

PATRÍCIA COSTA SANTOS ALVES

**AÇÃO ANTI-FÚNGICA E IMUNOMODULADORA DE  
*Punica granatum* L. ASSEGURA A SOBREVIVÊNCIA NA SEPSE  
POR *Candida albicans***

São Luís

2019

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Mestrado

PATRÍCIA COSTA SANTOS ALVES

**AÇÃO ANTI-FÚNGICA E IMUNOMODULADORA DE  
*Punica granatum* L. ASSEGURA A SOBREVIVÊNCIA NA SEPSE  
POR *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

COSTA SANTOS ALVES, PATRICIA.

AÇÃO ANTI-FÚNGICA E IMUNOMODULADORA DE *Punica granatum*  
L. ASSEGURA A SOBREVIVÊNCIA NA SEPSE POR *Candida albicans* /  
PATRICIA COSTA SANTOS ALVES. - 2019.

81 f.

Orientador(a): ROSANE NASSAR MEIRELES GUERRA.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
SÃO LUÍS, 2019.

1. *Candida albicans*. 2. Imunomodulação. 3.  
Neutrófilos. 4. *Punica granatum* L. 5. Sepse. I. NASSAR  
MEIRELES GUERRA, ROSANE. II. Título.

PATRÍCIA COSTA SANTOS ALVES

**AÇÃO ANTI-FÚNGICA E IMUNOMODULADORA DE  
*Punica granatum*L. ASSEGURA A SOBREVIDA NA SEPSE  
POR *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Rosane Nassar Meireles Guerra  
(Orientadora –Universidade Federal do Maranhão)

---

Cristina de Andrade Monteiro  
(Universidade CEUMA)

---

Mayara Cristina Silva Pinto  
(Universidade Federal do Maranhão)

---

Lucilene Amorim Silva  
(Universidade Federal do Maranhão)

*Todas as coisas cooperam para o  
bem daqueles que amam a Cristo.*

*Romanos 8:28*

**AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar sou grata a Deus por todas as oportunidades, pois verdadeiramente até aqui me ajudou o Senhor e sem ele nada seria ou teria.

Meus sinceros agradecimentos também as minhas queridas Professoras Rosane Guerra (orientadora) e Márcia Maciel (co-orientadora) que foram minhas colunas fortes e meus exemplos enquanto pesquisadoras.

Ao meu amado esposo Adonias Júnior por todo o companheirismo, cumplicidade e paciência.

Aos meus pais Josely e Maria do Amparo, assim como meus avós pela base familiar, amor, educação, investimento e por sempre me apoiarem desde sempre.

As professoras Flávia Nascimento, Lucilene Amorim, Ana Paula Azevedo e ao professor Paulo Vitor Soeiro pelo suporte e por estarem dispostos a ajudar sempre.

As professoras Mayara Silva e Thiare Fortes pelo suporte no laboratório e também no plantão tira dúvidas, assim como todos os demais alunos e professores da grandiosa família LIF.

Aos meus amigos de mestrado, em especial aqueles da família LIF que fizeram os meus dias mais felizes: Liana, Aluisio, Douglas, Lilian, Jeferson e André. Com certeza vocês foram um presente de Deus.

A Carlene Peixoto e Dona Joana pela disposição em ajudar e pelas palavras de carinho.

Ao Instituto Florence de Ensino Superior na pessoa do Coordenador de farmácia Luiz Fernando Ramos e as amigas Elizangela Motta e Camila Biberg, o apoio de vocês foi fundamental.

E a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

### REFERÊNCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1-</b> Critérios da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) .....	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b> Critérios e respectivas pontuações para o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). .....	<b>19</b>
<b>Figura 3-</b> Receptores celulares e intracelulares necessários para o reconhecimento de produtos microbianos e de danos teciduais.....	<b>22</b>
<b>Figura 4-</b> Aspectos morfológicos de <i>C. albicans</i> .....	<b>24</b>
<b>Figura 5-</b> Mecanismo de colonização por <i>C. albicans</i> . .....	<b>25</b>
<b>Figura 6-</b> Mecanismo de invasão tecidual por <i>C. albicans</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 7-</b> Arbusto de <i>Punica granatum</i> L. ....	<b>28</b>
<b>Figura 8-</b> Estrutura química dos compostos principais da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> L. ....	<b>30</b>

