**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

PRISCILA LIE TOBOUTI

Avaliação da expressão gênica da proteinase aspartil secretada 2, 5 e 9 (SAP-2, SAP-5 e SAP-9) e sua correlação com a invasão epitelial por *Candida albicans* em modelo experimental de estomatite protética *in vivo*.

**BAURU
2011**

PRISCILA LIE TOBOUTI

Avaliação da expressão gênica da proteinase aspartil secretada 2, 5 e 9 (SAP-2, SAP-5 e SAP-9) e sua correlação com a invasão epitelial por *Candida albicans* em modelo experimental de estomatite protética *in vivo*.

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof^a. Dr^a Vanessa Soares Lara

Versão Corrigida

BAURU
2011

T556a Tobouti, Priscila Lie
Avaliação da expressão gênica da proteinase aspartil secretada 2, 5 e 9 (SAP-2, SAP-5 e SAP-9) e sua correlação com a invasão epitelial por *Candida albicans* em modelo experimental de estomatite protética *in vivo*./ Priscila Lie Tobouti.– Bauru, 2011.
129 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Experimentação Animal
da Universidade Estadual de Londrina
Protocolo nº: OF.CIRC.CEEA N° 150/2010
Data: 08 de Dezembro de 2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

À Deus,

Por permitir que até aqui eu chegasse

À Minha família,

*Por todo o apoio emocional e financeiro. Pelo amor e
compreensão que recebi durante todos esses anos.*

“...Se não tivesse Amor, de nada valeria...”

AGRADECIMENTOS

À Deus que até aqui esteve comigo, direcionando cada passo e cada decisão. Sou grata por todas as bênçãos, cada pessoa que Ele colocou em minha vida, as quais foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Agradeço pelo amor, pela paz que excede todo o conhecimento, pelas conquistas e vitórias. À Deus eu dou toda a honra e glória, pois sei que mais do que eu podia imaginar Ele me deu e creio que em muitas coisas eu ainda serei abençoada. Agradeço pela oportunidade concedida.

À minha família que tanto amo, minha mãe Lie, irmã Patrícia, irmão Alexandre e cunhada Isabela, agradeço pelas orações, pelos conselhos, por todo o apoio emocional e financeiro. Sem vocês esse sonho não teria sido concretizado.

Às minhas avós, Obatian Lidia e Apoh Fo Moij, pelas orações, ligações e todo apoio oferecido.

Aos meus tios, tias, primos e primas meu agradecimento por todo o carinho.

À Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, pela oportunidade que me proporcionou, pela orientação e grande contribuição na minha formação acadêmica e profissional. Pela confiança e toda ajuda e empenho para que este projeto fosse realizado. Pelos conselhos concedidos e amizade construída, que espero levar comigo para sempre. Agradeço a Deus por ter colocado você como minha orientadora, pois aprendi muito nesses dois anos.

“A tarefa do educador moderno não é derrubar florestas, mas irrigar desertos” C.S.Lewis

Obrigada por todo o incentivo!

À Profa. Dra. Solange de Paula Ramos, da Universidade Estadual de Londrina, minha orientadora de iniciação científica, na graduação, que até hoje demonstra muito carinho e atenção por mim. Agradeço por todas as conversas, conselhos e a amizade sem igual. Mais do que minha professora de graduação, você foi minha amiga durante esses 7 anos. Não tenho palavras para agradecer toda a atenção. Agradeço por ter aberto as portas do laboratório de Histologia para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida, da Universidade Estadual de Londrina, que sempre deu muita atenção para as minhas dúvidas, mesmo sendo perguntas básicas e isso demonstra um perfil de um grande professor. Pela sinceridade e apoio para a conclusão deste projeto.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venâncio, da Universidade Estadual de Londrina, que abriu as portas do Laboratório de Imunologia para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e por permitir a utilização do Centro Integrado de Pesquisa (CIP).

Ao Prof. Carlos Ferreira dos Santos agradeço por todo apoio e por ter aberto as portas do laboratório de Farmacologia para a realização do RT-PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris pela ajuda na realização dos testes estatísticos.

À Ana Regina Casaroto que colaborou para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Com muito carinho eu agradeço a ela por toda a atenção e companheirismo. Uma amizade que com certeza levarei para sempre.

Ao Thiago José Dionísio, técnico do laboratório das Disciplinas de Fisiologia e Farmacologia, que colaborou na realização do RT-PCR em tempo real, agradeço por todo apoio, por ter acreditado neste projeto, por toda atenção e compreensão.

À Profa. Dra. Luciana Rezende Pinto que colaborou e apoiou no desenvolvimento deste projeto.

A Márcia, Marcelo, Rafaela, Renato e Neusa, técnicos do Centro Integrado de Pesquisa, por toda amizade, colaboração, carinho e atenção. Por todo o esforço e ajuda neste projeto.

Às funcionárias do departamento de Estomatologia (Patologia), Cris, Fatiminha, Carla e Carlos, por toda atenção, ajuda, ensinamentos e a amizade. Obrigada pelo carinho, que fez os meus dias aqui em Bauru melhores.

Aos Estagiários do departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina, por cuidarem dos animais em experimento, com todo carinho e atenção. Pelas ajudas até de madrugada e toda a amizade construída.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira e Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira por estarem presente em todos os seminários, pelos ensinamentos, estímulo ao aprendizado, pela transmissão de conhecimentos e destreza nos ensinamentos.

Aos Amigos que considero parte da minha família muito obrigada por sempre estarem do meu lado, nas alegrias e nas tristezas, na saúde e na doença.

À Carol Menezes, com quem morei a maior parte do mestrado, que sempre me apoiou e esteve no meu lado nas horas difíceis, por todo carinho e atenção.

À Carol Mussi e à Fernanda Pigatti, obrigada pelas conversas, os desabafos, os conselhos. Agradeço a Deus pela vida de vocês. Vocês são amigas que levarei por toda a minha vida.

À Taísa Maria Vilardi pelas ajudas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao *Heliton Gustavo de Lima* e à *Adriana Caetano* por todas as risadas e aprendizagem. Demonstraram serem irmãos muito queridos presente a qualquer momento.

Aos colegas do departamento *Bruna Maria Vilardi* e *Diego Mauricio Calderón Bravo*, por todo companheirismo e amizade.

Aos *Doutorandos*, do Departamento de Estomatologia (Patologia), por toda a ajuda e dicas para o desenvolvimento e término do mestrado.

À *Dra. Thaís Helena Gasparoto*, que de boa vontade me recomendou para o mestrado nesta instituição, bem como colaborou para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos *amigos da Universidade Estadual de Londrina*, colegas, funcionários e professores, que mesmo distantes ainda deram seu apoio.

Aos *amigos que fiz nesta instituição*, alunos do terceiro ano, com quem fiz o Programa de Aprendizagem e Ensino; professores; funcionários e alunos.

Ao *grupo de estudo bíblico* que sempre me apoiaram e em oração e estiveram comigo.

Aos amigos *Paulo de Tarso Lemos Borges*, *Marcelo Patrício Coelho* e *Andressa Taffarel* pela amizade sem igual, por todo o apoio que me motivou a querer crescer.

*Aos amigos de Florianópolis, Londrina, Bauru e Boardman, que
diretamente contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.*

*À todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho,
minha apreciação e agradecimento.*

*Agradeço a Deus pela vida de cada um que esteve presente
comigo nesta etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo na pessoa do excelentíssimo Diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira.

À Universidade Estadual de Londrina na pessoa da excelentíssima Reitora Profa. Dra. Nádina Aparecida Moreno.

À comissão de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo, na pessoa do Presidente, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti e, do vice-presidente, Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.

Ao curso de pós-graduação, Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração: Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo, na pessoa da Responsável de área Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de minha bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa que possibilitou a realização desta dissertação.

“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes”.

Isaac Newton

RESUMO

A Estomatite protética associada a *Candida* (EPC) acomete a mucosa bucal em contato com próteses removíveis e, clinicamente, caracteriza-se por eritema com diferentes graus de inflamação. Esta doença é considerada de etiologia multifatorial, isto é, uma associação de fatores como trauma, falta de higienização, uso contínuo da prótese, hipersensibilidade ao material usado na dentadura, diabetes, terapia imunossupressora e infecção por fungo, como diferentes espécies de *Candida*. Os principais fatores de virulência deste fungo são a formação de hifas, dimorfismo, alterações fenotípicas, aderência, persistência, sinergismo com as bactérias, interferências com o sistema de defesa do hospedeiro e a produção de enzimas hidrolíticas. Dentre as enzimas hidrolíticas, a proteinase aspartil secretada (SAP) é uma das mais importantes para a patogenia de *C. albicans*, sendo nociva para o tecido epitelial e para o sistema imune do hospedeiro. Não está totalmente compreendida a real penetração do fungo nos tecidos e sua correlação com a presença da SAP, na doença estomatite protética. Essa dificuldade de avaliação pode ser justificada pelas divergências intrínsecas e extrínsecas observadas em muitos aspectos, como diferentes costumes, hábitos sociais, estado emocional e fisiológico. A utilização de um modelo experimental em animais poderá minimizar essas divergências e fornecer condições mais padronizadas para o experimento. Neste trabalho, foram avaliadas, quantitativamente, a expressão gênica das enzimas SAP-2, SAP-5 e SAP-9, presentes no biofilme formado na superfície interna das placas acrílicas superiores de ratos e, microscopicamente, a invasão do fungo no tecido epitelial do palato. Para isso, foram selecionados 49 ratos *Wistar*, com 90 dias de vida, pesando em média 300g, os quais foram divididos em 3 grupos: Controle, Placa/*Candida* e Placa, acompanhados durante 2, 4 e 6 dias. Os resultados demonstraram que, em 4 dias de uso da placa acrílica contaminada, houve, em alguns ratos, sinais clínicos de inflamação no palato duro; microscopicamente, hiperplasia epitelial, hiperqueratinização, invasão fúngica nas camadas superficiais do revestimento epitelial, microabscessos de Munro e hiperplasia papilar; e maior percentual de neutrófilos no Grupo Placa/*Candida* em relação aos Grupos Controle e Placa. Também no quarto dia de uso da placa acrílica superior, no Grupo Placa/*Candida*, o biofilme formado na sua superfície interna apresentou a mais alta expressão gênica relativa das enzimas SAP-2, SAP-5 e SAP-9 que os períodos de 2 e 6 dias de uso. Assim, a invasão fúngica no revestimento epitelial do palato duro pode estar correlacionada com a alta expressão de RNAm das SAPs -2, -5 e -9.

Palavras-chave: Estomatite sob prótese. *Candida albicans*. Proteinase aspartil secretada (SAP).

ABSTRACT

Evaluation of gene expression of secreted aspartyl proteinase -2, -5 and -9 (SAP-2, SAP-5 and SAP-9) and its correlation with epithelial invasion by *Candida albicans* in a *in vivo* denture stomatitis experimental model.

Denture stomatitis (D.S.) affects the oral mucosa in contact with removable dentures, and clinically characterized by erythema with varying degrees of inflammation. This disease is considered a multifactorial etiology, with a combination of factors such as trauma, lack of hygiene, continuous use of stents, hypersensitivity to the material used for dentures, diabetes, immunosuppressive therapy and fungal infection, such as different species of *Candida*. The main virulence factors of the fungus are the formation of hyphae, dimorphism, phenotypic changes, adherence, persistence, synergism with bacteria, interference with the host defense system and the production of hydrolytic proteins. Among the hydrolytic proteins, the secreted aspartyl proteinase (SAP) is one of the most important in the pathogenesis of *C. albicans*. SAP is harmful to both the epithelial tissue and to the host's immune system. It is not fully understood the real penetration of the fungus in the epithelium tissue and its correlation with the presence of SAP, in denture stomatitis. This difficulty in evaluation can be justified by the intrinsic and extrinsic differences observed in many aspects, different customs, social's habits, emotional and physiological state. Using an experimental animal model may minimize these differences and provide more standardized conditions for the experiment. In the present work, the aim was to evaluate quantitatively the gene expression of enzymes SAP-2, SAP-5 and SAP-9 of the biofilm formed in internal surface of rat's upper acrylic plates, and to analysis microscopically, the fungal invasion in palatal epithelial tissue. 49 Wistar rats were selected, 90 days old, weighing on average 300g. They were divided into three groups: Control Group, Plate/*Candida* and Plate, follow by 2, 4 and 6 days of the use of the plates. The results demonstrated, in four days of use of the acrylic plate, clinical signs of inflammation in the hard palate; microscopically epithelial hyperplasia, hyperkeratinization, fungal invasion in the superficial layers of the epithelial lining, Munro's microabscess and papillary hyperplasia; and higher percentage of neutrophils in the Plate/*Candida* Group, compared to Control and Plate Groups. In the period of 4 days, the relative gene expression of the SAPs-2, -5 and -9 in biofilm also showed to be higher in Plate/*Candida* Group, compared with the periods of 2 and 6 days. Thus, the fungal invasion in the epithelial lining of the hard palate may be correlated with high mRNA expression of SAPs -2, -5 e -9.

Key words: Denture stomatitis. *Candida albicans*. Secreted aspartyl proteinases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1. A - Moldagem do palato do rato utilizando uma moldeira acrílica adicionada com material à base de poliéter. B - Molde do palato duro do rato após a polimerização do material a base de poliéter.47
- Figura 2- Fios de amarrilho pré-fixados na placa acrílica, na região dos incisivos, e os dois orifícios próximos à face distal do primeiro molar superior.....49
- Figura 3. Placa de cultura de 6 poços, contendo em um dos poços a placa acrílica superior submersa em 4mL de suspensão de *C. albicans* SC5314. A placa de cultura era mantida na incubadora a 37°C, a 75rpm por 90 minutos para adesão do fungo na superfície interna da placa acrílica superior.50
- Figura 4- Placa de acrílico superior (rosa), adaptada no palato duro do animal. A placa foi fixada através de fios de amarrilho transpassados tanto na inter-proximal entre primeiro e segundo molares superiores direito e esquerdo, quanto nos incisivos superiores. Para maior conforto do animal, os fios de amarrilho foram recobertos por resina autopolimerizável (preto).52
- Figura 5 - Fita medidora de pH (*) demonstrando um pH básico, após comparação simultânea das quatro cores, obtido a partir de amostra salivar de um dos animais.65
- Figura 6- **A-** Área de adesão do fungo *C. albicans* SC5314 na superfície interna da placa acrílica, antes da adaptação da placa na boca do animal (amostra controle). **B-** Biofilme formado depois de 2 dias de uso da placa acrílica com *Candida albicans*, apresentando sinergismo entre bactérias e fungos (formações esféricas verdes). **C-** Placa acrílica depois de 4 dias na boca do animal, apresentando fungos (formações esféricas verdes) e bactérias, na sua superfície interna. **D-** Sexto dia de uso da placa acrílica demonstrando, predominantemente, bactérias e escassos fungos (formações arredondadas verdes) (análise microscópica confocal).68
-
-

Figura 7- Palato duro de rato saudável (Grupo Controle).....	71
Figura 8- Imagens microscópicas de palato duro (A e B) e de língua (C) de um animal do Grupo Controle. A - Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado; B - Tecido conjuntivo fibroso apresentando escassas células inflamatórias e presença de vasos sanguíneos de pequeno calibre; C - Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico com papilas filiformes e tecido conjuntivo fibroso subjacente com leve infiltrado inflamatório. Nota-se biofilme microbiano na superfície (HE).	71
Figura 9- Palato duro e língua de um rato do Grupo Placa, apresentando-se clinicamente saudável.	75
Figura 10- Imagens microscópicas de palato duro (A) e de língua (B) de um animal do Grupo Placa, após 6 dias de uso da placa acrílica superior. A - Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado, com tecido conjuntivo fibroso subjacente apresentando leve infiltrado inflamatório; B - Epitélio estratificado pavimentoso acantótico com biofilme microbiano na sua superfície (HE).	75
Figura 11- Palato duro de um rato do Grupo Placa/ <i>Candida</i> , após 2 dias de uso da placa acrílica com fungos <i>Candida albicans</i> aderidos previamente. Nota-se, clinicamente, ausência de inflamação.....	79
Figura 12- Imagem microscópica de palato duro (A) e de língua (B) de um animal do Grupo Placa/ <i>Candida</i> após 2 dias de uso da placa acrílica. A - Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado. Subjacente, nota-se tecido conjuntivo fibroso apresentando leve infiltrado inflamatório, predominantemente, perivascular. B - Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico com características de normalidade (HE).	79

Figura 13- Dois ratos, do Grupo Placa/ <i>Candida</i> , demonstrando palato duro após quatro dias de uso da placa acrílica superior, com <i>C. albicans</i> previamente aderido à superfície interna, apresentando pequenas áreas de inflamação, característico da lesão EPC (setas pretas).	83
Figura 14- Imagens microscópicas de palato duro (A, B e C) e de língua (D) de um animal do Grupo Placa/ <i>Candida</i> após 4 dias de uso da placa acrílica superior. A e B - Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado apresentando micro-abscessos de Munro (setas pretas) e superficialmente biofilme misto de <i>Candida</i> e bactérias, assim como invasão epitelial por hifas (seta vermelha) (PAS). C - Epitélio estratificado pavimentoso hiperortoqueratinizado hiperplásico, apresentando projeções exofíticas e, subjacente, tecido conjuntivo fibroso com moderado infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente subepitelial. D -Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico, com aspectos de normalidade (HE).	85
Figura 15- Palato duro de rato do Grupo Placa/ <i>Candida</i> , após seis dias de uso da placa acrílica superior. Sem presença de áreas eritematosas.	89
Figura 16- Imagens microscópicas de palato duro (A e B) e de língua (C) de um animal do Grupo Placa/ <i>Candida</i> após 6 dias de uso da placa acrílica. A -Epitélio estratificado pavimentoso hiperortoqueratinizado hiperplásico, com projeções papilares e presença de biofilme misto em sua superfície. B - Tecido conjuntivo fibroso com intenso infiltrado inflamatório, predominantemente, mononuclear e, mais profundamente, tecido muscular estriado esquelético. C - Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado com aspectos de normalidade (HE).	89

