MODELO DE INDUÇÃO DE ESTOMATITE PROTÉTICA EM RATOS SOB ANTIBIOTICOTERAPIA

Falyne Kiratcz (BIC/FA/UEPG), Thaís Albach, Victoria Schlumberger Cachoeira, Carolina Yoshi Campos Sugio, Gustavo Simão Moraes, Karin Hermana Neppelenbroek, Vanessa Migliorini Urban (Orientador), e-mail: vanurban@yahoo.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia/Setor de Ciências Biológicas e da Saúde.

Odontologia/Clínica Odontológica

Palavras-chave: estomatite sob prótese, *Candida albicans,* ratos Wistar.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade de dois protocolos na indução de estomatite protética em modelo animal utilizando ratos Wistar imunocompetentes sob antibioticoterapia. Três grupos experimentais foram avaliados: 1. Inoculação + Dispositivo Contaminado (In+Dc) (n=6); 2. Dispositivo estéril (Di) (n=6); 3. Controle negativo (Cn) (n=2). A presença de estomatite protética foi verificada por análise visual do palato e língua e por contagem de colônias (UFC/mL) a partir de coletas feitas no palato dos animais. Os resultados de UFC/mL foram avaliados pelos testes U de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (α=0,05). Maiores alterações (eritema, edema e erosão) foram observadas nos palatos dos ratos do grupo In+Dc. O mesmo foi observado para a avaliação da indução da doença nas línguas (despapilação) dos ratos do grupo In+Dc. Não houve diferença estatisticamente significante entre os regimes antibióticos (p=0,482) para UFC/mL e maiores resultados foram encontrados para o grupo In+Dc, independente do regime antibiótico (p=0,000). Ambos os modelos sob antibioticoterapia com tetraciclina ou amoxicilina/ácido clavulânico induziram significativamente a infecção.

Introdução

A candidose oral é uma infecção fúngica causada por *Candida* spp., mais especificamente por *Candida albicans* (COSTA et al., 2013), e quando relacionada a pacientes que fazem uso de próteses removíveis denomina-se estomatite protética (JOHNSON et al., 2012), afetando aproximadamente 30% a 75% dos usuários de próteses totais (YANO et al., 2016). Outros fatores de risco para a candidose oral são a idade, deficiência de vitaminas, hipossalivação (SAMARANAYAKE et al., 2001), antibioticoterapia (ISHIJIMA et al., 2012), má higienização bucal, uso contínuo da prótese e alteração do pH da saliva (TOBOUTI et al., 2016).

O fungo *C. albicans* tem a capacidade de se organizar em comunidades complexas denominadas biofilme, aderidas a superfícies e encapsuladas por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos (CHANDRA et al., 2001) e, neste microambiente, são capazes de resistir às defesas do hospedeiro e resistir à terapia antifúngica (TOBOUTI et al., 2016).

Considerando a dificuldade do tratamento e fácil recidiva da estomatite protética, muitos estudos realizam em modelo animal a indução e o acompanhamento do período de duração da doença para que suas características sejam melhor conhecidas (YANO et al., 2016). Procurando viabilizar a utilização de dispositivos intra-orais em modelos animais, Hotta et al. (2017) adequaram diversas condições

experimentais como dieta e alojamento, moldagem individual, extensão e fixação dos dispositivos na região posterior do palato dos animais. Outros estudos foram conduzidos com o objetivo de testar dispositivos intra-orais adaptáveis com diferentes finalidades, dentre eles a indução e o tratamento da candidose bucal (COSTA et al., 2013). São encontrados diversos protocolos na literatura, sendo que alguns estudos induzem a doença via contaminação de dispositivos intra-orais (TOBOUTI et al., 2016) e outros por meio da inoculação do fungo diretamente na cavidade bucal dos animais (JUNQUEIRA et al., 2009). No entanto, não há consenso sobre um método que induza e mantenha a infecção durante um período suficiente para a avaliação da efetividade de novos materiais e fármacos.
O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade de dois protocolos na indução de estomatite protética em modelo animal utilizando ratos Wistar imunocompetentes sob antibioticoterapia.

