGE, A.O.C., et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.11, p.279-85, 1997.
- 106 JORGE, A.O.C., TOTTI, M.A.G., ALMEIDA, O.P., SCULLY, C.  
Effects of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. **J. Oral Pathol. Med.**, v.22, p.138-40, 1993.

- 107 JORGE, A.O.C., TOTTI, M.A.G., ALMEIDA, O.P., SCULLY, C. Oral candidiasis established in the siloadenectomized rat. **J. Oral Pathol. Med.**, v.22, p.54-6, 1993.
- 108 KAMINISH, H. Degradation of bovine achiles tendon collagen by *Candida albicans* proteinase. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.26, p.315-8, 1988.
- 109 KENNEDY, M.J. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. **Current Topics Med. Mycol.**, v.2, p. 73-169, 1988.
- 110 KENNEDY, M.J., SANDIN, R.L. influence of growth conditions on *Candida* adhesion, hydrophobicity and cell wall structure. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, p.79-92, 1988.
- 111 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.**, v.49, p.654-63, 1985.
- 112 KIMURA, L.H., PEARSAL, N.N. Adherence of *Candida* to human buccal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.21, p.64-8, 1978.
- 113 KIMURA, L.H., PEARSAL, N.N. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.28, p.464-8, 1980.
- 114 KITANO, M., HATANO, H., SHISA, H. Strain difference of susceptibility to 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinoma in rats. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.83, p.843-80, 1992.
- 115 KNIGHT, L., FLETCHER, J. Growth of *Candida albicans* in saliva: stimulation by glucose associated with antibiotics, corticosteroids, and diabetes mellitus. **J. Infect. Immun.**, v.123, p.371-7, 1971.
- 116 KREGER-van RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study.**, 3.ed., Amsterdam, Elsevier Science Publisers, 1984. P.585-844.

- 117 KROG, P. Yeasts species and biotypes associated with oral leucoplakia and lichen planus. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.63, p.48-54, 1987.
- 118 KROGH, P. the role of yeasts by means of endogenous nitrosation. **Acta Odontol. Scand.**, v.48, p.85-88, 1990.
- 119 KROGH, P. The role of yeasts in oral cancer by means of endogenous nitrosation. **Acta Odontol. Scand.**, v.48, p.85-8, 1990.
- 120 KUTUZOV, H.; SICHER, H. Anatomy and functions of the palate in the white rat. **Anatomical Record**, v.114, p.67-84, 1952.
- 121 LACASSE, M., FORTIER, C., TRUDEL, L., COLLET, A.J., DESLAURIES, N. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. **J. Oral Pathol. Med.**, v.19, p.136-41, 1990.
- 122 LAW, S.; FOTOS, P.G.; WERTZ, P.W. Skin surface lipids inhibit adherence of *Candida albicans* to stratum corneum. **Dermatology**, v.195, p.220-230, 1997.
- 123 LAY, K.M., RUSSEL, C. *Candida* species and yeasts in mouth of infants from a special care of a a maternity hospital. **Arch. Dis. Clin.**, v.52, p.794-804, 1977.
- 124 LEHNER, T. Immunoflorescence study of *Candida albicans* in candidiasis carriers and control. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.97, p.104, 1966.
- 125 LEKHOLM, U., WALLENIUS, K. Effects of essential fatty acid deficiency and of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis on oral carcinogenesis in the rat. **Odont. Revy.**, v.27, p.165-80, 1976.
- 126 LEVY, B.M. The effect of a chemical carcinogen (20-methylcholanthrene) on the oral tissues. A preliminary report. **Oral Surg.**, v.1, p.582, 1948.

