

# RECUPERAÇÃO DE *CANDIDA ALBICANS*, *C. TROPICALIS*, *C. GUILLIERMONDII* E *C. KRUSEI* NA CAVIDADE BUCAL DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS

Marilda Aparecida Gonçalves TOTTI\*

Antonio Olavo Cardoso JORGE\*\*

Oslei Paes de ALMEIDA\*

Elizabete Brasil dos SANTOS\*

- RESUMO: A permanência de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* na cavidade bucal de ratos foi estudada em animais normais e sialoadenectomizados. Os ratos foram inoculados por 4 dias consecutivos com  $10^8$  leveduras, e após 1, 5, 15 e 30 dias da inoculação foi feita a recuperação das amostras da cavidade bucal dos animais. Em ambos os grupos, *C. albicans* foi isolada em maior quantidade em todos os períodos. *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram recuperadas em menor quantidade, não sendo mais isoladas a partir do 5º dia após a inoculação. A xerostomia facilitou a colonização de *C. albicans*, mas não das outras espécies. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem o envolvimento de fatores relacionados à *C. albicans*, que determinaram sua maior colonização na boca dos ratos, o que pode indicar seu maior grau de patogenicidade.
- PALAVRAS-CHAVE: *Candida*; *Candida albicans*; sialoadenectomia; xerostomia.

## Introdução

*C. albicans* é o fungo que mais comumente causa infecções no ser humano. Infecções por outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, têm se destacado nos últimos anos, principalmente em pacientes imunocomprometidos.<sup>4,14,21</sup>

Na cavidade bucal a candidose está associada a fatores sistêmicos ou locais, como diminuição do fluxo salivar e alterações da microbiota bucal.<sup>1,2</sup> *C. albicans* é a espécie mais isolada da cavidade bucal humana, constituindo cerca de 60% a 70% do total de fungos isolados.<sup>3</sup> *C. tropicalis* é a segunda espécie mais isolada, enquanto *C.*

\* Departamento de Diagnóstico Oral – Faculdade de Odontologia – Unicamp – 13414-018 – Piracicaba – SP.

\*\* Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

*krusei* e *C. guilliermondii* são menos frequentes.<sup>11</sup> Nas candidoses bucais, estas espécies também são isoladas, ocorrendo nas lesões na mesma ordem de isolamento da cavidade bucal com saúde.<sup>2</sup>

A colonização, permanência e patogenicidade de *C. albicans* na cavidade bucal de animais foram descritas por vários autores.<sup>6,7,9,17,22</sup> Segundo Olsen & Haanaes,<sup>15</sup> a xerostomia facilitou o desenvolvimento de candidose por *C. albicans* no palato de macacos. Meitner et al.<sup>12</sup> descreveram infecção mais intensa com *C. albicans* na boca e esôfago de ratos, com diminuição do fluxo salivar após uso de drogas. Jorge et al.<sup>6</sup> também relataram que ratos sialoadenectomizados apresentam maior incidência de candidose após inoculação de *C. albicans*. Entretanto, não existem dados na literatura sobre colonização de outras espécies de *Candida* na boca de ratos. O objetivo deste estudo foi verificar a recuperação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* da boca de ratos normais e sialoadenectomizados.

## Material e método

Foram usados 48 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, pesando 50-150 g, provenientes do Biotério Central da Unicamp e não-portadores do gênero *Candida* na cavidade bucal. Os animais foram divididos em quatro grupos de 6 ratos normais e 6 sialoadenectomizados, sendo mantidos individualmente em caixas plásticas e alimentados com ração Labina (Purina) e água *ad libitum*. A remoção das glândulas salivares maiores dos animais foi feita de acordo com Cheyne.<sup>3</sup>

Suspensões contendo  $10^8$  células/0,2 mL de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* foram preparadas a partir de amostras provenientes da disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP, isoladas de pacientes com candidose bucal e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco) a 37°C/48 horas. A quantificação do número de leveduras viáveis na suspensão foi realizada de acordo com Reed et al.,<sup>17</sup> após coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer. Cada grupo recebeu quatro inoculações intrabucais de 0,2 mL da suspensão de cada espécie de *Candida*, em dias consecutivos. A recuperação foi feita da cavidade bucal dos animais após 1, 5, 15 e 30 dias do último inóculo.

