# AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO E DURAÇÃO DA CANDIDOSE BUCAL EM MODELOS EXPERIMENTAIS USANDO RATOS WISTAR

Isabella Esser Ramos (PIBIC/Fundação Araucária), Mariana Gomes Kopacheski, Gustavo Simão Moraes, Eduardo Baulm Campanholi, Vanessa Migliorini Urban (Orientadora), e-mail: vanurban@yahoo.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia

**4.02.00.00-0 Odontologia**
**4.02.01.00-7 Clínica Odontológica**

**Palavras-chave:** candidíase oral, *Candida albicans*, ratos Wistar

## Resumo

Este estudo avaliou a efetividade da indução e o período de duração da candidose bucal em modelo animal utilizando ratos Wistar imunocompetentes. Vinte animais foram divididos em cinco grupos (n=4): 1. controle negativo (Cn) - nenhum protocolo; 2. dispositivo intra-oral (Di) - cimentação de dispositivo acrílico nos molares superiores; 3. inoculação (In) - inoculação de suspensão padronizada de *Candida albicans* no palato utilizando *swabs*; 4. Dispositivo intra-oral contaminado (Dc) - cimentação do dispositivo contaminado com *C. albicans*; 5. inoculação + dispositivo intra-oral contaminado (In+Dc) - junção dos protocolos dos grupos In e Dc. Após o período de indução da doença, os ratos foram monitorados durante uma semana para verificar a presença de sinais clínicos de candidose bucal. Foi realizada a contagem de UFC/mL a partir de coletas feitas no palato dos animais. Após eutanásia, os animais tiveram suas línguas removidas cirurgicamente para análise histopatológica. Nas condições utilizadas no presente estudo in vivo, a candidose bucal foi induzida apenas na região de língua dos ratos imunocompetentes e a doença foi observada em até quatro dias após sua indução.

## Introdução

A candidose bucal é considerada a infecção fúngica mais frequente em humanos e, quando associada à utilização de próteses removíveis, é denominada estomatite protética. Sua etiologia é multifatorial, porém a infecção por *Candida* spp., mais especificamente por *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico.
Dentre os substratos em que cepas patógenas como *Candida* spp. se aderem, estão as próteses dentárias removíveis compostas basicamente por acrílicos. Uma vez que a *C. albicans* patogênica tem sido encontrada no biofilme formado na superfície palatal de próteses dentárias acrílicas, a teoria de que a prótese maxilar atua como um reservatório permitindo que o fungo reinfecte continuamente a superfície da mucosa e contribua para a patogênese da estomatite protética pode ser reafirmada.
Alguns estudos têm sido conduzidos com o intuito de desenvolver e testar dispositivos intra-orais adaptáveis à mucosa palatina de ratos com diferentes finalidades, dentre as quais a indução e o tratamento da candidose bucal. São encontrados diversos protocolos na literatura para a indução da candidose bucal em ratos (FOLDVARI et al., 2005; JOHNSON et al., 2012; JUNQUEIRA et al., 2009;

TOBOUTI et al., 2016), 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, dessa forma, dificultando o avanço científico para melhoria do tratamento da estomatite protética; lesão bucal com alta taxa de recidiva.
O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da indução e o período de duração da candidose bucal em modelo animal utilizando ratos Wistar imunocompetentes.

**Materiais e Métodos**

*Animais de experimentação*
Foram utilizados 20 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) (n=4), com idade entre 60 e 90 dias e peso entre 250 g e 300 g. Os animais foram obtidos do Núcleo Avançado de Estudos da Vida da Universidade Estadual de Ponta Grossa (NAEVI/UEPG) (processo 048/2016 - CEUA).

*Grupos experimentais*
Foram avaliados os seguintes grupos experimentais:
1. Controle negativo (Cn): animais saudáveis sem indução de candidose;
2. Dispositivo intra-oral (Di): animais submetidos à cimentação de um dispositivo intra-oral na região dos molares superiores;
3. Inoculação (In): animais submetidos à inoculação oral de suspensão padronizada de *Candida albicans* no palato utilizando *swabs* estéreis;
4. Dispositivo intra-oral contaminado (Dc): animais submetidos à cimentação de dispositivo intra-oral contaminado com *C. albicans*;
5. Inoculação + dispositivo intra-oral contaminado (In+Dc): junção dos protocolos aplicados nos grupos In e Dc.

*Obtenção e contaminação dos dispositivos intra-orais*
Os palatos dos animais foram moldados utilizando uma moldeira individual e poliéter (Impregum F; 3M do Brasil, Campinas, SP) e os modelos de trabalho obtidos foram vazados com gesso pedra especial tipo IV (HOTTA et al., 2016). A extensão do dispositivo foi delimitada no modelo e o enceramento foi deixado liso e plano com 3 mm de espessura na região do palato e na superfície oclusal dos molares e com 2 mm nas suas faces vestibulares.
Os modelos de trabalho encerados foram incluídos convencionalmente com gesso pedra tipo III em mufla metálica nº 6.
Após a eliminação da cera, a resina acrílica termopolimerizável transparente para base de prótese Vipi Cril® (Vipi® Ltda.) foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante e inserida na fase plástica nos moldes de silicone no interior da mufla. A resina foi polimerizada em banho de água em termopolimerizadora de acordo com as recomendações do fabricante.
Após demuflagem, foi feito acabamento com broca de tungstênio cilíndrica do tipo mini-cutt e, em seguida, o polimento da superfície externa foi feito com disco de feltro e escova de algodão contendo pasta polidora universal (Universal Polishing Paste for Resins and Metals; Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Os dispositivos acrílicos foram mantidos em água destilada a 37°C em estufa por 48 h para, então, serem submetidos à esterilização em micro-ondas a 650 W por 3 min.