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1-</b> Concentração de IL-10 do soro de animais imunossuprimidos com dexametasona 5mg/kg; ciclofosfamida 50 mg/kg; ou ciclofosfamida 100 mg/kg .....	<b>43</b>
<b>Figura 2-</b> Sobrevida dos animais infectados com <i>Candida albicans</i> .....	<b>44</b>

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1-</b> Quantificação de neutrófilos e células dendríticas no peritônio .....	<b>59</b>
<b>Figura 2-</b> Quantificação de linfócitos T; B; e macrófagos no baço.....	<b>60</b>
<b>Figura 3-</b> Atividade antifúngica do extrato das cascas do fruto de <i>Punica granatum</i> L. (EPG) .....	<b>62</b>
<b>Figura 4-</b> Efeito do extrato da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> L. na sobrevida de animais com sepse induzida por <i>C. albicans</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 5-</b> Unidades formadoras de colônias (UFC) avaliadas 48 h após a infecção no sangue (A) e no peritônio (B) de animais imunossuprimidos com sepse por <i>C. albicans</i> . .....	<b>64</b>
<b>Figura 6-</b> Número de células do peritônio (A), baço (B), medula (C) e lavado broncoalveolar (BAL) (D) em animais imunossuprimidos e com sepse por <i>C. albicans</i> .....	<b>66</b>

<b>Figura 7-</b> Contagem diferencial das células peritoneais (A) e do lavado bronco-alveolar BAL (B) em animais imunossuprimidos com sepse por <i>C. albicans</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 8-</b> Ativação de células dendríticas, macrófagos e neutrófilos no peritônio de animais imunossuprimidos e com sepse por <i>C. albicans</i> .....	<b>68</b>
<b>Figura 9-</b> Imufenotipagem de células do baço em animais imunossuprimidos e com sepse por <i>C. albicans</i> .....	<b>69</b>
<b>Figura 10-</b> Dosagem de citocinas do soro e lavado peritoneal de animais imunossuprimidos e com sepse por <i>C.albicans</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 11-</b> Produção de peróxido de hidrogênio (A) e óxido nítrico (b) em animais imunossuprimidos e com sepse por <i>C.albicans</i> .....	<b>72</b>



## ISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1**-Descrição dos grupos de animais utilizados no experimento de padronização da imunossupressão farmacológica .....41

**Tabela 2**-Contagem diferencial sanguínea em camundongos submetidos à imunossupressão farmacológica com dexametasona e ciclofosfamida .....43

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Pannel de marcadores para as células do peritônio e do baço .....58

**Tabela 2**-Atividade anti-*Candidaalbicans* *in vitro* do extrato da casca dos frutos de *Punica granatum*L.....62

**Tabela 3** –Efeito do extrato da casca do fruto de *Punica granatum*L. na contagem diferencialm no sangue de camundongos imunossuprimidos com sepse por *C. albicans* .....65

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1**-Medicamentos indicados para o tratamento de infecções fúngicas .....27

**Quadro 1.** Protocolo de tratamento para avaliar a sobrevida dos animais imunossuprimidos, infectados com *C.albicans* tratados ou não com extrato das cascas do fruto de *Punica granatum*L. em diferentes intervalos ..... **55**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANFO- Anfotericina B

CFU- Unidades formadoras de colônias

CLP-Ligadura e perfuração cecal

CLR- Receptor de lectina C

EPG- Extrato da casca dos frutos de *Punica granatum*

HIV-Vírus da Imunodeficiência Humana

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Peróxido de hidrogênio

IFN- $\gamma$ - Interferon gama

IL-Interleucina

JAK- Janus quinase

LIF- Laboratório de Imunofisiologia

NF-KB- Fator de transcrição nuclear kappa B

NLR- Receptor semelhante à NOD

Nrf2- Fator de transcrição

NO-Óxido Nítrico

PAMP- Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PH- PontencialHidrogeniônico

PRR- Receptores de Reconhecimento de Padrão

ROS- Especie Reativa de Oxigênio

RNS- Especie Reativa de Nitrogênio

SIRS- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

TNF- $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral alfa

TLR- Receptor semelhante do tipo Toll-like

UTI- Unidade de terapia Intensiva

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Referencial teórico</b> .....	<b>17</b>
2.1 Sepsis .....	17
2.2 Sepsis por <i>Candida albicans</i> .....	23
2.3 <i>Punica granatum L.</i> .....	27
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>31</b>
3.1 Objetivo geral .....	31
3.2 Objetivos específicos .....	31
<b>Referências bibliográficas</b>	
<b>4. Resultados</b> .....	<b>37</b>
4.1 <b>Capítulo 1-</b> Caracterização do modelo de imunossupressão farmacológica em animais outbred. ....	<b>37</b>
4.2 <b>Capítulo 2-</b> <i>Punica granatum</i> (Romã) mantém a sobrevivência de animais imunossuprimidos com sepsis letal induzida por <i>Candida albicans</i> .....	<b>50</b>
<b>Anexos</b>	