- GRÁFICOS

- Gráfico 1- Expressão relativa de RNAm para SAP-5 e SAP-9 em relação a SAP-2 do fungo *C. albicans* SC5314 da amostra controle, bem como da superfície interna das placas acrílicas superiores, após do 2, 4 e 6 dias de uso. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao controle interno actina. Análise por PCR em tempo real.92
- Gráfico 2- Expressão de RNAm para as SAPs -2, -5 e -9, em todos os períodos, comparada com o período zero (amostra controle) e normalizada pelo controle interna actina. Análise por PCR em tempo real.93

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Sequência dos *Primers* (senso e anti-senso) de SAP-2, SAP-5 SAP-9 e ACT utilizados na qRT-PCR.55
- Tabela 2- Eficiência e coeficiente de regressão dos *primers* ACT, SAP-2, SAP-5 e SAP-9.56
- Tabela 3- Média $\pm$ Desvio Padrão (DP) dos valores hematológicos (Leucócitos, Neutrófilos e Linfócitos) apresentados pelos animais dos Grupos Controle, Placa e Placa/*Candida* nos diferentes períodos (2, 4 e 6 dias).67
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ACT	Actina
ALS	Aglutinina- <i>like</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAMP65	β - glucosidase- <i>like</i>
cDNA	DNA complementar
Cel/mL	Células por mililitro
Csf4p	Glucosidase- <i>like</i>
Ct	<i>Cicle Threashold</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E.P.	Estomatite protética
E.P.C.	Estomatite protética associada a <i>Candida</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Força g
g	Gramas
GPI	Glicosilfosfatilinositol
HE	Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Ig	Imunoglobulina
kgf	Quilograma força
mg/L	Miligrama por litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	mililitro
mL/kg	mililitro por quilo
n°	Número
ng	Nanograma
PAS	Ácido periódico-Schiff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico

PIR	<i>Protein with internal repeats</i>
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real
RHE	Epitélio reconstituído humano
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
rpm	Rotação por minuto
SAP	Proteinase aspartil secretada
Th	linfócito T auxiliar
TSB	<i>Tryptase soy broth</i>
μL	Microlitro
μm	Micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

%'	Porcentagem
°	Graus
Δ	Delta
β	Beta
≤	menor ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ANIMAIS.....	45
4.1.1 VERIFICAÇÃO DE <i>CANDIDA</i> NA CAVIDADE BUCAL DOS ANIMAIS.....	45
4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS	46
4.3 CONFEÇÃO DA PLACA ACRÍLICA SUPERIOR.....	46
4.4 ADESÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> NA SUPERFÍCIE INTERNA DA PLACA ACRÍLICA SUPERIOR	49
4.5 INSTALAÇÃO E ADAPTAÇÃO DA PLACA ACRÍLICA SUPERIOR NOS ANIMAIS	51
4.6 REMOÇÃO DAS PLACAS ACRÍLICAS SUPERIORES, COLETA DE SANGUE, EUTANÁSIA E RETIRADA DOS ORGÃOS PARA ESTUDO	52
4.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PALATO DURO E LÍNGUA DOS ANIMAIS.....	53
4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS SAP-2, SAP-5 E SAP-9	55
4.8.1 EXTRAÇÃO DE RNA	55
4.8.2 <i>DESIGN</i> E CONFIRMAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i>	56
4.8.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS QUANTITATIVOS DE RNAm DA SAP-2, SAP-5 E SAP-9 PELO MÉTODO DA RT-PCR EM TEMPO REAL	58
4.8.3.1 Transcrição reversa (RT).....	58
4.8.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real	59
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTES AO HEMOGRAMA OBTIDOS DOS ANIMAIS	61
4.9.1 Teste de Normalidade	61
4.9.2 Análise estatística dos grupos.....	61

5 RESULTADOS.....	63
5.1 VERIFICAÇÃO DE <i>CANDIDA</i> NA CAVIDADE BUCAL DOS ANIMAIS E AVALIAÇÃO DO pH SALIVAR.	65
5.2 HEMOGRAMA	65
5.3 VERIFICAÇÃO DA ADESÃO DE <i>CANDIDA</i> SC5314 E DO BIOFILME FORMADO NAS PLACAS ACRÍLICAS.	66
5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROSCÓPICA DA AMOSTRAGEM.....	69
5.4.1 Grupo Controle.....	69
5.4.2 Grupo Placa	73
5.4.3 Grupo Placa/ <i>Candida</i>	77
5.5. ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE SAP-2, SAP-5 E SAP-9.....	91
6 DISCUSSÃO	95
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICE.....	123
ANEXO.....	127

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética associada a *Candida* (EPC), também conhecida como estomatite por dentadura ou candidose atrófica crônica, é uma doença inflamatória bucal de etiologia multifatorial, decorrente da associação de fatores como trauma (EMAMI et al., 2008), higienização deficiente e uso contínuo de prótese dentária removível, bem como hipersensibilidade à resina acrílica utilizada na confecção da prótese dentária, diabetes, imunossupressão e presença do fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) (FELTRIN, 1993; PEREIRA-CENCI et al., 2008; WILSON, 1998). A doença tem alta prevalência entre os idosos usuários de próteses dentárias removíveis, principalmente as totais superiores (GENDREAU; LOEWY, 2011).

C. albicans apresenta mecanismos específicos para o desenvolvimento da doença, que superam a defesa do hospedeiro e permitem a colonização do tecido mucoso (HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, 2008; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). A expressão de seus fatores de virulência pode variar dependendo do tipo de infecção, local ou sistêmica, do estágio da doença e da resposta do hospedeiro (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Sabe-se que a virulência de *C. albicans* está ligada a seus fatores intrínsecos, que então contribuem para o desenvolvimento de candidoses. Os principais são a formação de hifas, o dimorfismo, as alterações fenotípicas, a aderência, a persistência, o sinergismo com as bactérias, seus mecanismos de interferência com o sistema de defesa do hospedeiro e a produção de enzimas hidrolíticas (HUBE, 2004; MAKIHIRA et al., 2002; WILSON, D. et al., 2009).

Dentre as enzimas hidrolíticas produzidas por *C. albicans*, a proteína aspartil secretada (SAP) é um dos principais fatores de virulência envolvido na patogenia da estomatite protética (RODRIGUES et al., 2007). Esta enzima tem a capacidade de degradar proteínas humanas como os anticorpos presentes na saliva, mucina e colágeno; ativar a produção de outros fatores de virulência pela *Candida* (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003, GAUWERKY; BORELLI; KORTING, 2009; SCHALLER et al., 2005); além de atacar diretamente o sistema imune inato, degradando componentes do sistema complemento como C3b, C4b e C5 (GROPP et al., 2009).

Uma vez que os outros patógenos parecem não produzir a SAP, o conhecimento deste fator de virulência se torna indispensável nos estudos sobre a EPC. Informações prévias do genoma de *C. albicans* sugerem que 90% dos seus genes são compartilhados com *Saccharomyces cerevisiae* e 6-7% são diferentes, incluindo o gene da SAP. *C. albicans* não é a única espécie de *Candida* que produz essa enzima, outras espécies, como *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também produzem proteinases extracelulares em modelos experimentais *in vitro* (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Mesmo diante de inúmeras pesquisas, pouco se conhece sobre a presença da SAP na patogenia da EPC. Algumas SAPs auxiliam na destruição da superfície do revestimento epitelial e, assim, permitem a entrada do fungo na célula, sendo um importante fator na invasão de hifas nas células epiteliais queratinizadas (FILLER; SHEPPARD, 2006). Associada à invasão de *Candida*, exacerbada liberação de diferentes SAPs, como SAP-2, SAP-5 e SAP-9, foi observada em modelos experimentais *in vitro*, além da presença das enzimas na saliva de pacientes com candidose (NAGLIK et al., 2008).

Pesquisas com animais também têm sido utilizadas como modelos experimentais alternativos para estudos sobre a doença EPC. Tais modelos minimizam divergências observadas entre trabalhos em humanos e *in vitro*, permitindo condições mais padronizadas para o experimento. Do ponto de vista clínico e microscópico, a maioria das lesões descritas em modelos animais possui uma reprodução fiel das lesões em humanos (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001), especialmente os modelos em ratos. Contudo, não são encontrados estudos que correlacionem os aspectos clínicos, os microscópicos, os exames sanguíneos e a avaliação dos diferentes genes da SAP de *C. albicans* *in vivo*. Trabalhos com esse enfoque possuem a relevância de poder contribuir para o esclarecimento da patogenia da EPC.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA A *CANDIDA*

A doença estomatite protética (EP) ou estomatite por dentadura está associada ao uso de prótese dentária, sendo caracterizada por inflamação da mucosa em íntimo contato com o acrílico da superfície interna das próteses. Esta lesão pode causar ardência, desconforto e halitose, porém, não são observados sintomas na maioria dos casos. Existem vários fatores que influenciam a presença e a severidade desta lesão, incluindo, fluxo salivar, higiene bucal e da prótese, uso contínuo e material de confecção desta, trauma, fumo, hábitos alimentares e pH bucal (ARENDORF; WALKER, 1987; COCO et al., 2008; PEREIRA-CENCI et al., 2008; WILSON, J., 1998). Esta doença tem sido encontrada entre 60 a 65% dos usuários de prótese dentária (COCO et al., 2008; GEERTS; STUHLINGER; BASSON, 2008; RAMAGE et al., 2004), sendo considerada a mais comum dentre as lesões, em mucosa bucal, causadas por próteses dentárias, principalmente as superiores totais (DA SILVA; MARTINS-FILHO; PIVA, 2010).

No Brasil, os últimos dados publicados sobre os serviços odontológicos entre idosos, pelo Ministério da Saúde (2002/2003), revelaram indicadores críticos de saúde bucal na população idosa brasileira. Em 2003, a perda dentária foi considerada um grave problema no grupo etário de 65 a 74 anos, onde apenas 10% dos idosos tinham mais de vinte dentes na boca (COORDENAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE BUCAL, 2004). Os danos causados pelas doenças bucais aumentam com a idade, principalmente quando existe a necessidade de uma reabilitação bucal com o uso de prótese dentária. Considerando pacientes edêntulos brasileiros, a estomatite protética é a alteração mais comum entre os usuários de próteses dentárias, em especial mulheres (PIRES et al., 2002).

Doenças com comprometimento imune também predis põem o indivíduo a EPC. Esta infecção oportunista é frequente em pacientes infectados por HIV (MEILLER et al., 2009; SANITA et al., 2009), em pacientes sob terapia

imunossupressora (GOLECKA et al., 2006), bem como diabéticos e anêmicos (DORKO et al., 2005).

Clinicamente, a EP acomete a mucosa bucal que suporta próteses removíveis caracterizando-se por hiperemia com diferentes graus de inflamação (FELTRIN, 1993) e eritemas acompanhados ou não de petéquias (NEVILLE, 2009). Assim, segundo a classificação de Newton (1962), a EP pode ser graduada em três tipos: Tipo I, pontos hiperêmicos, pequenas áreas de inflamação em um tecido normal, encontradas frequentemente em torno dos orifícios de saída dos ductos das glândulas salivares palatinas; Tipo II, hiperemia difusa, caracterizada por inflamação generalizada na área equivalente a prótese, podendo, ao menor trauma, ser suficiente para causar sangramento; Tipo III, presença de hiperplasia papilar do palato, não neoplásica, com inflamação em graus variados, podendo estar presente sobre toda a extensão da mucosa associada diretamente à prótese, com maior acometimento da região central do palato, principalmente, nas áreas de alívio entre a prótese e a mucosa bucal ou sob câmaras de sucção. Os casos não tratados podem progredir do estágio I para o II e, sucessivamente, para o III (NEWTON, 1962). Microscopicamente, o tipo III, hiperplasia papilar do palato, se apresenta com hiperplasia do epitélio, superfície papilar, cristas epiteliais colunares e bífidas, bem como hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Subjacente, o tecido conjuntivo fibroso pode apresentar uma resposta inflamatória variável, que por vezes invade o epitélio, formando micro-abscessos de Munro (GOULART, 2009).

Embora outros fatores, também, predisponem o desenvolvimento da lesão, a EP está fortemente associada à presença de *Candida albicans* na cavidade bucal de humanos (DE OLIVEIRA et al., 2010; GASPAROTO; PORTO; CAMPANELLI; LARA, 2011; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; PIRES et al., 2002; SALERNO et al., 2010; VITKOV et al., 2002). Este fungo está presente na microbiota bucal humana e vive em comensalismo em indivíduos saudáveis, induzindo a lesão nos casos de alterações do estado homeostático entre o micro-organismo e o hospedeiro (ARENDORF; WALKER, 1987; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; SALERNO et al., 2010; WEBB et al., 1998a; WILSON, 1998). Assim, EP pode ser considerada uma candidose orofaríngea, ou seja, uma doença inflamatória que acomete a mucosa bucal, sendo comumente encontrada em pacientes imunocomprometidos e idosos usuários de prótese dentária removível, principalmente total superior.

RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO NA CANDIDOSE

A imunidade natural é a primeira linha de defesa contra as infecções. Seus mecanismos existem antes do encontro com os micro-organismos, e são rapidamente ativados por eles antes do desenvolvimento de uma resposta imunológica adquirida. A importância da imunidade natural na defesa do hospedeiro é ilustrada por estudos mostrando que a inibição ou eliminação de qualquer um dos vários mecanismos, aumentam de forma marcante a suscetibilidade a infecções. Alguns componentes da imunidade natural estão funcionando a todo momento, mesmo antes da infecção, como por exemplo, a camada epitelial, uma barreira a entrada de micro-organismos. Outros componentes, como fagócitos e o sistema complemento, estão normalmente inativos, mas prontos para responder rapidamente à presença de micro-organismos (ABBAS, 2008).

O primeiro passo para uma resposta protetora imune é o reconhecimento do patógeno pelos receptores presentes na superfície das células, como em fagócitos, células dendríticas e células epiteliais. Após o reconhecimento, sinais intracelulares e os mediadores inflamatórios são ativados e, como consequência, citocinas e quimiocinas são liberadas e células inflamatórias chegam até o local de invasão do agente agressor. Este mecanismo do sistema imune inato é crucial como primeira linha de defesa contra os fungos e possuem uma colaboração primária de neutrófilos na eliminação destes micro-organismos durante o contato inicial (DJEU, 1992; MENCACCI et al., 1999). A presença de *Candida* pode estimular uma resposta imunológica através da ativação de fagócitos e do sistema Complemento por ambas as vias, clássica e alternativa. Logo após a ativação da resposta inata, dá-se início a resposta imune adaptativa, principalmente pelas células Th1 ou Th17 e de linfócitos B com a produção de imunoglobulinas (Ig) (NETEA; MARODI, 2010).

Experimentos, também, foram realizados em modelo animal para verificar quais mecanismos da resposta imune estão envolvidos na candidose e observou-se que animais deficientes em linfócitos B, e, conseqüentemente, de Igs, demonstram-se mais suscetíveis a infecção por *Candida* (WEBB et al., 1998b), assim como anticorpos anti-*Candida*, inoculados previamente à indução experimental de candidose sistêmica, foram considerados protetores, impedindo o desenvolvimento

da doença, o que sugere que o sistema imune humoral faz parte da proteção contra *Candida* (HAN; MORRISON; CUTLER, 1998).

A saliva possui alta concentração de IgA, contribuindo para a neutralização e inibição da aderência do fungo e eventual fagocitose por neutrófilos e macrófagos. Assim, indivíduos com redução quantitativa no fluxo salivar, apresentando um quadro xerostômico, têm maiores chances de desenvolver candidose (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001), como observado na síndrome de Sjögren. Há também outros elementos da saliva como proteínas ricas em histidina, ou ricas em prolina, ou ainda o sistema peroxidase salivar, a lactoferrina e a lisozima, que inibem o crescimento da *Candida*, contribuindo, também, para a defesa do hospedeiro (RAMAGE et al., 2009).

Ao mesmo tempo em que *Candida* sofre um ataque por parte destes componentes da saliva, este fungo é capaz de se defender através da enzima SAP, destruindo estes elementos (SCHALLER et al., 2005).

CANDIDA ALBICANS

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram observadas, dentre elas: *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans* (AUGUSTO BRONDANI; SAMIM; FENG, 2010). Este foi observado pela primeira vez em 1839, por Langenbeck, como o mais importante fungo patogênico (SIDRIM JJC, 2004), e pertence ao reino *Fungi*, grupo *Eumycota*, filo *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*, gênero *Candida*, espécie *Candida albicans*.