- 127 LIPPERHEIDE, V.; QUINDOS, G.; JIMENEZ, Y.; PONTON, J.; BAGAN-SEBASTIAN, J.V.; AGUIRRE, J.M. *Candida* biotypes in patients with oral leukoplakia and lichen planus. *Candida* biotypes in leukoplakia and lichen planus. **Mycopathologia**, v.134, p.75-82, 1996.
- 128 LYNCH, D.P. Oral candidiasis. History, classification and clinical presentation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.78, p.189-93, 1994.
- 129 MACKINNON, J.E., (1936). In: - JONES, J.H., ADANS, D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. **Br. J. Dermatol.**, v.83, p.670-73, 1970.
- 130 MACURA, A.B. hydrophobicity of *Candida albicans* related to their adherence to mucosal epithelial cells. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, v.266, p.491-6, 1987.
- 131 MAKRIDES, H.C.; MACFARLANE, T.W. An investigation of the factors involved in increased adherence of *C. albicans* to epithelial cells mediated by *E. coli*. **Microbios**, v.38, p.177-85, 1983.
- 132 MANKOSWSKI, Z.T. Influence of *Candida albicans* glycoprotein on 3-methylcholanthrene induced malignancy in newborn rodents. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v.42, p.95-100, 1963.
- 133 MANKOWSKI, Z.T. Influence of *Candida albicans* glyoprotein on 3-methylcholanthrene induced malignancy in newborn rodents. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v.44 p.95-100,1971.
- 134 MARRIE, T.J.; COSTERTON, J.W. The ultrastructure of *Candida albicans* infections. **Can. J. Microbiol.**, v.27, p.1156-64, 1981.
- 135 MARSH, P.D. PERCIVAL, R.S., CHALLACOMBE, S.J. The influence of denture wearing and age on the oral microflora. **J. Dent. Res.**, v.71, p.1374-81, 1992.

- 136 MATTHEWS, J.B., MASON, G.I., SCULLY, C.M., PRIME, S.S. *In situ* characterization of the oral mucosal inflammatory cell response of rats induced by 4-nitroquinoline N-oxide. **Carcinogenesis**, v.7, p.783-88, 1986.
- 137 McCOURTIE, J., DOUGLAS, L.J. Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.45, p. 6-12, 1984.
- 138 MEITNER, S.W., BOWEN, W.H., HAIDARIS, C.G. Oral and esophageal *Candida albicans* infection in hyposalivatory rats. **Infect. Immun.**, v.58, p.2228-36, 1990.
- 139 MEYER, S.A., AHEARN, D.G., YARROW, D. Genus 4. *Candida* berkholt. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3ed., Amsterdam: Elsevier, 1984, p.585-844.
- 140 NAGY, K.N.; SONKOD, I.; SZOKE, I.; NAGY, E.; NEWMAN, H.N. The microflora associated with oral carcinomas. **Oral Oncol.**, v.34, p.304-8, 1998.
- 141 NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., SUGIMURA, T. Carcinogenic actions of 4-nitroquinoline N-oxide. **GAAN**, v.48, p.129-37, 1957.
- 142 NAUTA, J.M., ROODENBURG, J.L., MIKKELS, P.G., WITJES, M.J., WERMEY, A. Comparison of epithelial dysplasia - the 4NQO rat palate mucosa and human oral mucosa. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.24, p.53-8, 1995.
- 143 NAVARRO, C. M. Efeitos da sialoadenectomia na carcinogênese bucal de ratos provocada pelo óxido de nitroquinolina (4NQO). Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, 1992. (Teses Mestrado).