## RESUMO

A Sepsé pode ser caracterizada como uma resposta inflamatória sistêmica induzida por um agente infeccioso, sendo que *Candidaalbicans* é um dos fungos mais comumente relacionado, principalmente em pacientes imunossuprimidos. Investigamos o efeito do extrato padronizado das cascas dos frutos de *Punica granatum* L. (EPG) em modelo de sepsé letal, induzida por *C.albicans*, em camundongos imunossuprimidos. Inicialmente estabelecemos um novo modelo de sepsé letal por *C. albicans* em camundongos outbred. Em seguida, avaliamos os efeitos do EPG como agente anti-*Candida* e sua ação na sobrevivência e na ativação do sistema imunológico em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida. Observamos que o inóculo de  $3 \times 10^8$  UFC/ml de *C. albicans* foi letal para todos os animais em até 3 dias. Entretanto, o tratamento com EPG, reverteu essa letalidade e assegurou a sobrevivência de todos os animais, possivelmente devido a sua ação anti-fúngica. O tratamento com EPG reverteu a imunossupressão, aumentando a celularidade na medula e o número de neutrófilos no peritônio. No baço apesar de não ocorrer aumento no número total de células, detectamos aumento no número de linfócitos T auxiliares e linfócitos B ativados. Além disso, o tratamento com EPG reduziu a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) e aumentou a produção de IL-17, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Concluímos que o EPG é um extrato promissor na busca de agentes para tratar sepsé por *C. albicans* devido aos seus efeitos antimicrobianos e imunomoduladores, pois em dose única, foi capaz de simultaneamente controlar a sepsé letal induzida por *C. albicans* e reverter a imunossupressão ocasionada pelo uso de ciclofosfamida além de ativar linfócitos Th1 e Th17, atividades que podem estar relacionadas ao elevado teor de compostos fenólicos, e em especial a punicalagina e ácido elágico, presentes no extrato.

**Palavra-chave:** Sepsé, *Candidaalbicans*, *Punica granatum*L, imunomodulação, neutrófilos, IL-17.

## ABSTRACT

Sepsis can be characterized as an inflammatory response induced by an infectious agent and *Candida albicans* is one of the fungi most commonly associated with sepsis, mainly in immunosuppressed patients. We investigated the effect of the standardized extract of the peels of the fruits of *Punicagranatum* L. (EPG) on lethal sepsis model induced by *C. albicans* in immunosuppressed mice. We initially established the model of lethal sepsis by *C. albicans* in outbred mice, since only there were models with inbred lineage. We then evaluated the effects of EPG as an anti-*Candida* agent and its action on survival and activation of the immune system in immunosuppressed mice with cyclophosphamide. We observed that the inoculum of  $3 \times 10^8$  CFU / ml of *C. albicans* was lethal to all animals within 3 days. However, treatment with EPG reversed this lethality and ensured the survival of all animals, possibly due to their antifungal action. Treatment with EPG reversed immunosuppression, increasing cellularity in the cord and the number of neutrophils in the peritoneum. In the spleen despite no increase in total number of cells, we detected an increase in the number of helper T lymphocytes and activated B lymphocytes. In addition, EPG treatment reduced the production of nitric oxide (NO) and oxygen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and increased the production of IL-17, IL-6 and TNF- $\alpha$ . We conclude that EPG is a promising extract in the search for agents to treat sepsis by *C. albicans* due to its antimicrobial and immunomodulatory effects, since in a single dose it was able to simultaneously control the lethal sepsis induced by *C. albicans* and to reverse the immunosuppression caused by the use of cyclophosphamide and activating Th1 and Th17 lymphocytes, activities that may be related to the high content of phenolic compounds, and especially punicalagin and ellagic acid, present in the extract.

**Key words:** Sepsis, *Candidaalbicans*, *Punica granatum* L, immunomodulation, neutrophils, IL-17.