Candida albicans é um organismo eucariótico aeróbico que absorve componentes orgânicos como fonte de energia e tem sido considerada uma importante levedura da microbiota humana (MANNING; MITCHELL, 1980).

Este fungo é um patógeno oportunista que vive em comensalismo com indivíduos saudáveis, porém, é capaz de induzir uma doença quando há perda da condição de homeostasia entre o micro-organismo e o hospedeiro. Vários estudos demonstraram a presença deste fungo em pacientes saudáveis (CARDASH et al.,

1989; DE OLIVEIRA et al., 2010; GASPAROTO et al., 2009b; GOLECKA et al., 2006; GROPP et al., 2009; MATTOS et al., 2009; RAMAGE et al., 2004)

O fungo *C. albicans* pode se apresentar como levedura (unicelular), hifa (multicelulares) ou pseudohifas (uma mistura de ambas). Na fase de levedura, *C. albicans* pode medir de 2 a 8 µm por 3 a 14 µm e possuir forma esférica ou ovóide, enquanto que as hifas podem se estender a algumas centenas de micrometros e ser compostas por longas ramificações, septadas ou filamentosas (GOULART, 2009; SUDBERY, 2001). A forma hifal está relacionada com o início da reação inflamatória nas candidoses, uma vez que esta forma penetra mais facilmente nos tecidos quando comparada à levedura (MERI et al., 2004). Esta capacidade de alteração fenotípica é essencial para o processo de proliferação, adesão e invasão das hifas no epitélio bucal, (HUBE, 2004; MAKIHIRA et al., 2002; WILSON, D. et al., 2009).

Em 1936, Cahn descreveu *Candida* como um agente em potencial na causa da EP e, desde então, *Candida* vem sendo estudada para a comprovação desta indução. Por esta razão, sugere-se a terminologia Estomatite Protética associada a *Candida* (PEREIRA-CENCI et al., 2008; SALERNO et al., 2010). Segundo Wilson et al., 2009, *C. albicans* não pode ser encontrada em solo, mas pode ser encontrada na superfície de próteses dentárias, pois a superfície acrílica das próteses facilita a aderência do micro-organismo e, conseqüentemente, a colonização pelo fungo, colaborando com a persistência da doença (GASPAROTO et al., 2009a; MOURA et al., 2006).

Embora se encontre uma extensa literatura apontando *Candida* como fator principal para o desenvolvimento da EP, existe um sinergismo do fungo *Candida* com as bactérias (KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997), principalmente, *Streptococcus a hemolítico* e *Neisser* (PEREIRA-CENCI et al., 2008) no biofilme microbiano associado.

Como os micro-organismos, *C. albicans* possui estratégias específicas para colonizar os tecidos, driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro e, assim, induzir a lesão EPC (HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, 2008; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Os fatores de virulência expressos por *Candida*, em especial *C. albicans*, são responsáveis pela promoção de candidoses, sendo os principais a formação de hifas, o dimorfismo, as alterações fenotípicas, a aderência, a persistência, o sinergismo com as bactérias dependendo, também, nos casos de EPC, das condições do ambiente sob a prótese dentária como pH, temperatura e produção de enzimas hidrolíticas, como a proteinase aspartil secretada (SAP) (ALBRECHT et al., 2006; MAKIHIRA et al., 2002; MERI et al., 2004; WILSON, J., 1998)

A proteinase aspartil secretada é uma das enzimas hidrolíticas extracelulares mais importantes, secretada por *Candida*. Existem 10 genes descritos na literatura (SAP-1 a SAP-10) expressos por *C. albicans*. A síntese da SAP inicia-se no núcleo celular, onde uma nova síntese de RNAm é transferida para o citoplasma e este, por sua vez, é traduzido em pré-enzima no retículo endoplasmático rugoso. A pré-enzima é transferida para o complexo de Golgi, empacotada em vesículas secretórias e transportada para a membrana plasmática, podendo manter-se ligada à membrana celular via a âncora glicosilfosfatilinositol (GPI), como ocorre com a SAP-9 e a SAP-10, ou ser liberada para o meio extracelular, como observado com as SAP-1 a SAP-8 (HORNBAUGH et al., 2009; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

A ativação de um determinado gene para a síntese de uma SAP específica está diretamente relacionada com as condições do meio bucal. A variação do pH entre 2,0 a 7,0 pode ativar diferentes genes da SAP. As SAP-1 a SAP-3 têm maior atividade em pH baixo; enquanto que as SAP-4 a SAP-6 possuem maior atividade em pH alto. Essas diferenças de pH são muito importantes para a infecção por *Candida* em diferentes locais como mucosa, pele e órgãos internos. Essa versatilidade é essencial para a vitalidade de *C. albicans* como um patógeno oportunista, pois possibilita a sobrevivência do fungo nos diferentes tecidos (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

A presença de *C. albicans* na patogenia da EP tem sido apontada por vários autores, mas a real influência da SAP, na EPC, não tem sido descrita. No presente trabalho, serão enfatizados os genes SAP-2, SAP-5 e SAP-9, os quais têm demonstrado ser potencialmente ativos em candidose vaginal, orofaríngea e infecções intraperitoneais.

SAP-2

Estudos sobre a estrutura das enzimas hidrolíticas de *C. albicans* têm demonstrado que a SAP-2 é a proteinase mais abundante secretada *in vitro* entre todas as cepas de *C. albicans* (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Essa enzima age principalmente em pH ácido (WU; SAMARANAYAKE, 1999).

Uma das mais notáveis propriedades da SAP-2 é sua capacidade de clivagem de diferentes proteínas humanas como a mucina, as moléculas da matriz extracelular (queratina, colágeno e vimentina), a lactoferrina salivar inibidora da proteinase alfa-macroglobulina, e quase todas as imunoglobulinas, incluindo a IGA secretória, normalmente resistente a quase todas as proteínas bacterianas (GAUWERKY; BORELLI; KORTING, 2009; RODRIGUES et al., 2007; SCHALLER et al., 2005).

A SAP-2 é a proteinase mais secretada *in vitro* em meios contendo fontes de nitrogênio. Com a degradação de proteínas, a SAP-2 não só providencia nitrogênio essencial para o crescimento do fungo, como também realça a adesão, a colonização e a penetração do fungo nos tecidos (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; OLIVER; SILVER; WHITE, 2008).

SAP-5

O tecido epitelial é a primeira barreira de proteção contra os micro-organismos e possui complexos de adesão intracelulares, como a E-caderina, que contribuem para a integridade do tecido. Foi proposto que *C. albicans* é capaz de invadir a mucosa através de espaços intracelulares do epitélio bucal, podendo estar associado com a degradação da E-caderina via SAP-5 (NAGLIK et al., 2008; VILLAR et al., 2007). Diferentemente da SAP-2, esta enzima é fortemente evidenciada em pH neutro (HUBE et al., 1994; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

In vitro, o gene SAP-5 é um dos primeiros genes ativados durante a invasão da hifa, sendo a enzima essencial para a adesão e penetração do fungo (VILLAR et

al., 2007). Atualmente, experimentos *in vivo*, com ratos Sprague-Dawley, utilizando placas de acrílico que simulam uma prótese total, infectadas por *C. albicans*, demonstraram um aumento da expressão do gene SAP-5 (NETT et al., 2010).

SAP-9

Em contraste com trabalhos *in vitro*, o gene para SAP-9 foi o mais expresso dentre os 10 genes da família SAP em estudos *in vivo* (NAGLIK et al., 2008). Esta enzima pode ser encontrada na membrana celular do fungo, via âncora GPI, contribuindo para a manutenção da integridade dessa superfície celular (HORNBAACH et al., 2009; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

A proteinase SAP-9, também, auxilia na degradação da histatina-5, um peptídeo antimicrobiano secretado por células epiteliais, encontrado na saliva humana (ALBRECHT et al., 2006; GROPP et al., 2009; MEILLER et al., 2009). Outra característica relevante é que, diferente das SAP-1 a SAP-6, a expressão da SAP-9 parece ser independente do pH extracelular (HORNBAACH et al., 2009).

Experimentos demonstraram que a deleção do gene da SAP-9 modifica as propriedades de aderência de *C.albicans* nas células epiteliais e causa pouca destruição do epitélio durante infecções bucais, sugerindo que esta enzima possui um papel importante na interação patógeno-hospedeiro (ALBRECHT et al., 2006).

ADESÃO E PENETRAÇÃO DE CANDIDA NO EPITÉLIO

A interação do fungo com o tecido do hospedeiro é o fator chave para o desenvolvimento das micoses, uma vez que é essencial uma adesão entre células e micro-organismos para iniciar uma invasão. Essa interação inicial é mediada por uma grande variedade de moléculas de adesão expressas na superfície da parede fúngica, capazes de interagir a diferentes ligantes (NIKAWA et al., 1991; TRONCHIN et al., 2008; ZHU; FILLER, 2010).

C. albicans possui uma parede celular organizada em várias camadas, sendo composta em sua maior parte por três carboidratos (D-glucose, N-acetil-D-glucosamona e D-manose), quitina, proteínas e lipídeos. A maioria das proteínas

encontradas na parede celular são manoproteínas, compostas principalmente por proteínas externas à parede celular e ligadas à membrana celular pela âncora GPI e proteínas *PIR* (*proteins with internal repeats*) (TRABULSI, 2008). Várias são as proteínas de adesão, dentre elas glicanas, ácido siálico, aglutinina-like (Als) e enzimas como Csf4p (*glucosidase-like*), CAMP65 (β - *glucosidase-like*) e SAP, principalmente SAP-9 e SAP-10 (ALBRECHT et al., 2006; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; TRONCHIN et al., 2008).

As SAPs, como já citadas, colaboram para a adesão e a invasão do fungo, digerindo a superfície das células epiteliais e, conseqüentemente, proporcionando a entrada desse micro-organismo no epitélio. Um aspecto importante é a capacidade de ligação do fungo à fibronectina presente nas células do hospedeiro, iniciando a fase de adesão do fungo ao tecido epitelial e possível infecção (AKPAN; MORGAN, 2002; PINTO, 2010).

A forma de hifa parece ser a morfologia invasiva do micro-organismo por produzir alterações mecânicas que deformam a membrana e o citoesqueleto epitelial, permitindo sua passagem intracelular (VITKOV et al., 2002), enquanto que a forma de levedura é tipicamente encontrada entre ou na superfície das células epiteliais. Outro mecanismo de invasão conta com a participação da própria célula epitelial, a qual forma pseudópodos e realiza a endocitose da célula fúngica (FILLER; SHEPPARD, 2006; VITKOV et al., 2002; ZHU; FILLER, 2010).

Existem divergências quanto à penetração de *Candida* no epitélio. Estudos *in vitro*, utilizando epitélio reconstituído humano (RHE), revelam uma penetração facilitada do fungo no tecido, uma vez que não existem todos os fatores imunológicos encontrados *in vivo*, para combater o fungo. Acredita-se que tais achados de invasão intraepitelial e interepitelial, *in vivo*, sejam mais encontrados em candidoses como a bucofaríngea, a esofágica, a vulvovaginal e a cutânea, lesões encontradas principalmente em pacientes imunossuprimidos (FILLER; SHEPPARD, 2006; NEVILLE, 2009; VILLAR et al., 2007).

Contudo, alguns autores têm observado uma invasão mais restrita às camadas superficiais do epitélio na doença EPC, não considerando esta lesão como uma doença infecciosa (CARTER, 1986; LEMOS, 2003; NEVILLE, 2009). Além

disso, Goulart et al. (2009) após imunomarcagem de biópsias humanas de hiperplasia papilar do palato, por meio de anticorpos anti-*C. albicans*, observaram invasão e presença superficial do fungo no tecido epitelial (GOULART, 2009).

A avaliação do processo de adesão e invasão epitelial por *C. albicans*, a partir de amostras de tecidos humanos, torna-se dificultada pela ocorrência de diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos entre os sujeitos, como costumes, hábitos sociais, estado emocional e fisiológico, além da restrita indicação de biópsia para as lesões associadas (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001).

ADESÃO DE *CANDIDA* E FORMAÇÃO DO BIOFILME EM RESINA ACRÍLICA

Os biofilmes são definidos como uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolônias, e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda uma às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular (DONLAN, 2002). A formação de um biofilme é essencial para o desenvolvimento de uma infecção, uma vez que serve de nicho aos agentes patogênicos e está associado aos altos índices de resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN, 2001; PINTO, 2010)

O biofilme microbiano presente nas próteses dentárias com base de resina acrílica é considerado um biofilme complexo, formado por leveduras, bactérias e células epiteliais descamativas (SATO et al., 1997). As espécies de bactéria mais comumente encontradas são *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* (BAENA-MONROY et al., 2005; SATO et al., 1997). Assim como outros micro-organismos, *C. albicans* possui habilidade de adesão às resinas das próteses totais, quer seja diretamente ou através de uma camada intermediária formada por placa bacteriana (CHANDRA et al., 2001a).

Após a adesão à superfície interna da prótese dentária, inicia-se, então, a etapa de formação do biofilme. Estudos *in vitro*, utilizando lâminas de polimetilmetacrilato incubadas, a 37°C, com *C. albicans* demonstrou 3 fases para esta formação: a) inicial (0 a 11 horas), sendo nos primeiros 90 minutos o processo de adesão; b) intermediária (12 a 30 horas) e c) maturação (38 a 72 horas) (CHANDRA et al., 2001b).

Outros fatores que influenciam a adesão do fungo à superfície da prótese são as proteínas presentes na parede celular e na membrana do fungo, as quais são altamente glicosiladas e possuem um grupo fosfatase com carga negativa, que afeta a carga eletrostática contribuindo para a hidrofobicidade, uma característica importante para a aderência ao material (TRONCHIN et al., 2008).

ESTOMATITE PROTÉTICA INDUZIDA EM ANIMAIS: MODELOS EXPERIMENTAIS

Modelos experimentais *in vitro* são utilizados para caracterização das propriedades de aderência fúngica na superfície de materiais utilizados em próteses dentárias, além de serem ideais para ensaios e testes de drogas terapêuticas. Em contrapartida, é difícil, em um modelo *in vitro*, considerar todos os fatores que interferem no crescimento de um biofilme na cavidade bucal. Por exemplo, células *in vitro* não são expostas aos componentes imunes da saliva, nem a um ambiente que poderia dar uma pré-condição real de crescimento do biofilme. Além disso, mesmo que muitos destes componentes, que possuem uma influência na adesão de *Candida*, já tenham sido determinados, a interação entre fungo e hospedeiro é um fenômeno complexo (NETT et al., 2010).

Apesar das peculiaridades de cada ser humano quanto ao seu estado imunológico e às suas condições fisiológicas, como fluxo salivar e hábitos alimentares e sociais, os modelos *in vivo* são ideais para se obter uma situação mais próxima do que ocorre na maioria dos indivíduos. Os humanos possuem uma notória individualidade que influencia na patogênese das candidoses, incluindo a bucal. Patógeno oportunista, *C. albicans* vive em comensalismo em indivíduos saudáveis e induzirá a doença quando houver quebra da homeostasia (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001).

A utilização de humanos portadores de EPC, para fins de pesquisa científica, torna-se dificultada, pois, raramente, esta doença requer biópsia, impossibilitando os estudos microscópicos.

Teoricamente, o aprimoramento de modelos em animais para o estudo de candidoses bucais promove uma padronização que colabora para uma comparação

universal de dados sobre a etiopatogenia da lesão (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001). Em 1971, Budtz-Jorgensen e Bertram utilizaram modelo *in vivo* com macacos para indução de EPC, por meio da instalação de placa de acrílico no palato com posterior inoculação de *C. albicans* sob a placa. Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que a inflamação presente no palato foi semelhante a dos humanos portadores da lesão.

Uma variedade de animais pode ser usada para indução experimental de EPC, mas existem condições, que de alguma forma, dificultaria a utilização dos mesmos. Alguns fatores devem ser considerados antes da escolha de um modelo animal como: tamanho da boca, facilidade no manejo, custo e local apropriado para permanência dos animais durante todo o experimento. Macacos são os que mais se aproximam biologicamente dos humanos, porém, são de difícil manuseio e manutenção onerosa. A utilização de modelo animal de pequeno porte é uma alternativa viável por possuir maiores vantagens. Dentre os animais de pequeno porte, os camundongos são fáceis para a manutenção, mas sua cavidade bucal é pequena, o que dificultaria a avaliação clínica; por outro lado, ratos são animais que apresentam uma cavidade bucal de tamanho ideal que permite fácil inoculação e coleta do material biológico, bem como são adequados para avaliações imunológicas. Ratos Wistar, portanto, têm sido uma alternativa simples e menos onerosa para experimentos com infecções fúngicas (ALLEN, 1994).

Olsen e Bondevik (1978) notaram que, após uma semana de infecção com *Candida* para indução de EPC, em ratos da linhagem Wistar, uma inflamação generalizada, semelhante à encontrada em humanos, foi observada no palato destes animais. Por outro lado, Jorge et al., 2001, utilizando ratos sialoadenectomizados com 25 dias de indução da doença, observaram lesões menos intensas naqueles que receberam 10^8 cel/mL de *C. albicans*, além de perda de peso e comprometimento sistêmico significativo do animal. Outros estudos demonstraram que, microscopicamente e clinicamente, não houve diferença quanto à lesão no palato entre o grupo controle, não usuário de placa acrílica, e o grupo com placa acrílica sem *C. albicans*; porém, ambos mostraram diferenças em relação ao grupo usuário de placa acrílica com presença do fungo, que demonstrou epitélio acantótico e hiperplásico (BUDTZ-JORGENSEN, 1971; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001).