- 144 NAVARRO, C.M., ALMEIDA, O.P., SCULLY, C. Oral focal acantholytic dyskeratosis induced in sialoadenectomized rats painted orally with the carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, v.34, p.191-94, 1993.
- 145 NGUYEN, M.H., PEACOCK, J.E. Jr., MORRIS, A.J., TANNER, D.C., NGUYEN, M.L., SNYDMAN, D.R., WAGENER, M.M., RINALDI, M.G., YU, V.L. The changing face of candidemia emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **Am. J. Med.**, v.100, p. 617-23, 1996.
- 146 O'GRADY, J.F., READE, P.C. *Candida albicans* as a promoter of oral mucosal neoplasia. **Carcinogenesis**, v.13, p.783-6, 1992.
- 147 O'SULLIVAN, J.M.; CANNON, R.D.; SULLIVAN, P.A.; JENKINSON, H.F. Identification of salivary basic prolin-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. **Microbiology**, v.143, p.341-348, 1997.
- 148 OCHIAI, E., SEI, S.J. *J. Pharmac. Soc. Japan.* 65: 18, 1945. In: NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., SUGIMURA, T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline N-oxide. **GANN**, v.48, p.129-37, 1957.
- 149 ODDS, F., KIBBLER, C.C., WALKER, E., BHAMRA, A., PRENTICE, H.G., NOONE, P. Carriage of *Candida* species and *Candida* biotypes in patients undergoing chemotherapy or bone marrow transplantation for haematological disease. **J. Clin. Pathol.**, v.42, p.1259-66, 1989.
- 150 ODDS, F.C. *Candida* and candidosis, a review and bibliography. **Baliere Tindall**, London, p.115-230, 1988.
- 151 ODDS, F.C. *Candida* infections: an overview. **Critical Rev. Microbiol.**, v.15, p.1-5, 1987.
- 152 ODDS, F.C. Ecology and epidemiology of *Candida* species. **Zentralbl. Bakteriол. Hyg.**, v.257, p.207-12, 1984.

- 153 OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. **Acta odontol. Scand.**, v.48, p.71-4, 1990.
- 154 OLIVER, D.E., SHILLITOE, E.J. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. **J. Oral Pathol.**, v.13, p.265-70, 1984.
- 155 OLSEN, I. Oral adhesion of yeast. **Acta odontol. Scand.**, v.48, p.45-53, 1990.
- 156 OYAMA, M. Experimentelle studien über die entstehung des zungenkrebses. **Mitt.Med. Akad. Kioto**, v.15, p.861-80, 1935.
- 157 PARVINEN, T., LARMAS, M. The relation of stimulated salivary flow rate and pH to *Lactobacellus* and yeast concentrations in saliva. **J. Dent. Res.**, v.60, p.1929-35, 1981.
- 158 PAULA, C.R. et al. Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. **Mycopathology**, v.112, p.119-24, 1990.
- 159 PEDERSEN, A.RINDN, J.L.; REIBEL, J.; PINDBORG, J.J. Carcinoma in situ and carcinoma in patients with crhonic oral candidiasis. **Tandlaegebladet**, v.93, p.509-13, 1989.
- 160 PENDRAK, M.L., KLOTZ, S.A. Adherence of *Candida albicans* to host cell. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v.129, p.103-13, 1995.
- 161 PETTINATI, A.H. Anatomia patológica das candidíasis. In: LACAZ, C.S. **Candidíasis**. São Paulo, Ed. Pedagógica Universitária e Ed. Universidade de São paulo, 1980, p.101-112.
- 162 PHILIPSEN, H., FISKER, A.V. Focal acantholytic dyskeratosis in experimental oral carcinogenesis in rats. **J. Oral Pathol.**, v.12, p.30-6, 1983.
- 163 PINDBORG, J.J.; RENSTRUP, G.; POULSEN, H.E.; SILVERMAN Jr., S. Studies in oral leukoplakias. Clinical and histologic signs of malignancy. **Acta Odontol. Scand.**, v.21, p.407-414, 1963.