Material e Métodos
Foram triados 28 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), imunocompetentes com 60 a 90 dias de idade e peso entre 250 e 300 g. Os animais foram obtidos do Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI/UEPG, processo 048/2016 – CEUA).
Para a execução dos procedimentos intra-orais, os animais foram submetidos à anestesia geral através da aplicação via intraperitoneal de cloridrato de quetamina 10% e cloridrato de xilazina 2%.
Os animais foram moldados com moldeiras individuais de resina acrílica autopolimerizável incolor utilizando poliéter e os modelos foram vazados com gesso pedra tipo IV. O dispositivo foi encerado e os modelos de trabalho foram incluídos com gesso pedra tipo III em mufla metálica. A resina foi polimerizada de acordo com as recomendações do fabricante. Os dispositivos foram removidos e seu acabamento feito com broca de tungstênio do tipo maxi-cutt e, então, esterilizados em micro-ondas a 650 W por 3 min em 200 mL de água destilada estéril.
Inicialmente, os animais receberam ou: 1. tetraciclina (TTC; Amanda Manipulações Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR) na água de beber na concentração de 0,83 mg/mL durante 7 dias (N=14) ou 2. amoxicilina e ácido clavulânico (AAC; Amanda Manipulações Farmacêuticas) na concentração de 31,25 mg para cada 200 mL (N=14).
Então, foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: 1. Cn (n=2) controle negativo, com animais que não utilizaram dispositivos palatais; 2. Di (n=6) animais que utilizaram dispositivos palatais estéreis por 4 dias; 3. In+Dc (n=6) animais que foram submetidos à inoculação de suspensão de *Candida albicans* no palato e utilizaram dispositivos palatais contaminados com *C. albicans* por 4 dias.
Para a contaminação, cada dispositivo foi colocado individualmente em um orifício de uma placa de cultura de 24 poços, com sua superfície externa voltada para o fundo do poço, sendo imerso em 2 mL do inóculo (≈ 2 x 10^7 UFC/mL). As placas de cultura foram colocadas em incubadora orbital (Shaker - mod. 430/RDBP; Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP) sob velocidade de 75 rpm durante 90 min a 37°C.
Em seguida, as células não aderidas foram removidas por imersão suave dos dispositivos em 2 mL de PBS. Os dispositivos foram imersos em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose em incubadora sob velocidade de 75 rpm durante 48 h a 37ºC. Os dispositivos foram lavados gentilmente em 2 mL de PBS.
Os dispositivos acrílicos intra-orais foram cimentados nos molares utilizando cimento resinoso autoadesivo RelyX™ U200 (3M ESPE., St. Paul, EUA).

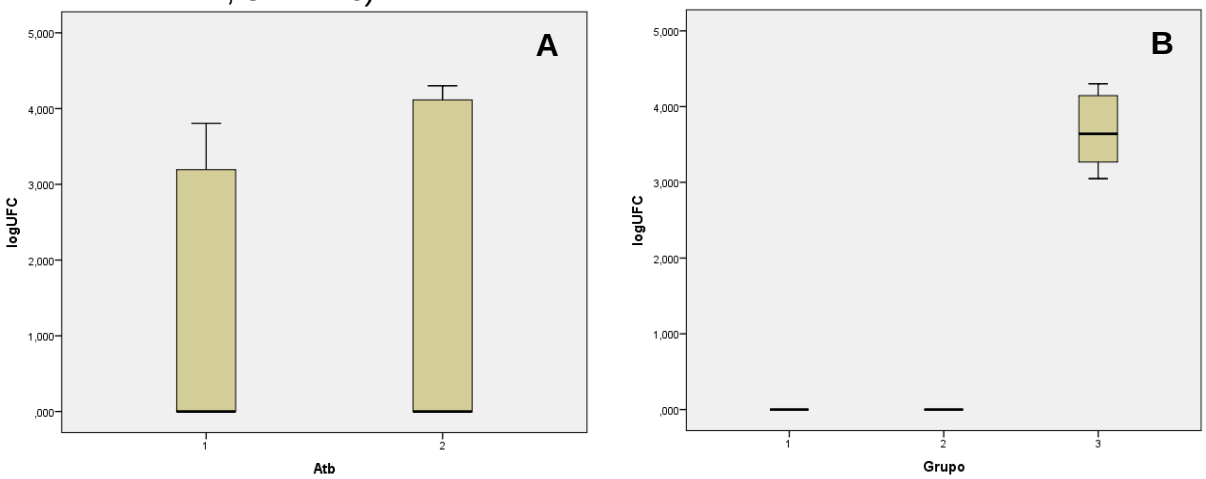
Para os animais que foram inoculados oralmente com *C. albicans* (grupo In + Dc), *swabs* estéreis foram embebidos na suspensão com o inóculo e esfregados sobre o palato dos animais por 30 s e o dispositivo contaminado foi, então, cimentado. Os animais permaneceram com o dispositivo em posição na cavidade bucal por 4 dias (TOBOUTI et al., 2016) e, então, foram removidos.
A presença de estomatite protética foi verificada por análise visual do palato e da língua dos animais por meio de fotografias padronizadas e por contagem de colônias (UFC/mL) a partir de coletas feitas no palato utilizando *swabs* estéreis e semeadura de placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol 0,1 mg/mL. As coletas e as fotografias foram feitas no início do experimento e após o período de indução da candidose de cada grupo (T0).
Para a avaliação do palato, foram atribuídos os seguintes escores: - Eritema: 0 = sem alteração;1 = eritema leve, presente em algumas regiões; 2 = eritema moderado, mais espalhado pelo palato; - Edema: 0 = sem alteração; 1 = pregas palatinas pouco definidas em algumas regiões; 2 = mucosa lisa, sem a presença de pregas palatinas; - Erosão: 0 = sem erosão; 1 = com erosão.
Para a análise macroscópica da língua, a confirmação da presença de candidose foi feita pela observação de áreas de atrofia papilar (JUNQUEIRA et al., 2009). Foram estabelecidos os seguintes escores: 0 = sem alteração; 1 = despapilação leve em algumas regiões; 2 = despapilação moderada, mais espalhada pelo palato; 3 = despapilação severa, língua totalmente acometida.
Os resultados de UFC/mL foram analisados estatisticamente utilizando os testes U de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (α=0,05).