Além da EPC causada pela instalação da placa acrílica tratada com *Candida* em ratos, outros trabalhos mostraram indução de candidose no palato de animais entre 3 e 4 dias após a administração oral de água contaminada com *C. albicans* por 68 horas (VAN WYK; BASSON; GIBSON, 1987). Este tipo de metodologia, mais utilizada para indução sistêmica de candidose, tem sido empregada com mais frequência em camundongos (BALISH et al., 1993; CANTORNA; BALISH, 1991), nos quais foram observados intensa reação inflamatória, caracterizada por exocitose epitelial por polimorfonucleares (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001).

As características clínicas do palato duro de ratos, induzidos experimentalmente à doença EPC, constituem presença de eritema na mucosa, de levedura na superfície do epitélio e de infiltrado inflamatório intra-epitelial e no tecido conjuntivo fibroso subjacente (SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1986). Tais achados são semelhantes aos encontrados em humanos com a doença (ADAMS; JONES, 1971; JONES; ADAMS, 1970; JORGE et al., 1993; LAMB; MARTIN, 1983; MARTIN, 1989; NEVILLE, 2009; OLSEN; BONDEVIK, 1978; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1981).

Nett et.al., 2010, não observaram, macroscopicamente, inflamação na cavidade bucal, nem tampouco áreas purulentas, após indução experimental de EPC em ratos. Porém, seus achados microscópicos revelaram invasão de hifas na camada epitelial, presença de intensa inflamação por polimorfonucleares e ausência de atrofia epitelial. Verificou-se, ainda, presença de um biofilme misto por fungos e bactérias. Neste trabalho, foi analisado ainda o papel de fatores que colaboram para a formação do biofilme (como o Bcr1p), para a adesão do micro-organismo (como o Als3p), e para a invasão epitelial (como a SAP-5). Os resultados demonstraram que este modelo em animal tem valor para investigações que abordam o biofilme misto (fungos e bactérias), os produtos gênicos fúngicos, as drogas antifúngicas e os fatores do hospedeiro, como produtos salivares.

Em resumo, nota-se na literatura uma divergência entre os aspectos microscópicos e clínicos observados na EPC induzida experimentalmente. Alguns trabalhos demonstraram penetração do fungo no epitélio, outros uma presença superficial do fungo e outros ambos. As avaliações microscópicas revelaram tanto atrofia epitelial como hiperplasia e a presença de infiltrado inflamatório foi desde intensa a moderada e leve. A característica morfológica do fungo presente no

biofilme também foi controversa, apresentando-se, em alguns estudos, predominantemente como hifa, em outros como levedura, bem como ambos. Clinicamente, alguns trabalhos não encontraram sinais da lesão EPC, somente alterações microscópicas (ADAMS; JONES, 1971; JONES; ADAMS, 1970; JORGE et al., 1993; MARTIN, 1989; NETT et al., 2010; OLSEN; BONDEVIK, 1978; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1986). Essas divergências existem pelo fato de cada trabalho utilizar material e métodos diferentes, como a linhagem e a quantidade de *Candida*, o tempo de indução e o material para confecção das placas acrílicas, além de modificações locais e sistêmicas nos animais, como os procedimentos de sialoadenectomia, indução de diabetes e depleção linfocítica.

Estudos para minimizar essas diferenças e obter modelos experimentais padrão são necessários. Atualmente, estudos *in vivo* com animais podem constituir uma alternativa para a compreensão da expressão de SAP, da verificação da penetração do fungo no epitélio e da análise do hemograma. Apesar de muitos trabalhos *in vivo* terem demonstrado uma reposta clínica e microscópica semelhante ao que ocorre em seres humanos com EPC, não é do nosso conhecimento estudos analisando a invasão fúngica no epitélio e a expressão de diferentes genes da SAP, uma enzima de grande importância na adesão e invasão do fungo no tecido do hospedeiro. A análise destas enzimas (SAP-2, SAP-5 e SAP-9) contribuirá para o conhecimento da patogenia dessa doença e futuramente para a melhora na qualidade de vida do idoso, pois a compreensão do desenvolvimento de uma doença é o primeiro passo para a determinação de um diagnóstico preciso e de um tratamento mais eficaz.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo, utilizando-se de modelo experimental em ratos Wistar machos, após 2, 4 e 6 dias da instalação de placas acrílicas superiores, com biofilme de *Candida albicans* aderido experimentalmente na sua superfície interna:

- 1 - avaliar, quantitativamente, a expressão gênica das enzimas SAP-2, SAP-5 e SAP-9, a partir do biofilme formado na superfície interna das placas acrílicas e
- 2 – analisar microscopicamente a ocorrência de invasão do fungo *Candida albicans* no revestimento epitelial do palato duro destes animais.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

A amostra deste estudo foi constituída por 49 ratos machos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 90 dias de vida e peso médio de 300g. Estes animais foram obtidos a partir do Biotério da Universidade Estadual de Londrina, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (OF.CIRC.CEEA N° 150/2010).

Durante o período experimental, os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas sob temperatura média de 25⁰C, iluminação natural, ambiente limpo e arejado. A alimentação foi constituída de água adicionada com suplemento vitamínico aminoácido (Glucopan), indicado para roedores, onde a concentração foi estabelecida de acordo com o fabricante, e água fornecida *ad libitum*. A alimentação líquida utilizada evitou que as placas acrílicas fossem danificadas durante a mastigação, permitindo que as mesmas se mantivessem em contato com o palato duro durante todo o período estabelecido, bem como privou os animais de acúmulo de restos alimentares na superfície interna das placas de acrílico, o que contaminaria o biofilme de *Candida* aderido, impossibilitando a obtenção adequada de RNA.

Para se evitar coprofagia dos animais, grades metálicas foram acondicionadas no soalho das gaiolas, ficando a 4cm do mesmo, o que impossibilitou o acesso às fezes por parte dos animais.

4.1.1 VERIFICAÇÃO DE *CANDIDA* NA CAVIDADE BUCAL DOS ANIMAIS

Como critério de inclusão, somente ratos com amostras negativas para *Candida albicans* na cavidade bucal foram utilizados no presente estudo. Para verificar a presença prévia do fungo *Candida albicans*, foi realizado o teste utilizando CHROMAgar *Candida*. Esta comprovação foi realizada a partir da coleta da microbiota do palato duro, mucosa jugal e língua dos ratos, através de um mesmo

swab. Este *swab* foi incubado em caldo Sabouraud (Becton, Dickinson, Le Point de Claix, França) acrescido de 1% de cloranfenicol (50mg/L) por no máximo dois dias, a 37°C. Em seguida, as amostras foram semeadas em placas Petri contendo CHROMAgar *Candida* (CHROMagar *Candida*, Becton Dickinson, Le Point de Claix, França), preparadas segundo instruções do fabricante, para a possível identificação de diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans* ou *dubliniensis* (verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. Krusei* (cor-de-rosa).

4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais (49) foram divididos, aleatoriamente, em 3 grupos: 1 controle e 2 experimentais, assim distribuídos:

- 1 - Grupo Controle - animais sadios, nos quais não foram instaladas as placas acrílicas superiores (n=5);
- 2 - Grupo Placa - animais que permaneceram com as placas acrílicas na arcada superior, por 2, 4 ou 6 dias (n=18, sendo 6 em cada período), ausentes de *C. albicans*;
- 3 - Grupo Placa/*Candida* - animais que permaneceram com as placas acrílicas na arcada superior, com *Candida albicans* previamente aderida experimentalmente na superfície interna das mesmas por 2 (n=10), 4 (n=08) ou 6 dias (n=08) (n total=26).

4.3 CONFEÇÃO DA PLACA ACRÍLICA SUPERIOR

Inicialmente, havia a necessidade de se obter uma moldeira individual para auxiliar a moldagem do palato duro dos ratos em estudo. Para isso, foi realizada uma moldagem com silicone de condensação de uso laboratorial Zetalabor (Hard 85 shore-A, Zhermack, Italy) sobre o osso palatino de um crânio de rato macho de 4 meses de vida, cedido gentilmente pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP. O molde foi vazado em gesso especial e, sobre o modelo obtido, foi feito um alívio com cera rosa nº 7. A seguir, foram confeccionadas 49 moldeiras utilizando resina acrílica autopolimerizável incolor (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP-Brasil).

Obtida esta moldeira, iniciaram-se as moldagens dos animais experimentais os quais eram escolhidos aleatoriamente e anestesiados, via intramuscular, com uma mistura, em partes iguais, do anestésico cloridrato de ketamina 100mg/mL (*Dopalen-Vetbrands*, Jacareí, Brasil) e do relaxante muscular cloridrato de xilazina 20mg/mL (*Anasedan-Vetbrands*, Jacareí, Brasil), na dosagem de 1mL/kg. Assim sendo, a arcada superior dos ratos foram moldadas com a moldeira individual (Figura 1A) previamente confeccionada, após adição de material a base de poliéter (Impregum Soft, 3M ESPE) na sua superfície interna até completa polimerização (Figura 1B).

Figura 1. A - Moldagem do palato do rato utilizando uma moldeira acrílica adicionada com material à base de poliéter. B - Molde do palato duro do rato após a polimerização do material a base de poliéter.

O molde foi vazado em gesso especial e, assim, o modelo foi recoberto por cera rosa nº 7 e incluído em mufla de latão polido nº 6 (Mac Artigos odontológicos e prótese Ind. E Com. LTDA, São Paulo, SP), anteriormente isolada com vaselina sólida e preenchida com gesso pedra tipo III (Gesso Pedra Herodent- Vigodent S/A Ind. e Com., Rio de Janeiro, RJ), manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante. A contra mufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas e, posteriormente, foi posicionada e devidamente preenchida com gesso pedra tipo III do mesmo fabricante utilizado anteriormente. As muflas permaneceram na prensa hidráulica (VH Equipamentos médicos Odont. Acess. LTDA., Araraquara, SP) com 0,5Kgf de pressão, por uma hora, e em seguida, foram abertas para remoção da cera rosa nº7 e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas.

O modelo em gesso foi isolado com isolante para resina acrílica (Cel-Lac, S.S. White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ) e a região do palato duro, no modelo, foi preenchida com resina acrílica termopolimerizável de cor rosa Lucitone 550 (Dentsply International INC., Chicago, IL, USA), utilizando proporções conforme o fabricante. Foram acoplados à resina acrílica dois fios de amarrilho, nas regiões correspondentes aos incisivos superiores, para melhor adaptação no palato, o que evitou maiores desconfortos e possíveis desadaptações. Os fios amarrados nos incisivos foram de 0,2mm de diâmetro. A base da mufla foi fechada com sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica, sob pressão inicial de 0,5kgf. No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica se apresentou estável, a pressão foi aumentada para 1kgf e, por fim, até atingir 1,5kgf, para permitir o escoamento completo do excesso da resina acrílica.

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável (Metal Vander Aparelhos para Ortodontia, Piracicaba, SP), passível de ser utilizada em polimerizadoras digitais, e levada à polimerizadora microprocessada digital, modelo Banho Maria (Solab, Piracicaba, SP) para que se procedesse a termopolimerização com a seguinte programação: a temperatura da água se elevou até 73⁰C e foi mantida durante 90 minutos, em seguida, a temperatura subiu até atingir 100⁰C, a qual se manteve por mais 30 minutos.

Após o período da polimerização das amostras, as muflas foram removidas da polimerizadora microprocessada digital e permaneceram sobre a bancada para resfriar, por um período de aproximadamente 5 horas. Dado o resfriamento completo, procedeu-se a demuflagem dos espécimes. As placas de resina acrílica foram removidas e a película de resina acrílica excedente eliminada com o auxílio de broca de carboneto tungstênio-corte cruzado super fino. A superfície externa da placa foi desgastada até uma espessura abaixo da oclusão do rato. Foram também confeccionados dois orifícios, na placa acrílica, próximos à face distal dos primeiros molares superiores, para posterior adaptação da placa acrílica no palato com os fios de amarrilho, os quais foram transpassados entre primeiro molar e segundo molar superior (Figura 2).

As placas acrílicas permaneceram por 2 dias imersas, em água destilada, em uma incubadora a 37⁰C para liberação de monômero.

Figura 2. Fios de amarelo pré-fixados na placa acrílica, na região dos incisivos, e os dois orifícios próximos à face distal do primeiro molar superior.

4.4 ADESÃO DE *CANDIDA ALBICANS* NA SUPERFÍCIE INTERNA DA PLACA ACRÍLICA SUPERIOR

Para a adesão de *Candida albicans* na superfície interna das placas acrílicas superiores, previamente confeccionadas para cada animal, utilizou-se a cepa SC5314 (1×10^7 cel/mL).

Para obter essa concentração de fungo, foi realizado o descongelamento da cepa. Alíquotas do micro-organismo foram plaqueadas em Ágar-Sabourad-Dextrose e incubadas em estufa a 37°C *overnight* para crescimento. As colônias foram então removidas da placa Petri e colocadas em tubos de polipropileno de 15mL (Falcon, Becton Dickinson) contendo meio *trypticase soy broth* (TSB), os quais foram mantidos sob agitação a 180 rotações por minuto (rpm), *overnight*, a 30°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados em 2.000 rpm durante 10 minutos. O pellet remanescente foi acrescido de 5mL de tampão fosfato salino (PBS) para lavagem. O PBS foi desprezado e, novamente, acrescentado 5mL de PBS para padronização da quantidade de inóculo, por contagem através de câmara de *Neubauer*.

Cada placa acrílica superior de cada animal, do Grupo Placa/*Candida*, foi submersa, em 4mL de suspensão fúngica, em um dos poços de uma placa de cultura de 6 poços (TPP, Suíça- Europa) (Figura 3), a qual foi incubada em estufa, sob agitação de 75rpm, por 90 minutos a 37°C para permitir a aderência de *Candida albicans* nas superfícies acrílicas (CHANDRA et al., 2001b; PINTO, 2010). Em seguida, a placa acrílica superior foi lavada em 4mL de PBS a 37°C (Figura 3) para

remoção do fungo que não se aderiu. Este procedimento foi realizado individualmente para cada placa acrílica superior, garantindo que os animais recebessem as placas com o mesmo tempo de aderência fúngica (90 minutos).

Para avaliar a estrutura e disposição de *Candida* aderido na superfície interna da placa de acrílico, antes de serem levados à boca do animal, foram escolhidas duas placas acrílicas, apresentando adesão prévia do fungo. Estas foram coradas com laranja de acridina (0.05mg/mL) e avaliadas por meio de microscópio confocal a laser invertido Leica TCS-SPE (Leica Microsystem GmbH, Mannheim, Alemanha). O mesmo procedimento foi realizado em placas de acrílico, previamente instaladas nos animais do grupo Placa/*Candida*, por 2, 4 ou 6 dias, para análise do biofilme formado.

Figura 3. Placa de cultura de 6 poços, contendo em um dos poços a placa acrílica superior submersa em 4mL de suspensão de *C. albicans* SC5314. A placa de cultura era mantida na incubadora a 37°C, a 75rpm por 90 minutos para adesão do fungo na superfície interna da placa acrílica superior.

4.5 INSTALAÇÃO E ADAPTAÇÃO DA PLACA ACRÍLICA SUPERIOR NOS ANIMAIS

Para o procedimento de instalação das placas acrílicas superiores, os animais foram novamente anestesiados por via intramuscular com a mistura, em partes iguais, do anestésico cloridrato de ketamina 100mg/mL (*Dopalen- Vetbrands*, Jacareí, Brasil) e do relaxante muscular cloridrato de xilazina 20mg/mL (*Anasedan- Vetbrands*, Jacareí, Brasil), na dosagem de 1mL/kg do peso corporal. Em seguida, os animais foram posicionados em mesa operatória, própria para contenção e abertura da boca.

Devido a influência do pH na expressão gênica das enzimas SAP-2, -5 e -9, o pH intrabucal dos ratos foram analisados com o auxílio de uma fita indicadora de pH (Merck Quimical, São Paulo – Brasil). Na sequência, para cada animal experimental, dois fios de amarelo 0,25mm, com 5cm de comprimento, e com uma das pontas previamente manipulada em forma de anzol, foram apreendidos no porta-agulha *Castro Viejo*. Em seguida, afastou-se a mucosa jugal do rato com uma pinça clínica e inseriu-se a ponta manipulada de um dos fios de amarelo por lingual, entre o primeiro e o segundo molares superiores, sendo a ponta do fio de amarelo puxada pela face vestibular desses dentes até a metade do comprimento do fio. Esta manobra foi realizada tanto no lado direito como no lado esquerdo.

Em seguida, a placa acrílica superior, contaminada ou não, foi colocada corretamente na região de palato duro e adaptada utilizando-se os fios de amarelo transpassados nas regiões inter-proximais direita e esquerda, bem como os fios de amarelo presentes na placa acrílica na região dos incisivos superiores (Figura 2), assegurando o maior contato possível entre as placas acrílicas e o palato duro. O fio de amarelo, transpassado entre os molares superiores direitos, foi introduzido no orifício direito da placa acrílica; o mesmo procedimento foi realizado no lado esquerdo. As pontas dos fios direito e esquerdo foram então unidas por meio de torção, o excedente do fio foi cortado e utilizou-se de resina auto-polimerizável (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP-Brasil) para recobrir e aderir a ponta do fio à placa acrílica, para a proteção da língua. Os fios de amarelo da região anterior da placa acrílica foram então adaptados na região cervical dos incisivos superiores e amarrados por meio de torção, pela face vestibular dos

dentes. O excedente do fio foi também cortado e recoberto com resina auto-polimerizável (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP-Brasil), para proteção da mucosa dos animais e maior conforto (Figura 4).