- 164 PITIGALA-ARACHCHI, A., MATTHEWS, J.B., CRONE, I.J.,  
PRIME, S.S. Ia<sup>+</sup> epithelial dendritic cell during oral carcinogenesis in  
the rat. **J. Oral Pathol.**, v.17, p.138-44, 1988.
- 165 POLONELLI, L., MORAGE, G. Re-evaluation of the killer  
phenomenon. **J. Clin. Microbiol.**, v.24, p.866-9, 1986.
- 166 PRIME, S.S., MacDONALD, D.G., RENNIE, J.S. The effect of iron  
deficiency on experimental oral carcinogenesis in the rat. **Br. J. Cancer**,  
v.47, p.413-18, 1986.
- 167 PUGH, D., CAWSON, R.A. The cytochemical localization of  
phospholipase A and lysophospholipase in *Candida albicans*.  
**Sabouraudia**, v.13, p.110-5, 1975.
- 168 QUIRINO, M.R.; BIRMAN, E.G.; PAULA, C.R. Oral manifestations of  
diabetes mellitus in controled and uncontroled patients. **Braz. Dent. J.**,  
v.6, p.131-6, 1995.
- 169 RAMIREZ-AMADOR, V.; SILVERMAN, S. Jr.; MAYER, P.; MAYER,  
P.; TYLER, M.; QUIVEY, J. Candidal colonization and oral candidiasis  
in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral  
Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endol.**, v.84, p.149-53,  
1997.
- 170 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, p.37-41, 1984.
- 171 RAY, T.L., PAYNE, C.D. Comparative production and rapid  
purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented  
cultures. **Infect. Immun.**, v.50, p.508-14, 1990.
- 172 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.**, v.19, p.326-29, 1990.

- 173 REIBEL, J., WALLENIUS, K., DALBELSTEEN, E. Blood group antigen staining pattern during experimental carcinogenesis in rat palate. *APMIS*, v.96, p.161-7, 1988.
- 174 REICHARDT, P.A.; PHILIPSEN, H.P.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; SAMARANAYAKE, L.P. Pseudomembranous oral candidiasis in HIV infection: ultrastructural findings. *J. Oral Pathol. Med.*, v.24, p.276-81, 1995.
- 175 RENSTRUP, G. Occurrence of *Candida* in oral leukoplakia. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, v.78, p.421-24, 1970.
- 176 RICH, A.M., READE, P.C. Histomorphometric analysis of epithelial changes in chemically induced oral mucosal carcinogenesis in rats. *J. Oral Pathol.*, v.17, p.528-33, 1988.
- 177 RICH, A.M., READE, P.C. Nuclear morphometry in experimental oral mucosal carcinogenesis. *Eur. J. cancer B. Oral Oncol.*, v.32, p.169-75, 1996.
- 178 ROED-PETERSEN, B. Cancer development in oral leukoplakia. Follow up of 331 patients. *J. Dent. Res.*, v.50, p.711, 1971.
- 179 ROFFO, A.H. Leucoplasie experimentale produite par le tabac. *Sud-Américaine de Médecine et Chirurgie*, v.1, p.321, 1930.
- 180 ROGERS, T.J., BALISH, E. Experimental *Candida albicans* infection in conventional rats. *Infect. Immun.*, v.14, p.33-8, 1980.
- 181 ROSSIE, K.M. et al. Influence of radiation therapy on oral *Candida albicans* colonization: a quantitative assessment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.64, p.698-701, 1987.
- 182 RUSSEL, C., LAY, K.M. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. *Arch. Oral Biol.*, v.18, p.957-62, 1973.
- 183 RUSSEL, 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. *Mycopathology*, v.58, p.125-29, 1976.