A saliva, coletada com auxílio de uma "bolinha" de algodão esterilizada e previamente pesada, foi mantida na boca dos ratos por 5 minutos. A seguir, o material foi colocado em solução fisiológica esterilizada, de forma a completar o volume para 2 mL e agitado em Vortex por 60 segundos. Após diluições até  $10^{-3}$ , alíquotas de 0,1 mL foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (0,1 mg/mL de meio de cultura) em duplicata e incubadas a 37°C/48 horas. Colônias típicas da amostra de *Candida*, que havia sido inoculada, foram contadas nas placas que exibiam 30 a 300 colônias.

Para cada coleta, foi feita a identificação da espécie de *Candida* recuperada em um animal normal e sialoadenectomizado de acordo com Sandven.<sup>20</sup> Os resultados ob-

tidos nas contagens de colônias foram convertidos em logaritmos, e as médias obtidas analisadas pelo teste t-Student, considerando-se nível de significância de 5%.

## Resultado

A recuperação das quatro espécies de *Candida* da cavidade bucal de ratos nos diferentes períodos de coleta e o número de animais que apresentaram leveduras encontram-se na Tabela 1. *C. albicans* foi recuperada em maior quantidade e número de animais em relação às demais espécies. O número de ufc/mL de *C. albicans* foi maior e com diferença estatisticamente significativa em relação às outras espécies, com exceção na coleta após 1 dia da inoculação da *C. tropicalis*, já que apesar de apresentar-se em menor quantidade, esta diferença não foi significativa.

*C. albicans* implantou-se na cavidade bucal dos ratos normais e sialoadenectomizados, sendo recuperada em maior quantidade para todos os períodos nos xerostômicos. Diferença estatisticamente significativa foi observada nos períodos de 1 e 5 dias após inoculação.

As espécies *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* foram recuperadas apenas 1 e 5 dias após inoculação, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os ratos normais e xerostômicos. No período de 15 e 30 dias, nenhuma destas espécies foi recuperada da boca de ratos normais ou xerostômicos.

Tabela 1 – Médias e desvio padrão do logaritmo do número de ufc/mL das diferentes espécies de *Candida* estudadas. As leveduras foram recuperadas da cavidade bucal de ratos normais (N) e sialoadenectomizados (S) 1, 5, 15 e 30 dias após a última inoculação. Os números entre parênteses correspondem aos animais positivos para *Candida* no período correspondente

Espécies	Períodos (dias)							
	1		5		15		30	
<i>C. albicans</i>								
N	3,65 ± 0,23	(6)	3,49 ± 0,45	(6)	2,62 ± 0,63	(6)	1,83 ± 1,55	(4)
S	5,03 ± 0,39*	(6)	5,07 ± 0,24*	(6)	3,23 ± 1,66	(5)	2,74 ± 2,29	(4)
<i>C. tropicalis</i>								
S	3,27 ± 0,44	(6)	0,69 ± 1,10	(2)	0,00	(0)	0,00	(0)
N	3,72 ± 0,81	(6)	0,00	(0)	0,00	(0)	0,00	(0)
<i>C. guilliermondii</i>								
N	0,36 ± 0,89	(1)	1,61 ± 1,31	(4)	0,00	(0)	0,00	(0)
S	0,00	(0)	1,28 ± 1,98	(2)	0,00	(0)	0,00	(0)
<i>C. krusei</i>								
N	0,39 ± 0,95	(1)	0,00	(0)	0,00	(0)	0,00	(0)
S	2,00 ± 1,58	(4)	0,36 ± 0,89	(1)	0,00	(0)	0,00	(0)

\* Valores significativos no nível de 5%, por meio do teste t - Student.