No Grupo Placa/*Candida*, a superfície externa das placas acrílicas superiores, devidamente adaptadas no palato duro dos animais, foi limpa por meio de *swab* estéril, objetivando eliminar células fúngicas possivelmente aderidas nesta superfície, impedindo contaminação fúngica da língua.

Fonte: adaptado de SAMARANAYAKE, 2001

Figura 4. Placa de acrílico superior (rosa), adaptada no palato duro do animal. A placa foi fixada através de fios de amarelo transpassados tanto na inter-proximal entre primeiro e segundo molares superiores direito e esquerdo, quanto nos incisivos superiores. Para maior conforto do animal, os fios de amarelo foram recobertos por resina auto-polimerizável (preto).

4.6 REMOÇÃO DAS PLACAS ACRÍLICAS SUPERIORES, COLETA DE SANGUE, EUTANÁSIA E RETIRADA DOS ORGÃOS PARA ESTUDO

Após 2, 4 e 6 dias de uso das placas acrílicas superiores, as mesmas foram removidas dos animais dos grupos experimentais e estes ratos foram avaliados clinicamente quanto à aparência do palato. Para tal, os ratos foram novamente anestesiados como descrito anteriormente (ver item 4.3). No Grupo Placa/*Candida*, o biofilme presente na sua superfície interna foi recuperado.

Assim, as placas foram retiradas cuidadosamente, imediatamente colocadas em tubos de propileno de 15mL (Tubos TPP Falcon, USA) e congeladas em nitrogênio líquido para posterior isolamento de RNA e avaliação quantitativa das SAPs. As placas dos animais do Grupo Placa foram submetidas ao *swab* da superfície interna, para descartar possível adesão posterior de *Candida*. Tais *swabs* foram submetidos ao teste utilizando-se de CHROMagar *Candida*, como descrito previamente (ver item 4.1.1).

Sob anestesia, em todos os animais do Grupo Controle, bem como dos Grupos Experimentais (neste caso, após a remoção das placas acrílicas superiores), foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca, através de uma seringa de plástico descartável de 3mL. O sangue coletado foi transferido lentamente para um tubo a vácuo para coleta de sangue com anticoagulante EDTA de 2mL (K3EDTA-Vacurette, Americana, SP) e enviado para o Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do hemograma completo e averiguação do estado sistêmico dos animais, descartando possível fungemia.

Ao término desta coleta, todos os ratos foram então submetidos à eutanásia por dose excessiva anestésica (cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina) por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a dissecação da cavidade bucal, removendo por completo a mucosa do palato duro e a língua de todos os animais. Os tecidos foram fixados em formol tamponado a 10%, por 24 horas.

4.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PALATO DURO E LÍNGUA DOS ANIMAIS

Os espécimes fixados, de palato duro e de língua, foram processados no Laboratório de Anatomia Patológica, Departamento de Estomatologia da FOB/USP. Após inclusão em parafina, os tecidos foram seccionados em micrótomo (Leica RM2165) para obtenção de cortes consecutivos de 4µm no sentido transversal, e posicionados sobre lâminas para microscopia (Bioslide, microscope slides, n° cat. 7105-1). Os cortes foram, então, corados com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (HE), e com ácido periódico-Schiff (PAS), seguidos do procedimento de montagem da lâmina, com *PermOUNT* (Fisher Scientific, USA).

Ao término dos procedimentos laboratoriais, os cortes teciduais obtidos foram analisados, por dois observadores previamente calibrados, em microscópio óptico binocular (Axiostar Plus, ZEISS) e as imagens foram capturadas a partir de uma câmera digital de alta resolução (AxioCam MRC, ZEISS) acoplada a este microscópio.

As lâminas coradas em HE foram analisadas de forma subjetiva priorizando as características do revestimento epitelial, bem como o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório presente.

O revestimento epitelial foi avaliado considerando os seguintes aspectos:

- ✓ Espessura: O revestimento epitelial foi considerado hiperplásico quando apresentando mais de 10 camadas de células
- ✓ Queratinização: Foram avaliados o tipo de queratinização (ortoqueratinizado ou paraqueratinizado), sua ausência e sua espessura (normal ou hiperqueratinizado). A espessura foi determinada, comparando-se com o Grupo Controle
- ✓ Acantose
- ✓ Exocitose
- ✓ Micro-abscessos de Munro

O tecido conjuntivo subjacente foi avaliado de acordo com:

- ✓ Tipo do infiltrado inflamatório, se predominantemente mononuclear ou polimorfonuclear
- ✓ Intensidade do infiltrado inflamatório predominante: ausente, leve, moderado ou intenso.

As lâminas submetidas à coloração especial por PAS foram avaliadas microscopicamente com o objetivo de averiguar a presença ou não do fungo no revestimento epitelial, bem como sua morfologia (levedura ou hifa), localização e sua distribuição.

4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS SAP-2, SAP-5 E SAP-9

Para avaliação da expressão gênica das enzimas SAP-2, -5 e -9, foram realizadas, primeiramente, a extração de RNA e, posteriormente, a técnica transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

4.8.1 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi realizada a partir do biofilme aderido nas placas acrílicas congeladas em nitrogênio líquido, utilizando o RiboPure-Yeast kit (Ambion, Inc, AM1926), conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

Inicialmente, os seguintes reagentes foram adicionados a um tubo de propileno de 15mL (Tubos TPP Falcon, USA): 480µL de tampão de lise, 48µL de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS) pré-aquecidos a 37°C, 480 µL de fenol (Iso amyl-alcohol-Ambion-97316). Em seguida, as placas acrílicas superiores congeladas foram submetidas à raspagem da sua superfície interna, utilizando-se uma espátula nº7 para remoção do biofilme formado e este material foi adicionado ao tubo de propileno de 15mL com os reagentes.

O conteúdo de dentro do tubo foi, então, transferido para um tubo de 2mL contendo pérolas de zircônia, o qual estava mantido a -20°C . Este tubo foi submetido à agitação (agitador *vortex*) por 10 minutos para lise das células. Logo após, o tubo foi centrifugado a 16.100g, por 5 minutos, em temperatura ambiente, para ressuspender o material biológico (fase aquosa mais superior). Esta fase foi transferida para um novo tubo de propileno (de 15mL), no qual foram acrescentados 1.9mL de tampão de ligação e 1.25mL de etanol a 100%.

Esta amostra (fase aquosa + tampão de ligação + etanol) foi filtrada, para se reter o RNA. Para tal, a amostra era pipetada no centro de um filtro posicionado no interior de uma coluna, acondicionada em um microtubo para centrífuga (2mL – *Eppendorf*). Imediatamente após, este microtubo foi centrifugado a 16.100g, por 1 minuto, resultando na retenção do material genético no fundo do filtro. Em seguida, o material genético foi lavado utilizando-se duas soluções de lavagem e centrifugação: 1 - 700 μL de Solução de lavagem 1 (*Wash Solution 1*), a 16.100g, por 1 minuto; e 2 - 500 μL de Solução de lavagem 2/3 (*Wash Solution 2/3*), a 16.100g, por 1 minuto. Na sequência, a coluna com o filtro foi transferida para um novo microtubo para centrífuga (1.5mL - *Eppendorf*), 50 μL de tampão de eluição pré-aquecido a 97°C foram colocados no interior da coluna e o tubo foi centrifugado a 16.100g por 1 minuto. Após este passo, o material genético (RNA) transferiu-se para o microtubo e a coluna foi desprezada.

A leitura específica da concentração e a qualidade das amostras de RNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Thermo Scientific). Para tal, alíquotas de 2 μL da amostra contendo o material genético foram transferidas para o aparelho (Apêndice B). As amostras de RNA revelando boa qualidade e quantidade suficiente de RNA foram armazenadas - 80°C , para posterior amplificação.

4.8.2 DESIGN E CONFIRMAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PRIMERS

Os *primers* foram obtidos baseados no Banco de Dados NCBI-GenBank (National Center for Biotechnology Information), de acordo com a sequência individual de cada região gênica das proteínas SAP-2, SAP-5 e SAP-9 e actina

(ACT) de *Candida albicans* SC5314. A ACT foi utilizada como controle endógeno para a normalização (Tabela 1).

Tabela 1- Sequência dos *Primers* (senso e anti-senso) de SAP-2, SAP-5 SAP-9 e ACT utilizados na qRT-PCR.

Alvo	Sense	Anti-sense
SAP-2	TCCTGATGTTAATGTTGATTGTCAAG	TGGATCATATGTCCCCTTTTGTT
SAP-5	CATTGTGCAAAGTAACTGCAACAG	CAGAATTTCCCGTCGATGAGA
SAP-9	ATTTACTCCACAGTTTATATCACTGAAGGT	CCACCAGAACCACCCTCAGTT
ACT-1	GACAATTTCTCTTTCAGCACTAGTAGTGA	GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA

Foram feitas curvas padrão do gene de referência (ACT) e dos genes alvos (SAP-2, -5 e -9) para verificação da eficiência dos *primers*; análise do coeficiente de regressão; especificidade de amplificação verificada pela curva de *Melt*, bem como conhecer a faixa de concentração da amostra que melhor se amplifica (se pura ou diluída). Assim, para a confecção da curva padrão, amostras de cDNA foram diluídas em série: pura (não diluída), 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32. O experimento foi realizado em duplicata e em uma placa de 384 poços (384 - *well clear optical reaction plate* - Applied Biosystem, USA). Como controle negativo, para cada *primer*, foi utilizado água ultra-pura, descartando, assim, possíveis contaminações dos *primers*.

Tabela 2- Eficiência e coeficiente de regressão dos *primers* ACT, SAP-2, SAP-5 e SAP-9.

<i>Primers</i>	<i>Eficiência (%)</i>	<i>R</i> ²
ACT	73	0.99
SAP-2	100	0.99
SAP-5	100	0.99
SAP-9	100	0.99

4.8.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS QUANTITATIVOS DE RNAm DA SAP-2, SAP-5 E SAP-9 PELO MÉTODO DA RT-PCR EM TEMPO REAL

Após a comprovação da eficiência dos *primers* e determinada a melhor concentração das amostras a ser utilizada, iniciou-se o experimento com as amostras puras dos ratos presentes neste trabalho.

qRT- PCR foi utilizado para determinar os níveis quantitativos de RNAm de SAP-2, SAP-5 e SAP-9 transcritos de amostras de RNA, removidas da superfície interna das placas acrílicas superiores que permaneceram por 2, 4 e 6 dias na boca dos animais do grupo Placa/*Candida* e de uma amostra retirada de uma placa acrílica, com o fungo *C. albicans* SC5314, aderido, mas que não foi levada para a boca do animal (amostra controle- período zero). Foi utilizada uma amostra de cada grupo, por apresentar maior concentração de RNA e melhor qualidade, verificadas por meio do aparelho *nanodrop* (NanoDrop® ND1000 UV-Vis- Thermo Scientific).

4.8.3.1 Transcrição reversa (RT)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir das amostras puras apresentando uma concentração de 180ng de RNA total. Essa síntese ocorreu através de uma reação de transcrição reversa, utilizando-se do *kit Quantitect Reverse Transcription*, Quigen (n°cat. 205313; gDNA *Wipeout buffer*, *Quantiscript reverse transcriptase*, *Quantiscript RT buffer*, *RT Primer mix* e água ultrapura).

Para o tratamento da DNase, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga e, nestes, acrescidos 2µL de gDNA *Wipeout Buffer* e, depois, água ultra-pura até atingir um volume final de 14µL. Tais amostras foram incubadas no termociclador (Veriri Thermal Cycler- Applied Biosystem) a 42°C por 2 minutos e mantidas a 4°C colocadas imediatamente no gelo.

Em seguida, para a reação de transcrição reversa, os reagentes *Quantiscript reverse transcriptase*, *Quantiscript RT Buffer* e *RT primer mix* foram adicionados aos tubos de microcentrífuga com as amostras e, posteriormente, incubadas no termociclador a 42°C, por 15 minutos, e 95°C por 3 minutos.

Após a transcrição reversa ter sido realizada, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real.

4.8.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

Os produtos da RT foram, então, amplificados para quantificar a variação relativa da expressão dos genes SAP-2, SAP-5 e SAP-9. O método qRT-PCR avaliou a quantidade do produto de cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo *SYBR® Green I* (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems, USA, cod#4304886) que quando intercalado à dupla fita de DNA, emite fluorescência sob excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado.

Para efetuação dos ciclos de reações, foram misturados: os reagentes do *kit SYBR® Green I*, 0,6µM de *primer* (sense e anti-sense) e água ultra-pura, em um tubo de microcentrifuga livre de RNase. Em outro tubo de microcentrífuga, foram transferidos 10µL desta mistura e 2µL de cDNA, sintetizado a partir do RNAm de cada amostra, foram adicionados. O experimento foi realizado em duplicata em uma placa de 384 poços, com volume final de 5µL em cada poço. Para cada par de *primer*, foi realizado controle negativo com água ultrapura. Logo em seguida, a placa foi selada com adesivo óptico (MicroAmp-Applied Biosystem, USA) e transferida para o termociclador (VIA 7- Applied Biosystem), objetivando o processo de ciclagem térmica.

O processo de ciclagem consistiu de desnaturação inicial, seguida de 45 ciclos de amplificação. Cada ciclo apresentou: fase de desnaturação inicial (95°C por 10min), condição de ciclagem térmica (95°C por 15seg) e anelamento (60°C por 1min). Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação (curva de *Melt*), conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação, analisadas a cada 0.1°C.

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold- ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual

a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do alvo avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em duplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvo (SAP-2, -5 e -9), com normalização a um controle interno (actina). Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resultava em valor 1. Para analisar a expressão destas enzimas em cada período de estudo (2, 4 ou 6 dias), escolheu-se, aleatoriamente, a SAP-2 como alvo-interno. Ainda, foram considerados, como alvo-interno, os valores da amostra controle, a fim de se comparar a expressão gênica, de cada SAP individualmente, entre os diferentes períodos.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTES AO HEMOGRAMA OBTIDOS DOS ANIMAIS

4.9.1 Teste de Normalidade

Primeiramente, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov nas variáveis do hemograma (leucócitos, neutrófilos e linfócitos), para avaliar se estas apresentavam curva de distribuição normal e determinar os testes estatísticos a serem utilizados no presente trabalho. O referido teste de normalidade foi aplicado para todas as variáveis, considerando valores absolutos para leucócitos e valores percentuais para neutrófilos e linfócito.

4.9.2 Análise estatística dos grupos

Para a análise estatística dos valores obtidos após diferentes períodos de uso das placas acrílicas (2, 4 e 6 dias), de cada Grupo individualmente, bem como dos valores obtidos nos diferentes Grupos, em cada período, foi utilizado o teste ANOVA *two way* e *post hoc* teste de Tukey.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 VERIFICAÇÃO DE *CANDIDA* NA CAVIDADE BUCAL DOS ANIMAIS E AVALIAÇÃO DO pH SALIVAR.

Todos os animais do presente estudo apresentaram-se, inicialmente, negativos para *Candida*, após swab da cavidade bucal e teste CHROMAgar *Candida*, assim como os ratos do Grupo Placa ao final de todos os períodos de avaliação.

A média do pH intrabucal inicial dos animais foi de 9.22 (9.0-10.0) sendo, portanto, um pH básico (Figura 5 e Anexo A).

Figura 5. Fita medidora de pH (*) demonstrando um pH básico, após comparação simultânea das quatro cores, obtido a partir de amostra salivar de um dos animais.

5.2 HEMOGRAMA

As médias $\pm$ desvio padrão (DP) dos valores hematológicos apresentados, pelos animais, após uso ou não (Grupo Controle) das placas acrílicas superiores (contaminadas ou não) por diferentes períodos, podem ser observadas na Tabela 3.

Considerando cada variável do hemograma individualmente e comparando-se os diferentes grupos (Controle, Placa e Placa/*Candida*) no mesmo período (2, 4 ou 6 dias), as diferenças significativas foram:

- **Aos 4 dias:** Aumento do percentual de neutrófilos sanguíneos no Grupo Placa/*Candida* (54.4 ± 25.79) em relação ao Grupo Controle (25.0 ± 6.48), com $p=0.03$, assim como em comparação com o Grupo Placa (28.0 ± 7.21), com $p=0.04$.
- **Aos 4 dias:** Diminuição do percentual de linfócitos sanguíneos no Grupo Placa/*Candida* (44.4 ± 25.24) em relação ao Grupo Controle (73.0 ± 7.79), com $p=0.03$, assim como em comparação com o Grupo Placa (72.0 ± 7.21), com $p=0.03$.