- 184 SALLEY, J.J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the sirian hamster. *J. Dent. Res.*, v.33, p.253-62, 1954.
- 185 SALVIN, S. B. Endotoxin in pathogenic fungi. *J. Immunol.*, v.69, p.13-22, 1952.
- 186 SAMARANAYAKE, L.P. Nutritional factors and oral candidosis. *J. Oral Pathol.*, v.15, p.61-5, 1986.
- 187 SAMARANAYAKE, L.P., MacFARLANE, T.W. Factors affecting the in vitro adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. *Arch.Oral Biol.*, v.27, p.869-73, 1982.
- 188 SANDIN, R. L.; et al. Variation in affinity to *Candida albicans* in vitro among humans buccal epithelial cells. *J. Med. Microbiol.*, v.24, p. 151-5, 1987.
- 189 SANGEORZAN, J.A.; et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment and emergence of fuconazole resistance. *Am. J. Med.*, v.97, p.339-46, 1994.
- 190 SANTOS, E.B. Efeitos da xerostomia e inoculação de *C. albicans* no desenvolvimento de carcinoma bucal em ratos tratados pelo 4NQO. Piracicaba, 1995. Tese (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- 191 SCOTT, E.M.; GORMAN, S.P.; WYATT, T.D.; MAGILL, E.A. Growth of microorganisms in total parenteral nutrition mixtures and related clinical observation. *J. Clin. Hosp. Pharm.*, v.10, p.79-88, 1985.
- 192 SEKI, S.; SAKAI, Y.; KITADA, T.; KAWAKITA, N.; YANAI, A.TSUTSUI, H.; SAKAGUCHI, H.; KUROKI, T.; MONNA, T. Induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line by a neutralizing antibody to transforming growth factor-alpha. *Virchows Arch.*, v.430, p.29-35, 1997.

- 193 SEOANE, J.; VAZQUEZ, J.; CAZENAVE, A.; DE LA CRUZ MERA, A.; ARGILA, F.; AGUADO, A. Malignant angular cheilitis. *Acta Otorrinolaringol Esp.*, v.47, p.325-7, 1996.
- 194 SHAKIR, B.S., MARTIN, M.V., SMITH, C.J. Relative effectiveness of various yeasts, *Candida* ssp. and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the wistar rat. *Arch. Oral Biol.*, v.28, p.1069-70, 1983.
- 195 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.*, v.31, p.617-21, 1986.
- 196 SHEPERD, M.G.; POULTER, R.T.M.; SULLIVAN, P.A. *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenicity. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.39, p.579-614, 1985.
- 197 SHEPHERD, M.G.; POULTER, R.T.M.; SULLIVAN, P.A. *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenicity. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.39, p.579-614, 1985.
- 198 SHIMIZU, M.T., JORGE, A.O.C., UNTERKIRCHER, C.L. Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida*. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.33, p.27-31, 1996.
- 199 SILVERMAN Jr. S.; GORKSY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer*, v.53, p. 563-68, 1984.
- 200 SILVERMAN, S.; ROZEN, D. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.76, p.772-77, 1968.
- 201 SILVERMAN, S.Jr.; BAHL, S. Oral lichen planus update: clinical characteristics, treatment responses, and malignant transformation. *Am. J. Dent.*, v.10, p.259-63, 1997.

- 202 SMITH, C.J.; PINDBORG, J.J. Histological grading of oral epithelial atipia by the use of photogragic standard. **Copenhagen, Hamburg**, 1969.
- 203 STEIDLER, N.E., READE, P.C. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline 1-oxide. **Oral Surg.**, v.5,; p.524-31, 1984.
- 204 STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol Scand.**, v.48, p.3-10, 1990.
- 205 SVENSSON, S., HEYDEN, G. Experimental induction if irreversible precancerous changes in the palatal epithelium of the rat. **Int. J. Oral Surg.**, v.11, p.52-8, 1982.
- 206 TANAKA, T., KOJIMA, T., KAWAMORI, T., MORI, H.  
Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. **Cancer**, v.75, p.1433-9, 1995.
- 207 TANAKA, T., KUNIYASU, T., SHIMA, H., SUGIE, S., MORI, H., TAKAHASHI, M., HIRONO, I. Carcinogenicity of betel quid. III. Enhancement of 4-nitroquinoline 1-oxide and N-2-fluorenylacetamide-induced carcinogenesis in rats by subsequent administration of betel nut. **JNCL**, v.7, p.777-81, 1986.
- 208 TANAKA, T., MAKITA, H., OHNISHI, M., MORI, H., SATOH, K., HARA, A. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. **Cancer Res.**, v.55, p.4059-64, 1995.
- 209 TANAKA, T.; TAKEUCHI, T.; HARA, A.; OHNO, T.; KOJIMA, T.; MORISHITA, Y.; MORI, Y.; KAWADA, Y.; MORI, H.; inaba, s. Computer-assisted image analyses of silver positive nucleolar organizer regions in preneoplastic and neoplastic lesions of the liver and urinary bladder induced by carcinogens in rats. **Igaku-no-Ayumi**, v.154, p.81-82, 1990.