## Discussão

A remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores em ratos causa diminuição de cerca de 60% a 80% do volume salivar.<sup>5,7,13</sup> As glândulas salivares menores, que são preservadas, produzem saliva rica em mucina, a qual recobre a mucosa bucal formando uma película. Não são conhecidas as possíveis alterações que a película de mucina pode sofrer nos animais xerostômicos; entretanto, tais modificações podem ser relevantes para a aderência de leveduras. Por outro lado, a clivagem de IgA por proteases presentes na cavidade bucal parece ser facilitada em presença da xerostomia, sendo esta condição importante em ratos sialoadenectomizados, já que as glândulas salivares menores presentes são responsáveis pela maior quantidade de IgA presente na saliva.<sup>18</sup>

Outros estudos têm demonstrado que a sialoadenectomia favorece a colonização na boca e esôfago de ratos,<sup>12</sup> facilitando a candidose na língua destes animais.<sup>7</sup> Apesar de os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* e de outras espécies do gênero não estarem totalmente estabelecidos, a produção de tubo germinativo,<sup>23</sup> síntese de manoproteína fibrilar e produção de enzimas<sup>10,18</sup> são importantes. Por outro lado, vários fatores e alterações locais induzidas no hospedeiro, incluindo a xerostomia, têm se revelado também muito importantes.<sup>1,2</sup> Moléculas presentes na saliva podem estar envolvidas na aderência de *Candida* ao acrílico de próteses e outras superfícies presentes na boca.<sup>24</sup>

A *C. albicans* foi a espécie que melhor colonizou a boca dos ratos normais e, principalmente, dos sialoadenectomizados. *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* não tiveram facilidade de colonizar a boca dos ratos, preservando-se em pequeno número apenas até 5 dias após a inoculação. A xerostomia facilitou a implantação apenas da *C. albicans* na boca dos ratos, não interferindo nas outras espécies estudadas. Estes resultados indicam que *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* se comportaram de maneira diferente da *C. albicans* na boca dos animais. Assim, pode-se inferir que os fatores neutralizantes da saliva foram mais relevantes para a *C. albicans* que para as outras espécies. Trabalhos analisando a aderência de *Candida* em células epiteliais bucais e coágulos de fibrina demonstraram que a *C. guilliermondii* e a *C. krusei* são espécies com menor capacidade de aderência.<sup>8,16,19</sup> Desta forma, a falta de interação entre receptores destas espécies de leveduras com células epiteliais bucais também parece ser fator importante na aderência.

Os resultados deste trabalho indicam, assim como ocorre no ser humano, que a capacidade de colonizar a boca de ratos varia de acordo com a espécie de *Candida*; mostram, também, que a xerostomia facilitou a colonização de *C. albicans*, mas não das outras espécies. Estudos comparativos como este podem contribuir para melhor compreensão dos mecanismos de aderência das leveduras na mucosa bucal e de sua interação com a saliva.

TOTTI, M. A. G. et al. *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* and *C. krusei* recovery in control and sialoadenectomized rats oral cavity. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.25, n.1, p.119-124, 1996.

- **ABSTRACT:** *The permanency of Candida albicans, C. tropicalis, C. guilliermondii and C. krusei in rats oral cavity was studied in control and sialoadenectomized animals. The rats had been inoculated for 4 consecutive days with 10<sup>8</sup> yeasts; and 1, 5 15 and 30 days after the inoculation the recovery of samples in animals oral cavity was performed. In both the groups, C. albicans was isolated in higher quantity in all the periods. C. guilliermondii, C. tropicalis and C. krusei were recovered in lower quantity and not isolated after the 5th day. The xerostomy facilitated the colonization of C. albicans, but not of other species. The data obtained in the present study suggest the involvement of related factors that determined the higher colonization in rats mouth, what can indicate its elevated degree of pathogenicity.*
- **KEYWORDS:** *Candida; Candida albicans; sialoadenectomia; xerostomia.*