Após análise comparativa entre os diferentes períodos (2, 4 e 6 dias) de uso da placa acrílica, para cada Grupo experimental (Placa ou Placa/*Candida*), considerando cada variável do hemograma individualmente, observou-se que:

- **Aos 4 dias:** O percentual de neutrófilos (54.4 ± 25.79) aumentou significativamente em relação ao período de 2 dias (26.75 ± 7.54), no Grupo Placa/*Candida* ($p=0.04$).
- **Aos 4 dias:** O percentual de linfócitos (44.4 ± 25.24) diminuiu significativamente em comparação ao período de 2 dias (73.0 ± 8.04), no Grupo Placa/*Candida* ($p=0.03$).

5.3 VERIFICAÇÃO DA ADESÃO DE *CANDIDA* SC5314 E DO BIOFILME FORMADO NAS PLACAS ACRÍLICAS.

Após os 90 minutos de incubação da placa acrílica com *Candida albicans* em estufa a 37°C e agitação a 75rpm, para adesão, foi verificada, na sua superfície interna, por meio da coloração com laranja de acridina (0.05mg/mL), a presença e a morfologia dos fungos. Ao exame microscópico, notou-se a presença de leveduras em sua superfície, tanto na cor verde como vermelha (Figura 6A).

Após a colocação da placa acrílica superior com *Candida albicans*, na arcada do rato, iniciava-se a formação do biofilme. Após 2 dias de uso desta placa acrílica, foi observado um sinergismo entre bactérias (formações ovaladas menores, em verde) e fungos (formações arredondadas maiores, em verde) (Figura 6B). No quarto dia de uso, também foram observadas formações esféricas verdes compatíveis com

Candida (Figura 6C). Após 6 dias de uso da placa acrílica, verificou-se presença predominante de bactérias (formações arredondadas, ora verdes ora vermelhas, menores que as leveduras) e escassas leveduras (verdes) de *C. albicans* (Figura 6D).

As imagens microscópicas da Figura 6 foram obtidas a partir de uma única área, da superfície interna de cada placa acrílica superior, já que esta se apresentava com muitas irregularidades em função das corrugações palatinas dos animais (Figuras 2 e 7). Por esta razão, não foi possível avaliar microscopicamente com nitidez toda a superfície interna das placas acrílicas.

Tabela 3- Média $\pm$ Desvio Padrão (DP) dos valores hematológicos (Leucócitos, Neutrófilos e Linfócitos) apresentados pelos animais dos Grupos Controle, Placa e Placa/*Candida* nos diferentes períodos (2, 4 e 6 dias).

Variáveis do Hemograma	Grupo Controle (Média $\pm$ DP)	Período (dias)	Grupo Placa Média $\pm$ DP	Grupo Placa/ <i>Candida</i> Média $\pm$ DP
Leucócitos (cel/mm ³)	8275.0 $\pm$ 2947.74	02	5762.5 $\pm$ 1025.81	6037.5 $\pm$ 1881.21
		04	7283.33 $\pm$ 1575.07	8780.0 $\pm$ 2651.79
		06	5766.67 $\pm$ 1925.53	6270.0 $\pm$ 1257.48
Neutrófilos (%)	25.0 $\pm$ 6.48	02	30.75 $\pm$ 1.50	26.75 $\pm$ 7.54 ^o
		04	28.0 $\pm$ 7.21	54.4 $\pm$ 25.79 ^{* # o}
		06	39.17 $\pm$ 17.22	46.0 $\pm$ 12.73
Linfócitos (%)	73.0 $\pm$ 7.79	02	68.5 $\pm$ 1.92	73.0 $\pm$ 8.04 ^o
		04	72.0 $\pm$ 7.21	44.4 $\pm$ 25.24 ^{* # o}
		06	60.17 $\pm$ 17.92	53.75 $\pm$ 12.97

Teste ANOVA two way com $p \leq 0.05$

*Grupo Controle versus Grupo Experimental; # Grupo Placa versus Grupo Placa/*Candida*, considerando o mesmo período; ° Comparação entre os diferentes períodos, separadamente, considerando cada variável do hemograma.

Figura 6. **A-** Área de adesão do fungo *C. albicans* SC5314 na superfície interna da placa acrílica, antes da adaptação da placa na boca do animal (amostra controle). **B-** Biofilme formado depois de 2 dias de uso da placa acrílica com *Candida albicans*, apresentando sinergismo entre bactérias e fungos (formações esféricas verdes). **C-** Placa acrílica depois de 4 dias na boca do animal, apresentando fungos (formações esféricas verdes) e bactérias, na sua superfície interna. **D-** Sexto dia de uso da placa acrílica demonstrando, predominantemente, bactérias e escassos fungos (formações arredondadas verdes) (análise microscópica confocal).

5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROSCÓPICA DA AMOSTRAGEM

5.4.1 Grupo Controle

Ao exame clínico, todos os animais do Grupo Controle demonstraram aparência saudável, pelos brancos e sem queda, bem como nenhum indício de lesão no palato duro ou língua (Figura 7).

Os cortes microscópicos do palato duro, destes animais, revelaram mucosa bucal revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado, apresentado entre 6 a 9 camadas de células. Subjacente, observa-se tecido conjuntivo fibroso com presença de leve infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos de pequeno calibre (Figuras 8A e 8B).

Os cortes microscópicos da língua revelaram mucosa bucal revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico com presença de papilas filiformes. Subjacente, no tecido conjuntivo fibroso, observa-se leve infiltrado inflamatório, predominantemente, mononuclear. Suprajacente ao epitélio, verificou-se biofilme microbiano (Figura 8C) e não se notou presença de fungo após coloração com PAS.

Figura 7. Palato duro de rato saudável (Grupo Controle).

Figura 8. Imagens microscópicas de palato duro (**A** e **B**) e de língua (**C**) de um animal do Grupo Controle. **A**- Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado; **B**- Tecido conjuntivo fibroso apresentando escassas células inflamatórias e presença de vasos sanguíneos de pequeno calibre; **C**- Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico com papilas filiformes e tecido conjuntivo fibroso subjacente com leve infiltrado inflamatório. Nota-se biofilme microbiano na superfície (HE).

5.4.2 Grupo Placa

No Grupo Placa, todos os animais, após 2, 4 e 6 dias de uso das placas acrílicas superiores, apresentaram, clinicamente, mucosa palatina saudável, bem como pelos brancos e sem queda. Não se constatarem sinais clínicos de inflamação no palato duro destes animais. A língua apresentou-se com aspecto de normalidade, sem sinal de ulceração (Figura 9).

Os cortes microscópicos dos animais deste grupo revelaram mucosa palatina revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado e, subjacente, no tecido conjuntivo fibroso presença de escassas células inflamatórias e vasos sanguíneos de pequeno calibre (Figura 10A).

Os cortes microscópicos da língua revelaram mucosa bucal revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico e, suprajacente, presença de biofilme microbiano; não se notou presença de fungo (PAS negativo). Subjacente, notou-se tecido conjuntivo fibroso com presença de tecido muscular estriado esquelético (Figura 10B).

Figura 9. Palato duro e língua de um rato do Grupo Placa, apresentando-se clinicamente saudável.

Figura 10. Imagens microscópicas de palato duro (A) e de língua (B) de um animal do Grupo Placa, após 6 dias de uso da placa acrílica superior. **A**- Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado, com tecido conjuntivo fibroso subjacente apresentando leve infiltrado inflamatório; **B**- Epitélio estratificado pavimentoso acantótico com biofilme microbiano na sua superfície (HE).

5.4.3 Grupo Placa/*Candida*

- **2 dias.** Todos os animais apresentaram-se com aparência clínica saudável, pelos brancos e sem queda. O palato duro não apresentou sinal clínico da lesão EPC, assim como a língua não demonstrou ulceração ou qualquer outra alteração clínica (Figura 11).

Neste grupo, os cortes microscópicos do palato duro revelaram mucosa bucal revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado hiperplásico. Notou-se, ainda, aumento da camada granulosa, em relação ao Grupo Controle, bem como áreas de acantose. Subjacente, verificou-se tecido conjuntivo fibroso, apresentando leve infiltrado inflamatório mononuclear perivascular e vasos sanguíneos congestos (Figura 12A). Superficialmente ao epitélio, observa-se biofilme bacteriano, mas não fúngico (PAS negativo).

Em outros cortes, observou-se mucosa bucal de língua revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico. Subjacente, notou-se tecido conjuntivo fibroso apresentando leve infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, e tecido muscular estriado esquelético (Figura 12B).

Figura 11. Palato duro de um rato do Grupo Placa/*Candida*, após 2 dias de uso da placa acrílica com fungos *Candida albicans* aderidos previamente. Nota-se, clinicamente, ausência de inflamação.

Figura 12. Imagem microscópica de palato duro (A) e de língua (B) de um animal do Grupo Placa/*Candida* após 2 dias de uso da placa acrílica. A- Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado. Subjacente, nota-se tecido conjuntivo fibroso apresentando leve infiltrado inflamatório, predominantemente, perivascular. B- Epitélio estratificado pavimentoso acantótico com características de normalidade (HE).

- **4 dias.** Todos os animais apresentaram-se com aparência saudável, pelos brancos e sem queda. O palato duro, de alguns animais, apresentaram áreas de inflamação semelhantes ao apresentado na lesão EPC, Newton tipo I (Figura 13). Não se observou ulceração ou qualquer alteração na língua dos ratos.

Os cortes microscópicos revelaram epitélio estratificado pavimentoso hiperplásico hiperortoqueratinizado com projeções papilares exofíticas. Em alguns cortes, havia presença de micro-abscessos de Munro, principalmente nas camadas mais superficiais do revestimento epitelial, bem como presença de fungos (PAS positivo) (Figuras 14A e 14B). Subjacente, observou-se tecido conjuntivo fibroso apresentando moderado infiltrado inflamatório, predominantemente subepitelial e mononuclear (Figura 14C).

Em outros cortes, notou-se mucosa bucal de língua revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico. Subjacente, verificou-se tecido conjuntivo fibroso, apresentando leve infiltrado inflamatório e, mais profundamente, presença de tecido muscular estriado esquelético (Figura 14D).

Figura 13. Dois ratos, do Grupo Placa/*Candida*, demonstrando palato duro após quatro dias de uso da placa acrílica superior, com *C. albicans* previamente aderido à superfície interna, apresentando pequenas áreas de inflamação, característico da lesão EPC (setas pretas).

Figura 14. Imagens microscópicas de palato duro (A, B e C) e de língua (D) de um animal do Grupo Placa/*Candida* após 4 dias de uso da placa acrílica superior. A e B- Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado apresentando micro-abscessos de Munro (setas pretas) e superficialmente biofilme misto de *Candida* e bactérias, assim como invasão epitelial por hifas (seta vermelha) (PAS). C- Epitélio estratificado pavimentoso hiperortoqueratinizado hiperplásico, apresentando projeções exofíticas e, subjacente, tecido conjuntivo fibroso com moderado infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente subepitelial. D-Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico, com aspectos de normalidade (HE).

- **6 dias.** Todos os animais se apresentaram com aparência saudável, pelos brancos acastanhados e discreta queda de pelos. Ao exame clínico intrabucal, não se notaram áreas eritematosas, na região de palato duro, característico de inflamação (Figura 15). A língua apresentou-se em normalidade

Os cortes microscópicos revelaram epitélio estratificado pavimentoso hiperqueratinizado hiperplásico apresentando cristas exofíticas papilares, tanto em quantidade como em profundidade. Superficialmente, observam-se lâminas de queratina, que por vezes, apresentam-se descamadas (Figura 16A). Subjacente, notou-se tecido conjuntivo fibroso com presença de moderado à intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figura 16B). Em outros cortes, verificou-se mucosa bucal de língua revestida por epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado acantótico. Subjacente, observou-se tecido conjuntivo com presença de leve infiltrado inflamatório e tecido muscular estriado esquelético. Suprajacente, notou-se biofilme bacteriano, mas não de fungo (PAS negativo) (Figura 16C).

Figura 15. Palato duro de rato do Grupo Placa/*Candida*, após seis dias de uso da placa acrílica superior. Sem presença de áreas eritematosas.

Figura 16. Imagens microscópicas de palato duro (**A** e **B**) e de língua (**C**) de um animal do Grupo Placa/*Candida* após 6 dias de uso da placa acrílica. **A**-Epitélio estratificado pavimentoso hiperortoqueratinizado hiperplásico, com projeções papilares e presença de biofilme misto em sua superfície. **B**- Tecido conjuntivo fibroso com intenso infiltrado inflamatório, predominantemente, mononuclear e, mais profundamente, tecido muscular estriado esquelético. **C**- Epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado com aspectos de normalidade (HE).

5.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE SAP-2, SAP-5 E SAP-9

Para a análise quantitativa da expressão gênica das enzimas, foram utilizadas as amostras puras (não diluídas), uma vez que apresentaram a melhor amplificação. Assim, amostras do grupo Placa/*Candida* e uma amostra removida de uma placa acrílica que não foi levada à boca do animal foram analisadas para a detecção da expressão gênica das SAPs -2, -5 e -9. A expressão gênica relativa dessas 3 enzimas foram normalizadas pela actina.

A placa acrílica, com o fungo *C. albicans*, referente à amostra controle (período zero) demonstrou que os fungos aderidos expressaram 9.48 vezes mais RNAm de SAP-9 em comparação com SAP-2. Enquanto a SAP-5, a expressão relativa foi aproximadamente a metade da SAP-2 (Gráfico 1).

Após dois dias de uso da placa acrílica, o biofilme fúngico apresentou mudanças nesta expressão: 22.31 vezes mais SAP-5 que SAP-2, e 16.61 vezes mais SAP-9 que SAP-2. No quarto dia de uso da placa acrílica, houve uma menor diferença na quantidade relativa da expressão gênica das enzimas SAP-5 (1.87 vezes mais) e -9 (1.95 vezes mais) em relação a SAP-2, o que não significa que foram pouco expressas, uma vez que estas análises ilustram uma comparação relativa entre as enzimas, em um determinado período de uso da placa acrílica contaminada. Após seis dias de uso, a expressão de SAP-9 foi 8.05 vezes mais que a de SAP-2 (Gráfico 1).

Gráfico 1- Expressão relativa de RNAm para SAP-5 e SAP-9 em relação a SAP-2 do fungo *C. albicans* SC5314 da amostra controle, bem como da superfície interna das placas acrílicas superiores, após do 2, 4 e 6 dias de uso. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao controle interno actina. Análise por PCR em tempo real.

No Gráfico 2, estão demonstradas as expressões gênicas relativas de RNAm obtidas após os diferentes períodos de uso das placas acrílicas em relação a amostra controle, considerando cada enzima (SAP-2, SAP-5 e SAP-9) separadamente:

- SAP-2

A quantificação gênica relativa demonstrou uma maior expressão de SAP-2 no quarto dia de uso da placa acrílica (285.25 vezes mais) que o período zero e, no sexto dia de uso, não houve expressão desta proteinase.

- SAP-5

Semelhante ao observado com a SAP-2, a expressão gênica de SAP-5 demonstrou um pico no quarto dia, expressando 1035.24 vezes mais que o

período zero, e uma menor expressão no sexto dia de uso da placa acrílica superior (120.27 vezes mais) que no período zero.

- SAP-9

SAP-9 também apresentou um aumento de expressão gênica no quarto dia de uso da placa, 67.98 vezes mais, e uma menor expressão no sexto dia, 4.19 vezes mais, quando comparado com o período zero.

Com isso, o maior aumento relativo observado foi no quarto dia de uso da placa acrílica, onde houve uma maior expressão gênica relativa das 3 enzimas, quando comparada com seus respectivos controles (período zero), a qual não se manteve, no biofilme, após seis dias de uso da placa.

Gráfico 2- Expressão de RNAm para as SAPs -2, -5 e -9, em todos os períodos, comparada com o período zero (amostra controle) e normalizada pelo controle interna actina. Análise por PCR em tempo real.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A estomatite protética é uma doença prevalente em usuários de próteses dentárias removíveis, principalmente totais, sendo considerada um problema de saúde pública bucal dentre os brasileiros idosos (FREITAS et al., 2008; GASPAROTO; PORTO; CAMPANELLI; LARA, 2011; PIRES et al., 2002). Esta doença apresenta etiologia multifatorial, podendo estar associada à má higienização bucal e da prótese, ao uso contínuo desta, às doenças sistêmicas como diabetes e HIV, à imunossenescência e à presença do fungo *Candida*, ao qual está fortemente associada, caracterizando-a como uma das formas de candidose bucal, sendo assim atualmente denominada, por muitos autores, como **Estomatite Protética associada a *Candida*** (EPC) (GASPAROTO; PORTO; CAMPANELLI; LARA, 2011; PEREIRA-CENCI et al., 2008; SALERNO et al., 2010).

A EPC geralmente não apresenta sintomas, mas pode vir acompanhada de sinais de sangramento da mucosa, sensação de ardor, sabor desagradável, boca seca e halitose, principalmente quando há associação com outras doenças como a queilite angular, a glossite atrófica, a candidose aguda pseudomembranosa, a candidose crônica hiperplásica (GONSALVES; WRIGHTSON; HENRY, 2008; WEBB et al., 1998b) ou, ainda, a outros fatores como trauma (BUDTZ-JORGENSEN, 1971; FIGUEIRAL et al., 2007; IACOPINO; WATHEN, 1992; SALERNO et al., 2010).