- 210 TOTTI, M.A.G., JORGE, A.O.C., ALMEIDA, O.P., SANTOS, E.B.S.  
Recuperação de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* na cavidade bucal de ratos normais e sialoadenectomizados. **Rev. Odontol. UNESP**, v.25, p.119-24, 1996.
- 211 TYLENDÁ, C.A. et al. High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection. **J. Oral Pathol. Med.**, v.18, p.520-4, 1989.
- 212 UMAZUME, M.; UETA, E.; OSAKI, T. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.432-9, 1995.
- 213 VASILAS, A. MOLINA, L., HOFFMAN, M., HARDARIS, C.G. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. **Arch. Oral Biol.**, v.37, p.613-22, 1992.
- 214 VOLKMANN, K.R. Microbial pathogenicity. In: Oral microbiology and infectious disease. Schuster GS, editor. Philadelphia: B.C. Decker, pp.192-200, 1990.
- 215 SWAHLIN, Y.B. Salivary secretion rate, yeast cells and oral candidiasis in patients with acute leukemia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.71, p.689-95, 1991.
- 216 WALKER, D.M. et al. *Candida* and immune defects in iron deficiency. **J. Dent. Res.** (Suppl. 5): v.52, p.938-9, 1973.
- 217 WALLENIUS, K. Experimental oral cancer in the rat. With the special reference to the influence of saliva. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, *Suppl* 80, 1966.
- 218 WALLENIUS, K., Effect of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on the rat's cheek skin transplanted to the buccal cavity. **Odontol. Revy.**, v.16, p.283-92, 1965.

- 219 WALLENIOUS, K., LEKHOLM, U. Influence of saliva on epidermal cancer in rat induced by water-or-fat-soluble carcinogens. **Odont. Revy.**, v.24, p.115-26, 1973.
- 220 WALLENIOUS, K., LEKHOLM, U. Oral cancer in rats induced by the water -soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. **Odont. Revy.**, v.24, p.39-48, 1976.
- 221 WELLMER, A. & BERNHARDT, H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. **Mycoses**, v.40, p.363-68, 1997.
- 222 WHITE, T.C.; MIYASAKI, S.H.; AGABIAN, N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **J. Bacteriol.**, v.175, p.6126-33, 1993.
- 223 WILKIESON, C. et al. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. **J. Oral Pathol. Med.**, v.20, p.13-6, 1991.
- 224 WILLIAMSON, J.J. A study of extent of variation in daily counts of *Candida albicans* in saliva. **Aust. Dent. J.**, v.17, p.106-9, 1972.
- 225 WILLIAMSON, J.J. diurnal variatuion of *Candida albicans* counts in saliva. **Aust. Dent. J.**, v.17, p.54-60, 1972.
- 226 WONG, P.N.C., WILSON, D.F. 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis in the rat palate. **J. Oral Pathol.**, v.12, p.375-84, 1983.
- 227 YEMMA, J.J.; BERK, M.P. Chemical and physiological effects of *Candida albicans* toxin on tissues. **Cytobios**, v.77, p.147-58, 1994.
- 228 YU, L., LEE, K.K., HODGER, R.S., PARANCHYCH, W., IRVIN, R.T. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to glycopingolipid (Asialo-GM1) receptors in achieved by a conserved receptor-binding domain present in their adhesins. **Infect. Immun.**, v.62, p. 5213-13, 1994.

- 229 ZHANG, K.H.; WANG, H.J.; QIN, J.X. Effect of candidal infection on the hyperplastic oral epithelium. **Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih**, v.29, p.339-41, 384, 1994.