Para a adesão celular, cada dispositivo foi colocado individualmente em um orifício de uma placa de cultura de 24 poços, sendo imerso em 2 mL do inóculo. As placas de cultura foram colocadas em incubadora com agitação orbital sob velocidade de 75 rpm durante 90 min a 37°C. Em seguida, as células não aderidas foram removidas por meio de lavagem leve dos dispositivos em 2 mL de PBS em duplicata. Os dispositivos foram, então, imersos em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose em incubadora com agitação orbital sob velocidade de 75 rpm durante 24 h a 37ºC. Na sequência, o meio de cultura foi removido e igual volume de novo meio RPMI-1640 foi adicionado para uma nova incubação por 24 h nas mesmas condições. Após as 48 h de incubação, um biofilme maduro foi formado em cada dispositivo. Finalmente, os dispositivos foram lavados gentilmente com 2 mL de PBS em duplicata. O inóculo foi obtido a uma concentração de 2,6 x $10^7$ UFC/Ml.

*Cimentação dos dispositivos intra-orais nos palatos dos animais*
Os dispositivos acrílicos intra-orais contaminados (grupos Dc e In+Dc) ou não (grupo Di) eram levados em posição na cavidade bucal dos animais e sua adaptação era avaliada. A seguir, eram fixados nos molares superiores dos animais utilizando cimento resinoso autoadesivo RelyX$^{TM}$ U200 (3M ESPE; St. Paul, EUA).

*Inoculação de C. albicans no palato dos animais*
Os animais foram inoculados oralmente com blastoporos de *C. albicans* por meio de aplicação tópica. Para isso, *swabs* estéreis foram embebidos na suspensão com o inóculo de *C. albicans* e esfregados sobre o palato dos animais por 30 s.
No caso do grupo In, esse procedimento foi repetido por três dias consecutivos. Para o grupo In+Dc, a inoculação foi feita imediatamente antes da cimentação do dispositivo contaminado no palato dos animais.

*Confirmação da indução da candidose nos animais*
O desenvolvimento e a duração da infecção por *Candida* foram determinados por meio de análise visual, contagem de colônias viáveis e análise histopatológica.
Para a análise visual, os animais foram posicionados em uma maca estabilizadora e fotografias com distância focal e iluminação padronizadas foram obtidas utilizando uma câmera digital (Canon EOS 500D, Canon Inc., NY, EUA) acoplada a uma mesa estativa. A mucosa palatal e a língua dos animais foram fotografas no início do experimento, após o período de indução da candidose de cada grupo (T0) e em dias alternados (T1 e T2) até o sétimo dia após o período da indução antes da eutanásia (T3).
Para a contagem das UFC viáveis, foi coletado o biofilme da mucosa palatal dos animais utilizando *swabs* estéreis e semeadura em ágar Sabouraud Dextrose suplementado com cloranfenicol 0,1 mg/mL.
Após eutanásia, as línguas dos animais foram removidas cirurgicamente, colocadas em frascos contendo solução de formalina 10% contendo PBS pH neutro e encaminhadas para o processamento histológico. As amostras foram processadas e as lâminas obtidas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS).

**Resultados e Discussão**

Não foram observadas alterações tanto na língua como no palato dos animais dos grupos CN e Di. Não foram observadas alterações nos palatos dos animais dos demais grupos. Foram observadas regiões com ausência de papilas nas línguas dos animais dos grupos In, Dc e In+Dc. A severidade dessas alterações foi maior no grupo In+Dc, seguida pelo grupo Dc e finalmente pelo grupo In. As alterações foram observadas em até quatro dias após o período de indução da candidose.
A recuperação da *C. albicans* a partir das coletas dos palatos foi baixa e os maiores valores foram obtidos no grupo In+Dc.
Após o período de acompanhamento de 7 dias, não foi possível detectar alterações nas línguas dos animais em ambas as colorações utilizadas.
Em H.E., não foram encontradas áreas de despapilação, presença de pseudo-hifas ou blastóporos, microabscessos, hiperplasia epitelial ou infiltrado inflamatório em nenhum animal independente do grupo.
Na coloração PAS, também não foram identificadas quaisquer alterações, mesmo que o objetivo da técnica fosse evidenciar a presença de fungos no tecido.

## Conclusões

Não foram observadas alterações clínicas nos palatos dos animais imunocompetentes condizentes com indução de candidose. Foram observadas regiões despapiladas nas línguas dos grupos In, Dc e In+Dc. A severidade dessas alterações foi maior no grupo In+Dc, entretanto, foram visualizadas em até quatro dias após o período de indução da candidose. A recuperação da *C. albicans* a partir das coletas dos palatos foi baixa e os maiores valores foram obtidos no grupo In+Dc. Histologicamente, não foram encontradas alterações condizentes com um quadro de candidose na língua.

## Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa de iniciação concedida.

## Referências

FOLDVARI, M. et al. Efficacy of the antiadhesin octyl O-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-galactopyranosyl)-(1-4)-2-O-propyl-beta-D-galactopy ranoside (Fimbrigal-P) in a rat oral candidiasis model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2887-2894, 2005.
HOTTA, J. et al. Intraoral Device for Optimal Antifungal Delivery in a Rat Model. **Curr Drug Deliv**, 2016. *In Press*
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.
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.