## Referências bibliográficas

- 1 ALLEN, C. M. Diagnosing and managing oral candidiasis. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.123, p.77-82, 1992
- 2 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.61-9, 1990.
- 3 CHEYNE, V. D. A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation. *J. Dent. Res.*, v.18, p.457-68, 1939.
- 4 HEINDAHL, A., NORD, C. E. Oral yeast infection in immunocompromised and seriously disease patients. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.77-84, 1990.
- 5 ITO, V. S. et al. Efeitos da sialoadenectomia na salivação, consumo de água e ração, peso corporal e mucosa bucal de ratos. *Rev. Ciênc. Biomed. (São Paulo)*, v.14, p.109-16, 1994.
- 6 JORGE, A. O. C. et al. Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. *J. Oral Pathol. Med.*, v.22, p.138-40, 1993.
- 7 \_\_\_\_\_. Oral candidiasis established in the sialoadenectomized rat. *J. Oral Pathol. Med.*, v.22, p.54-6, 1993.
- 8 KING, R. D., LEE, J. C., MORRIS, A. L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.*, v.27, p.667-74, 1980.
- 9 LACASSE, M. et al. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J. Oral Pathol. Med.*, v.19, p.136-41, 1990.
- 10 McCOURTIE, J., DOUGLAS, L. J. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. *J. Gen. Microbiol.*, v.131, p.495-503, 1985.
- 11 MACFARLANE, T. W. Ecology and epidemiology of *Candida*. In: SAMARANAYAKE, L. P., MACFARLANE, T. W. *Oral candidosis*. London: Wright, 1990. p.21-46.
- 12 MEITNER, S. W., BOWEN, W. H., HAIDARIS, C. G. Oral and esophageal *Candida albicans* infection in hyposalivatory rats. *Infect. Immun.*, v.58, p.2228-36, 1990.
- 13 NAVARRO, C. M. *Efeitos da sialoadenectomia na carcinogênese bucal de ratos provocada pelo óxido de nitroquinolina (4NQO)*. Piracicaba, 1992. 111p. (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia, Universidade de Campinas.

- 14 ODDS, F. C. et al. Carriage of *Candida* species and *Candida albicans* biotypes in patients undergoing chemotherapy or bone marrow transplantation for haematological disease. *J. Clin. Pathol.*, v.42, p.1259-66, 1989.
- 15 OLSEN, I., HAANAES, H. R. Experimental palatal candidosis and saliva flow in monkeys. *Scand. J. Dent. Res.*, v.85, p.135-41, 1977.
- 16 RAY, T. L., DIGRE, K. B., PAYNE, C. D. Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity. *J. Invest. Dermatol.*, v.83, p.37-41, 1984.
- 17 REED, M. F. et al. In vivo effects of *Candida albicans* products on rat oral epithelium. *J. Oral Pathol. Med.*, v.19, p.326-9, 1990.
- 18 RÜCHEL, R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeast of the genus *Candida*. *Microbiol. Sci.*, v.3, p.316-9, 1986.
- 19 SAMARANAYAKE, L. P., MCLAUGHLIN, L., MACFARLANE, T. W. Adherence of *Candida* species to fibrin clots in vitro. *Mycopathologia*, v.102, p.135-8, 1988.
- 20 SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.27-36, 1990.
- 21 SCULLY, C., EL-KABIR, M., SAMARANAYAKE, L. P. *Candida* and candidosis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.5, p.124-58, 1994.
- 22 SHAKIR, B. S., SMITH, C. J., MARTIN, M. V. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the Wistar rat. *J. Oral Pathol. Med.*, v.15, p.375-80, 1986.
- 23 TRONCHIN, G. et al. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesives. *Infect. Immun.*, v.56, p.1987-93, 1988.
- 24 YOON, K. J., EDGERTON, M., LEVINE, M. J. Binding of *Candida albicans* to human saliva and acquired pellicles. *J. Dent. Res.*, v.68, sp. iss., p.355, 1989.