Candida possui mais de 200 espécies, dentre elas *C. albicans*, a espécie mais correlacionada com a EPC. O fungo *C. albicans* demonstra vários fatores de virulência, como a alteração fenotípica, a aderência e a produção de enzimas hidrolíticas, capazes de destruir tanto células epiteliais como proteínas do sistema imune do hospedeiro (BAILLIE; DOUGLAS, 1999; MAKIHIRA et al., 2002; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; WEBB et al., 1998a; WILSON, J., 1998). Dentre estas enzimas, encontra-se a proteinase aspartil secretada (SAP), a qual contribui para a invasão do fungo no tecido do hospedeiro. As SAPs estão relacionadas com uma família de 10 genes, SAP-1 a SAP-10, todos expressos por *C. albicans* (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). A SAP-2 tem a capacidade de destruir imunoglobulinas, lactoferrina, mucina e

moléculas de adesão, além de ser a mais abundante dentre as SAPs, em estudos *in vitro* (NAGLIK et al., 2008). A SAP-5 é capaz de clivar moléculas de adesão como a E-caderina e de contribuir para a penetração do fungo no epitélio (VILLAR et al., 2007). A SAP-9 é expressa na membrana celular do fungo e contribui para a adesão do micro-organismo na superfície epitelial, propriedade essencial para o início de uma infecção (ALBRECHT et al., 2006; COPPING et al., 2005; HORNBACH et al., 2009). Dentre todas as SAPs, as SAPs -2, -5 e -9 são as mais expressas *in vivo* e demonstraram ser potencialmente virulentas para o hospedeiro (NAGLIK et al., 2008).

Não é do nosso conhecimento estudos de invasão fúngica no tecido epitelial com síntese aumentada de diferentes SAPs, em doenças fúngicas localizadas como, por exemplo, a EPC. Os trabalhos publicados na literatura geralmente abordam doenças sistêmicas, as quais estão relacionadas com déficit no sistema imune, ou experimentos *in vitro*, os quais não possuem todos os fatores imunológicos encontrados *in vivo* para combater o fungo, facilitando, assim, sua penetração nos tecidos de revestimento estudados (ALBRECHT et al., 2006; JAYATILAKE et al., 2006; LERMANN; MORSCHHAUSER, 2008; NAGLIK et al., 2008; SCHALLER et al., 2005; SILVA et al., 2010; VILLAR et al., 2007). De forma diferente, nos poucos trabalhos avaliando biópsias de humanos, diagnosticadas microscopicamente como EPC, o fungo apresenta-se restrito às camadas superficiais do epitélio (GOULART, 2009; NEVILLE, 2009).

Há poucos relatos na literatura sobre os mecanismos patogênicos da EPC, pois a biópsia desta raramente é indicada, uma vez que o diagnóstico pode ser feito através dos achados clínicos associados com métodos pouco invasivos, como a coleta através de *swab* para verificação da presença do fungo (BARBEAU et al., 2003; POULOPOULOS et al., 2007). Além disso, não existem, comercialmente, anticorpos anti-SAP para a detecção desta proteína, limitando os estudos microscópicos e as metodologias proteômicas para o esclarecimento da participação deste importante fator de virulência da *Candida* na patogênese da EPC.

Assim sendo, interessou-nos o estabelecimento de um modelo experimental *in vivo* que simulasse a doença localizada EPC em animais, para assim obtermos amostras que possibilitassem estudos moleculares e teciduais. Com isso, optamos

por um modelo em ratos, os quais utilizaram placas acrílicas superiores confeccionadas individualmente e previamente submetidas à adesão com *C. albicans*, objetivando uma avaliação da expressão gênica das SAPs -2, -5 e -9 a partir do biofilme removido destas placas, após diferentes períodos de uso, bem como uma avaliação microscópica, em especial quanto à presença do fungo na superfície do revestimento epitelial do palato duro e à possível penetração de *Candida* neste epitélio.

Os trabalhos descritos na literatura não demonstram um padrão de protocolo para indução experimental de EPC, apresentando divergências quanto à quantidade de cepa, à espécie utilizada e ao tempo de permanência da placa acrílica superior na cavidade bucal do animal utilizado. Assim, realizamos um estudo com ratos Wistar, os quais fizeram uso de placa acrílica contaminada com 10^6 ou 10^7 ou 10^8 células/mL de *Candida albicans* SC5314, durante 2, 4 e 6 dias. Os ratos que utilizaram placas incubadas com 10^7 células/mL demonstraram, clinicamente, aparência saudável; microscopicamente, características da doença EPC, e apresentaram quantidade de RNA suficiente para extração, sendo, portanto, a concentração fúngica de escolha para o presente trabalho. Os animais que usaram placas acrílicas superiores com 10^8 células/mL de *C. albicans* apresentaram-se debilitados, assim como descrito por Nett et al., 2010, e aqueles com placas apresentando 10^6 células/mL não demonstraram quantidade suficiente do fungo para a extração de RNA com o *kit* proposto para a viabilização deste trabalho.

Assim, baseado no modelo experimental estabelecido neste trabalho (placas incubadas com 10^7 células fúngicas/mL), verificamos que, semelhante ao observado em lesões de EPC em humanos (GOULART, 2009; LEMOS, 2003; WILLIAMS et al., 1998), houve, no palato duro dos animais do Grupo Placa\ *Candida*, ora ausência de *Candida* (corroborando LEMOS, 2003), ora presença do fungo (PAS+) nas camadas mais superficiais do epitélio (corroborando NEVILLE, 2009) e ora fungos (PAS+) invadindo o tecido epitelial como relatado por Olsen; Bondevik (1978) e Nett et al. (2010). Após 2 dias de uso das placas acrílicas superiores contaminadas, não se observaram fungos no revestimento epitelial do palato duro; porém, havia alterações epiteliais, como hiperplasia e hiperqueratinização, corroborando Reed et al., 1990, que demonstraram uma proliferação epitelial significativa após 31 horas de indução experimental em ratos desafiados com *Candida*.

Aos 4 dias, estas características microscópicas do revestimento epitelial do palato duro, em contato com *Candida*, mantiveram-se; sendo que se notaram ainda hiperplasia papilar, como observado em lesões humanas de EPC (LEMOS, 2003), e presença de neutrófilos, de micro-abscessos de Munro, e do fungo *Candida* (PAS+) na camada mais superficial do epitélio, muitas vezes, entre as células epiteliais compatível com invasão fúngica. Goulart et al., 2009, também observaram, com frequência, micro-abscessos de Munro, em amostras humanas de EPC, Newton tipo III. A presença de neutrófilos neste revestimento colabora na eliminação da infecção e na homeostasia epitelial (WEINDL et al., 2007). Estas células são as primeiras a migrarem para sítios de infecção e sua função envolve fagocitose, destruição de leveduras e de formas filamentosas do fungo e ativação de outras células envolvidas na eliminação de *C. albicans* (GASPAROTO et al., 2009b).

Em nosso estudo, a hiperplasia epitelial com superfície papilar e a hiperqueratinização estavam também presentes no epitélio do palato duro em contato com *Candida* por 6 dias; porém não havia fungos ou micro-abscessos de Munro, nos cortes examinados. Neste período, observou-se ainda descamação epitelial. A descamação de células epiteliais superficiais pode auxiliar na eliminação de fungos aderidos na sua superfície, representando um importante mecanismo na defesa contra a infecção por *Candida*, dificultando ou impedindo a invasão do fungo até as camadas mais profundas do revestimento epitelial e até os tecidos conjuntivos subjacentes (SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1990).

Estas alterações epiteliais observadas no revestimento epitelial do palato duro, após contato com *Candida*, por diferentes períodos, são sugestivas de uma resposta de defesa epitelial contra a presença do fungo, já que as mesmas não foram observadas nos animais dos Grupos Placa e Controle. Simultaneamente, estas alterações epiteliais podem representar aspectos importantes da imunidade inata em resposta a *Candida*, neste modelo experimental, já que o epitélio constitui a primeira barreira que o micro-organismo encontra, com funções relacionadas com a vigilância imune contra patógenos, apresentando uma superfície contínua na tentativa de proteger os tecidos subjacentes. Tal proteção é dependente do grau de hiperplasia, de queratinização e de descamação de células epiteliais (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; AKPAN; MORGAN, 2002). Além disso, a resposta imune epitelial contra muitos patógenos depende do padrão dos

receptores semelhantes a *toll* (TLR), expressos pelas células epiteliais, dentre outras. O TLR4, do revestimento epitelial, diretamente protege a mucosa bucal de uma infecção fúngica via ativação de recrutamento com posterior ação antifúngica dos leucócitos polimorfonucleares (PMN). *C. albicans* é capaz de ativar NF- κ B, o principal fator de transcrição associado ao TLR, e assim induzir a síntese de IL-8, uma potente quimiocina envolvida no recrutamento de PMN para o sítio de infecção (ABBAS, 2008; WEINDL et al., 2007).

Assim, os TLRs de mamíferos são mediadores centrais na resposta imune inata e adaptativa (ABBAS, 2008; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003), estando envolvidos com o aumento da resposta imunológica local, principalmente por meio da estimulação do recrutamento de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares. Em acordo, nossos achados microscópicos em palato duro dos animais do Grupo Placa/*Candida* demonstraram um aumento do infiltrado inflamatório, no tecido conjuntivo fibroso, a partir do quarto dia de uso das placas acrílicas, em comparação aos Grupos Controle e Placa. Tal infiltrado apresentou-se inicialmente (aos 4 dias) moderado e subepitelial, e, após 6 dias de uso das placas acrílicas superiores, moderado a intenso distribuído difusamente.

A formação das células inflamatórias ocorre na medula óssea durante toda a vida dos indivíduos e animais, e estas células circulam pelo sangue, migrando para os tecidos na tentativa de eliminar o agente agressor e impedir que se estabeleça uma doença (ABBAS, 2008; MARTINS, 2008). Com isso, um exame sanguíneo pode ser de grande ajuda na avaliação quantitativa dos diferentes elementos celulares presentes no sangue, bem como auxiliam na checagem da saúde geral do animal ou do indivíduo, colaborando para o diagnóstico e para a avaliação da resposta imune a uma infecção e da progressão do tratamento (MARTINS, 2008). Por esta razão, optamos pela coleta do sangue periférico dos ratos, utilizados no presente trabalho, para avaliação do estado geral, bem como quantitativa dos leucócitos sanguíneos, após utilizarem as placas acrílicas. Nossos resultados extraídos dos hemogramas demonstraram que não houve diferença significativa entre o número dos leucócitos quando todos os grupos (Controle, Placa e Placa/*Candida*) eram comparados entre si, caracterizando que não houve alteração sistêmica significativa nos animais que usaram as placas acrílicas, independente da presença ou não do fungo na sua superfície.

Porém, no quarto dia de uso da placa acrílica contaminada, apesar de ausência de alteração no número absoluto de leucócitos, houve uma provável ativação da resposta imune inata a *Candida*, já que se observaram aumento significativo da porcentagem de neutrófilos e diminuição da porcentagem de linfócitos nos animais do Grupo Placa/*Candida*, quando comparados com os animais do Grupo Controle ou do Grupo Placa. Estes resultados sugerem que havia fatores fúngicos e mediadores químicos que estimularam a proliferação e o recrutamento de neutrófilos, corroborando os achados em humanos de Gasparoto et al., 2009. O aumento da porcentagem de neutrófilos e a diminuição da porcentagem de linfócitos, nos animais do Grupo Placa/*Candida*, também foram observados, com o passar dos dias, ou seja, do segundo para o quarto dia de uso da placa acrílica. Tais achados sanguíneos podem ser relacionados diretamente com a presença de neutrófilos entre as células epiteliais do palato duro e de micro-abscessos de Munro, observados em nossas amostras após 4 dias de uso das placas acrílicas contaminadas.

Em concordância, o palato duro de alguns animais do presente estudo, no quarto dia de uso da placa acrílica contaminada (Grupo Placa/*Candida*), revelou pequenos pontos eritematosos, cuja aparência é semelhante a EPC, Newton tipo I (NEWTON, 1962) em humanos. Este sinal clínico não foi observado no segundo (corroborando NETT et al., 2010) nem após seis dias de uso das placas acrílicas contaminadas, diferindo de outros autores que observaram sinais clínicos, como inflamação generalizada no palato duro, em seus modelos experimentais de EPC, após 6 dias (OLSEN et al., 1978).

Em resumo, correlacionando os achados clínicos, microscópicos e o hemograma, obtidos no presente trabalho, acreditamos que, com o passar dos dias de uso da placa acrílica com *Candida*, houve um aumento da resposta inflamatória local do rato, tanto em relação à migração de células inflamatórias quanto à barreira física epitelial, denotando uma tentativa de combate ao fungo. É provável que a ausência de fungos e de micro-abscessos no revestimento epitelial, após 6 dias de uso, reflita um sucesso, ao menos parcial, desta tentativa. Porém, tal afirmação requer estudos moleculares complementares e específicos.

Além disso, considerando os resultados do presente trabalho, concluímos que as alterações (clínicas, microscópicas e hematológicas) observadas foram decorrentes do contato direto com *Candida* e, provavelmente, seus produtos, já que as mesmas não estavam presentes nos animais do Grupo Placa. Portanto, os resultados indicam que o material utilizado na confecção da placa acrílica não foi capaz de induzir alterações teciduais ou sistêmicas, ou seja, a resina utilizada não pode ser relacionada com a resposta inflamatória observada neste modelo de estudo, e sim a presença do micro-organismo. De fato, para evitar qualquer resposta biológica em função de produtos químicos oriundos do material utilizado para a confecção das placas acrílicas superiores, as mesmas foram mantidas, antes da instalação na boca dos animais, por 2 dias imersas em água destilada a 37°C, para permitir a liberação de monômero. Ainda, o material de escolha foi a resina acrílica termopolimerizável (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP-Brasil), como indicado para a confecção de próteses totais removíveis. As resinas autopolimerizáveis têm sido associadas com uma maior citotoxicidade, em comparação às resinas termopolimerizáveis, por liberarem maior quantidade de monômero residual (CIMPAN et al., 2000). Da mesma forma, as resinas ativadas por micro-ondas demonstraram maior efeito citotóxico sobre fibroblastos gengivais, em comparação às resinas termopolimerizáveis e autopolimerizáveis (SHERIDAN et al., 1997).

Até então, diferente do nosso trabalho, nos estudos publicados envolvendo indução experimental de EPC em animais, foram utilizadas resinas autopolimerizáveis para se confeccionar as placas superiores, com o processo de polimerização da resina ocorrendo no próprio palato do animal (ADAMS; JONES, 1971; ALLEN, 1994; JONES; ADAMS, 1970; JORGE et al., 1993; LAMB; MARTIN, 1983; MARTIN, 1989; NETT et al., 2010; OLSEN; BONDEVIK, 1978; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; SHAKIR; MARTIN; SMITH, 1986). Acreditamos que, nestes estudos, uma resposta inflamatória adicional frente aos fatores químicos do material tenha ocorrido.

Associado à resposta tecidual e clínica do palato duro frente à placa acrílica contaminada, também nos interessou investigar a produção, por parte dos fungos *C. albicans* aderidos, de um dos seus principais fatores de virulência, a SAP, os quais colaboram para a adesão e a penetração fúngica no tecido mucoso (NAGLIK et al.,

2008; RODRIGUES et al., 2007; VILLAR et al., 2007; FILLER; SHEPPARD, 2006; SCHALLER et al., 2005; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Para isso, analisamos a quantidade relativa da expressão gênica das SAPs -2, -5 e -9.

Nossos resultados demonstraram que o meio bucal do animal influenciou nas expressões gênicas relativas das SAPs, pois após o uso das placas acrílicas contaminadas houve alterações na expressão de RNAm para as SAP-5 e SAP-9 em relação a da SAP-2 (Gráfico 1). Na amostra controle, expressão de RNAm de SAP-5 foi inferior a de SAP-2 e RNAm de SAP-9 foi relativamente mais expresso; resultado este considerado coerente, por nós, já que tal amostra representa fungos experimentalmente aderidos e que não entraram em contato com o meio bucal do rato, e a SAP-9 é uma proteinase que contribui para o processo de adesão fúngica (HORNBAACH et al., 2009; ALBRECHT et al., 2006; COPPING et al., 2005). Após dois dias de uso da placa acrílica, a expressão gênica para SAP-9 e, principalmente, para SAP-5 aumentou de forma evidente, em relação à da SAP-2. Isto sugere que os fungos aderidos, no ambiente bucal, estão alterando seu perfil de síntese de fatores de virulência, com ênfase na SAP-5, cujo alvo específico é a destruição da E-caderina da mucosa bucal, com o objetivo de invadir o revestimento epitelial (VILLAR et al., 2007 e FILLER; SHEPPARD, 2006).

Aos quatro dias, as três enzimas tiveram expressão gênica semelhante (Gráfico 1). De forma interessante, nossos achados demonstraram que, neste mesmo período, houve a mais alta expressão gênica das 3 proteinases (SAP-2, -5 e -9), em relação à expressão gênica das mesmas proteinases na amostra controle (Gráfico 2). Assim, pudemos verificar uma concordância destes achados moleculares, no período de quatro dias de uso das placas contaminadas, com aqueles clínicos, microscópicos e sanguíneos, com ênfase à invasão fúngica na camada epitelial. Isto indica que as SAPs -2, -5 e -9, em nosso modelo experimental, pode estar associada à capacidade do fungo invadir, ao menos superficialmente, e consequentemente a fenômenos inflamatórios importantes, como o recrutamento de células inflamatórias e a vasodilatação, resultando em sinais clínicos, como pontos eritematosos. De forma coerente, a SAP-5, uma proteinase que degrada E-caderina e auxilia o fungo na penetração tecidual (VILLAR et al., 2007), apresentou, aos quatro dias, expressão de RNAm 1035.24 vezes maior que a expressão da amostra controle. A SAP-2, uma enzima que degrada componentes da defesa do hospedeiro

(NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003) e a SAP-9, uma molécula de adesão (HORNBAACH et al., 2009), também apresentaram, após 4 dias de uso das placas contaminadas, expressão gênica elevada em relação àquelas da amostra controle.