Resultados e Discussão

Foi observado nas imagens obtidas e nos resultados dos escores da avaliação da indução da estomatite protética nos palatos dos animais, maiores alterações (T0) nos palatos dos ratos do grupo In+Dc, independente do regime antibiótico a que foram submetidos. O mesmo foi observado para a avaliação da indução da doença nas línguas dos ratos do grupo In+Dc. Para Eritema, 17% dos palatos avaliados apresentaram escore 2 para os animais que receberam amoxicilina/ácido clavulânico e 17% dos palatos avaliados apresentaram escore 1 para aqueles que receberam tetraciclina. Para Erosão, os animais que receberam amoxicilina/ácido clavulânico e aqueles que receberam tetraciclina apresentaram escore 1 em 17% e 83% dos palatos avaliados, respectivamente. Para Edema, 17% dos palatos avaliados apresentaram escore 1 e 83% apresentaram escore 2 para os animais que receberam amoxicilina/ácido clavulânico e 100% dos palatos avaliados apresentaram escore 2 para aqueles que receberam tetraciclina. Na avaliação das línguas, 33% dos animais apresentaram escore 2 e 50% dos animais apresentaram escore 3 para aqueles que receberam amoxicilina/ácido clavulânico e 33% apresentaram escore 1 e 50% apresentaram escore 2 para aqueles que receberam tetraciclina.
A análise de UFC/mL das coletas realizadas nos palatos confirmaram os resultados da avaliação visual dos palatos e das línguas dos animais. Não houve diferença estatisticamente significante entre os regimes antibióticos (p=0,482; Figura 1A) e maiores resultados de contagem de colônias viáveis foram encontrados para o grupo In+Dc, independente do regime antibiótico (p=0,000; Figura 1B).

ISSN 1676-0093

FIGURA 1 - Resultados médios e desvio padrão de logUFC/mL na comparação entre os antibióticos (A: 1. TTC; 2. AAC) e entre os grupos (B: 1.Cn; 2. Di; 3. In+Dc)



Conclusão

Ambos os modelos animais de estomatite protética por meio de inoculação de *C. albicans* e utilização de dispositivo palatal contaminado com biofilme fúngico sob antibioticoterapia com TTC ou AAC induziram significativamente a infecção.

Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban, à minha co-orientadora Thaís Albach, aos meus amigos Gustavo S. Moraes e Victoria S. Cachoeira e ao BIC/FA/UEPG pela bolsa de iniciação científica e à FAPESP (#2017/22996-1).

Referências

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

COSTA, A. C. et al. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 391-399, 2013.

HOTTA, J. et al. Intraoral device for optimal antifungal delivery in a rat model. **Curr. Drug. Deliv.,** v. 14, n. 5, p. 658-667, 2017.

ISHIJIMA, S. A. et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 7, p. 2190-2199, 2012.

JOHNSON, C. C. et al. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 5, p. 1736-1743, 2012.

JUNQUEIRA, J. C. et al. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 6, p. 877-884, 2009.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 14, n. 2, p. 398-429, 2001.

TOBOUTI, P. L. et al. Expression of secreted aspartyl proteinases in an experimental model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis. **J. Prosthodont.**, v. 25, n. 2, p. 127-134, 2016.

YANO J. et al. Transcription factors Efg1 and Bcr1 regulate biofilm formation and virulence during *Candida albicans*-associated denture stomatitis. **Plos One,** v. 11, n. 7, e0159692, 2016.