Após seis dias, a SAP-9 apresentou sua expressão gênica maior em relação às SAP-2 e SAP-5, de forma semelhante à amostra controle (Gráfico 1). Neste mesmo período, a expressão gênica relativa das 3 enzimas foi a mais baixa de todos os períodos de uso das placas, sendo que o RNAm de SAP-2 não foi expresso (Gráfico 2). Considerando os resultados observados após seis dias de uso das placas contaminadas, acreditamos que o sistema imune do animal tenha conseguido combater total ou parcialmente o fungo, levando à regressão do processo inflamatório, talvez em função do estabelecimento de uma resposta imune adaptativa.

Embora os resultados de expressão gênica sejam relativos, foi possível verificar que a expressão para SAP-2 foi menor que as outras enzimas, em todos os períodos de uso das placas acrílicas. Considerando que a SAP-2 age principalmente em pH ácido (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003) e que a saliva do rato possui um pH básico, como observado por nós no presente trabalho, já era previsível uma menor expressão de RNAm para a SAP-2.

Ainda, é importante ressaltar que o biofilme formado na superfície interna da placa acrílica do Grupo Placa/*Candida* apresentou-se misto, com intensa presença de bactérias, corroborando Nett et al., 2010; Chandra et al., 2001 e Sato et al., 1997. Biofilmes mistos também têm sido observados sobre superfícies internas de próteses dentárias totais superiores, nas quais além de *Candida* há presença marcante de bactérias, principalmente *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Nesseir* (KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; PEREIRA-CECI et al., 2003; GENDREAU; LOEWY, 2011). A interação fungo-bactéria demonstra a importância da microflora bucal durante o estabelecimento do biofilme aderido sobre a resina. Este biofilme misto pode colaborar para a adesão dos micro-organismos a placas acrílicas e para a resistência aos agentes antimicrobianos (NETT et al., 2010).

Em resumo, nosso trabalho demonstrou a presença de um biofilme misto aderido à superfície interna da placa acrílica superior contaminada e uma forte

relação entre a ocorrência de invasão do fungo e a maior expressão de SAP-2, SAP-5 e SAP-9 no quarto dia de uso desta placa; bem como, constatou-se que neste mesmo período houve alterações na resposta inflamatória do animal e presença de sinal clínico semelhante ao ocorrido em humanos saudáveis apresentando EPC.

7 Considerações

Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na metodologia experimental empregada e nos objetivos propostos neste trabalho, verificamos que:

- ❖ No quarto dia de uso da placa acrílica superior, no Grupo Placa/*Candida*, o biofilme formado na sua superfície interna apresentou a mais alta expressão gênica relativa das enzimas SAP-2, SAP-5 e SAP-9 que os períodos de 2 e 6 dias de uso;
 - ❖ A expressão de RNAm para a SAP-2 foi a menor expressão gênica de SAP, em todos os períodos de uso das placas acrílicas superiores;
 - ❖ Microscopicamente, no palato duro, após 4 dias de uso da placa acrílica, no Grupo Placa/*Candida*, houve presença de características semelhantes às encontradas em humanos com EPC: hiperplasia epitelial, hiperplasia papilar, micro-abscessos de Munro, invasão fúngica nas camadas mais superficiais do epitélio e infiltrado inflamatório mononuclear subepitelial;
 - ❖ A invasão fúngica no revestimento epitelial do palato duro pode estar correlacionada com a alta expressão de RNAm das SAPs -2, -5 e -9.
-

Referências

REFERÊNCIAS

Abbas AKL, A.H.; Pillai S. Imunidade Natural. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Saunder Elsevier; 2008. p. 19-46.

Adams D, Jones JH. Life history of experimentally induced acute oral candidiasis in the rat. *J Dent Res*. 1971;50(3):643-4.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;78(922):455-9.

Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem*. 2006;281(2):688-94.

Allen CM. Animal models of oral candidiasis. A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(2):216-21.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987;14(3):217-27.

Augusto Brondani M, Samim F, Feng H. A conventional microwave oven for denture cleaning: a critical review. *Gerodontology*. 2010.

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10 Suppl 1:E27-39.

Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*. 1999;48(7):671-9.

Balish E, Jensen J, Warner T, Brekke J, Leonard B. Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice. *J Med Vet Mycol*. 1993;31(2):143-54.

Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(1):51-9.

Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis. IV. An experimental model in monkeys. *Acta Odontol Scand*. 1971;29(5):513-26.

Cantorna MT, Balish E. Acquired immunity to systemic candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis*. 1991;164(5):936-43.

Cardash HS, Helft M, Shani A, Marshak B. Prevalence of *Candida albicans* in denture wearers in an Israeli geriatric hospital. *Gerodontology*. 1989;8(4):101-7.

Carter GMK, M.A.; Shepherd, M.G. The rational management of oral candidosis associated with dentures. *N Z Dental Journal*. 1986;82(369):81-4.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001a;183(18):5385-94.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001b;80(3):903-8.

Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(1):59-69.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):377-83.

Coordenação Nacional de Saúde Bucal MdS. Resultados principais do Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Brasília; 2004.

Copping VM, Barelle CJ, Hube B, Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(5):645-54.

da Silva HF, Martins-Filho PR, Piva MR. Denture-related oral mucosal lesions among farmers in a semi-arid Northeastern Region of Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010.

de Oliveira CE, Gasparoto TH, Dionisio TJ, Porto VC, Vieira NA, Santos CF, et al. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont*. 2010;23(2):158-9.

Djeu JY. Cytokines and anti-fungal immunity. *Adv Exp Med Biol*. 1992;319:217-23.

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1387-92.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90.

Dorko E, Baranova Z, Jenca A, Kizek P, Pilipcinec E, Tkacikova L. Diabetes mellitus and candidiasis. *Folia Microbiologica*. 2005;50(3):255-61.

Emami E, de Grandmont P, Rompre PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J Dent Res*. 2008;87(5):440-4.

Feltrin PPT, Nicolau; Jaeger, Ruy Gastaldoni; Araújo, Vera Cavalcanti de. Denture stomatitis: scanning electron microscope study of complete dentures and of the mucosal through cytological, histopathological and immunohistochemical studies Assoc Bras Odont. 1993;1(1):6.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007;34(6):448-55.

Filler SG, Sheppard DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *Plos Pathogens*. 2006;2:1099-105.

Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira EFE. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil*. 2008;35(5):370-4.

Gasparoto TH, Dionisio TJ, de Oliveira CE, Porto VC, Gelani V, Santos CF, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. *J Med Microbiol*. 2009a;58(Pt 7):959-62.

Gasparoto TH, Vieira NA, Porto VC, Campanelli AP, Lara VS. Ageing exacerbates damage of systemic and salivary neutrophils from patients presenting Candida-related denture stomatitis. *Immun Ageing*. 2009b;6:3.

Gasparoto THV, N.A.; Porto, V.C.; Campanelli, A.P.; Lara, V.S. Differences between salivary and blood neutrophils from elderly and young denture wearers. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2011;38(1):41-51.

Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today*. 2009;14(3-4):214-22.

Gedreau L, Loewy, ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J. Prosthodont*, 2011. Epub ahead of print

Geerts GA, Stuhlinger ME, Basson NJ. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. *J Oral Rehabil*. 2008;35(9):664-9.

Golecka M, Oldakowska-Jedynak U, Mierzwinska-Nastalska E, Adamczyk-Sosinska E. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. *Transplant Proc*. 2006;38(1):155-6.

Gonsalves WC, Wrightson AS, Henry RG. Common oral conditions in older persons. *Am Fam Physician*. 2008;78(7):845-52.

Goulart MCV. Hiperplasia papilar: análise quantitativa de *Candida albicans* no revestimento epitelial e sua correlação com as características microscópicas. [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru/ USP; 2009.

Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):465-75.

Han Y, Morrison RP, Cutler JE. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect Immun*. 1998;66(12):5771-6.

Hornbach A, Heyken A, Schild L, Hube B, Löffler J, Kurzai O. The glycosylphosphatidylinositol-anchored protease Sap9 modulates the interaction of *Candida albicans* with human neutrophils. *Infect Immun*. 2009;77(12):5216-24.

Hruskova-Heidingsfeldova O. Secreted proteins of *Candida albicans*. *Frontiers in Bioscience*. 2008;13:7227-42.

Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7(4):336-41.

Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 1994;14(1):87-99.

Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc*. 1992;123(1):46-51.

Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2006;35(8):484-91.

Jones JH, Adams D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. *Br J Dermatol*. 1970;83(6):670-3.

Jorge AO, Totti MA, de Almeida OP, Scully C. Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. *J Oral Pathol Med*. 1993;22(3):138-40.

Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil*. 1997;24(10):788-90.

Lamb DJ, Martin MV. An in vitro and in vivo study of the effect of incorporation of chlorhexidine into autopolymerizing acrylic resin plates upon the growth of *Candida albicans*. *Biomaterials*. 1983;4(3):205-9.

Lemos MMCM. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. *Rev Bras Patol Oral*. 2003;2(1):3-10

- Lermann U, Morschhauser J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology*. 2008;154(Pt 11):3281-95.
- Makihira S, Nikawa H, Nishimura M, Egusa H, Sadamori S, Rahayu RP, et al. Impact of components of denture acrylic resin on gingival cell growth and sensitivity to *Candida albicans* adhesion. *Mycoses*. 2002;45(8):300-5.
- Manning M, Mitchell TG. Morphogenesis of *Candida albicans* and cytoplasmic proteins associated with differences in morphology, strain, or temperature. *J Bacteriol*. 1980;144(1):258-73.
- Martin MV. A comparison of fluconazole and ketoconazole in the treatment of rat palatal candidosis. *J Med Vet Mycol*. 1989;27(2):63-70.
- Martins DBL, S.T.A.; Cargnelutti, J.F.; Olsson, D.C.; Traesel, C.K.; Maciel, R.M.; Lancini, A.R.; Costa, M.M. Efeito de diferentes doses do decanoato de nandrolona no hemograma de ratos Wistar hígdos. 35 Conbravet. Gramado; 2008.
- Mattos BS, Sousa AA, Magalhaes MH, Andre M, Brito EDR. *Candida albicans* in patients with oronasal communication and obturator prostheses. *Braz Dent J*. 2009;20(4):336-40.
- Meiller TF, Hube B, Schild L, Shirtliff ME, Scheper MA, Winkler R, et al. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2009;4(4):e5039.
- Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, d'Ostiani CF, Montagnoli C, Bacci A, et al. Innate and adaptive immunity to *Candida albicans*: A new view of an old paradigm. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16(1):4-7.
- Meri T, Blom AM, Hartmann A, Lenk D, Meri S, Zipfel PF. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect Immun*. 2004;72(11):6633-41.
- Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Del Bel Cury AA, Rodrigues Garcia RC. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*. 2006;96(3):205-11.
-

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003;67(3):400-+.

Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology-Sgm*. 2008;154:3266-80.

Netea MG, Marodi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol*. 2010;31(9):346-53.

Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun*. 2010;78(9):3650-9.

Neville BWD, D. D. ; Allen, C. M. ; Bouquot, J. E. *Fungal and Protozoal Diseases*: Saunders Elsevier; 2009.

Newton A. Denture sore mouth, a possible aetiology. *British Dental Journal*. 1962;112:357-60.

Nikawa H, Kotani H, Sadamori S, Hamada T. Denture stomatitis and ABO blood types. *J Prosthet Dent*. 1991;66(3):391-4.

Oliver BG, Silver PM, White TC. Polyene susceptibility is dependent on nitrogen source in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(6):1302-8.

Olsen I, Bondevik O. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand J Dent Res*. 1978;86(5):392-8.

Pereira-Cenci T, Cury AAD, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: New insights. *Journal of Applied Oral Science*. 2008;16(2):86-94.

Pinto LR. Detecção da expressão dos genes HWP1, ALS1 E ALS3 de *C. albicans*, por meio de RT-PCR em tempo real, após a desinfecção química e por microonda, de resina acrílica para confecção de dentaduras.
Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo; 2010.

Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil*. 2002;29(11):1115-9.

Poulopoulos A, Belazi M, Epivatianos A, Velegraki A, Antoniadis D. The role of *Candida* in inflammatory papillary hyperplasia of the palate. *J Oral Rehabil*. 2007;34(9):685-92.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35(4):340-55.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98(1):53-9.

Rodrigues J, Hofling JF, Azevedo RA, Gabriel DL, Tamashiro W. Production of monoclonal antibodies for detection of a secreted aspartyl proteinase from *Candida* spp. in biologic specimens. *Hybridoma*. 2007;26(4):201-9.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):398-429.

Sanita PV, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Machado AL. Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses*. 2009;52(2):154-60.

Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust Dent J*. 1997;42(5):343-6.

Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-77.

Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Induced palatal candidosis in the wistar rat. *Arch Oral Biol*. 1981;26(10):787-93.

Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Effect on experimental palatal candidosis in the Wistar rat of removal and re-insertion of acrylic appliances. *Arch Oral Biol*. 1986;31(9):617-21.

Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1997;10(1):73-7.

Sidrim JJC RM. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro; 2004.

Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clin Microbiol Infect*. 2010;17(2):264-72.

Sudbery PE. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol*. 2001;41(1):19-31.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.

Trabulsi LRA, F. *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara JP. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2008;46(8):749-72.

van Wyk CW, Basson NJ, Gibson B. Non-inbred Sprague-Dawley germfree rats as a model for oral candidiasis. *J Dent Assoc S Afr*. 1987;42(11):683-7.

Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infection and Immunity*. 2007;75:2126-35.

Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Weitgasser R, Stoiber W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(1):60-4.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J*. 1998a;43(3):160-6.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998b;43(1):45-50.

Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, et al. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. J Clin Invest. 2007;117(12):3664-72.

Williams DW, Jones HS, Allison RT, Potts AJ, Lewis MA. Immunocytochemical detection of Candida albicans in formalin fixed, paraffin embedded material. J Clin Pathol. 1998;51(11):857-9.

Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrecht A, Almeida R, et al. Identifying infection-associated genes of Candida albicans in the postgenomic era. FEMS Yeast Res. 2009;9(5):688-700.

Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. Br Dent J. 1998;185(8):380-4.

Wu T, Samaranayake LP. The expression of secreted aspartyl proteinases of Candida species in human whole saliva. Journal of Medical Microbiology. 1999;48(8):711-20.

Zhu W, Filler SG. Interactions of Candida albicans with epithelial cells. Cell Microbiol. 2010;12(3):273-82.

Apêndice

APÊNDICE A - Tabela de apresentação do pH de todos os animais, avaliados por fita mediadora de pH.

Animal	Grupo Controle pH	Grupo Placa/ <i>Candida</i> pH	Grupo Placa pH
1	9	9	10
2	9	9	10
3	9	10	9
4	10	9	9
5	10	9	9
6		10	9
7		9	9
8		9	9
9		9	9
10		9	9
11		9	10
12		9	9
13		10	9
14		9	9
15		9	9
16		10	10
17		9	10
18		9	9
19		9	
20		9	
21		9	
22		9	
23		9	
24		9	
25		9	
26		9	

APÊNDICE B – Tabela de apresentação da concentração de RNA de cada período (2, 4 e 6 dias) do Grupo Placa/*Candida* e da qualidade mensurada pela razão A260/280 pelo aparelho *nanodrop*.

	[] de RNA (ng)	Qualidade A260/280
2 dias	21.0	1.91
4 dias	15.0	1.71
6 dias	25.0	1.82

Anexo

Universidade
Estadual de Londrina

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 150/2010

Londrina, 08 de dezembro de 2010

Prezada Pesquisadora

O CEEA/UEL, reunido aos 10 de agosto do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da expressão gênica da proteína aspartil secretada 2, 5 e 9 (SAP-2, SAP-5 e SAP-9) e sua correlação com a invasão epitelial por *Cândida albicans* em modelo experimental de estomatite protética *in vivo***", registrado no CEEA sob o nº 41 /10, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 120 ratos Wistar, machos, com peso de 300 gramas, com procedência do Biotério Central do CCB. Os animais serão divididos em 6 grupos com 20 animais cada. Todos os animais farão uso de placas acrílicas, semelhantes a próteses totais superiores, para a indução de lesão de EPC (estomatite protética por *Cândida*). Em três grupos haverá a presença de biofilme de *Cândida* na superfície da prótese. Será avaliado 3 tempos a cada 7, 14, 21 dias, dois grupos de 20 animais, com e sem biofilme. Serão submetidos a determinação de pH bucal, coleta de material bucal e moldagem; instalação de prótese removível e remoção da mesma. O projeto está previsto para ser executado entre fevereiro a maio de 2011.

Cumpre orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Prof. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza
Coordenadora do CEEA/UEL

Ima. Sra.
Prof. Dra. Solange de Paula Ramos
Coordenadora do Projeto
Departamento de Histologia
Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL).