

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

**EFEITO DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy EM MODELO DE SEPSE LETAL
INDUZIDA POR *Candida albicans***

ARTHUR ANDRÉ CASTRO DA COSTA

São Luís - MA
2021

ARTHUR ANDRÉ CASTRO DA COSTA

**EFEITO DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy EM MODELO DE SEPSE LETAL
INDUZIDA POR *Candida albicans***

Dissertação de Mestrado 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.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane
Nassar Meireles Guerra

Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada ao estudo de produtos naturais.

São Luís – MA,
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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

André Castro da Costa, Arthur.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Vismia guianensis* Aubl. Chosy
EM MODELOS DE INFECÇÃO LETAL POR *Candida albicans* / Arthur
André Castro da Costa. - 2021.

82 p.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2021.

1. Antifúngico. 2. *Candida albicans*. 3. Sepsis. 4.
Tenebrio molitor. 5. *Vismia guianensis*. I. Nassar
Meireles Guerra, Rosane. II. Título.

ARTHUR ANDRÉ CASTRO DA COSTA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Vismia guianensis* (AUBL.) CHOSY EM MODELOS
DE INFEÇÃO LETAL POR *Candida albicans***

Aprovada em: 02 / 07 /2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva
1º Examinador

Profa. Dra. Marcia Cristina Goncalves Maciel
2º Examinador

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto Silva
3º Examinador

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Orientadora

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus Pais que sempre foram o meu alicerce, um porto seguro; e aos meus amigos e irmãos lifianos que muitas vezes foram meus braços, e os abraços afetuosos quando mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a DEUS, quem tenho por Pai e Amigo, e a Quem tudo devo. Sua presença me foi tangível e Seu auxílio foi essencial para as pequenas e grandes batalhas na vida acadêmica.

Quero, de coração, agradecer a meus pais: Neuzivania Santos Castro e Josué Araújo da Costa, que sempre me foram um porto seguro, meu ponto de apoio, um estímulo na dedicação dos meus esforços por uma vida melhor, e sinto-me lisonjeado em ter pais que olham para a Educação como o melhor caminho.

Também quero agradecer à minha namorada, amiga e cúmplice Aline Santana Figueredo, a quem detenho um carinho especial. Aline, dentre todos, você foi a pessoa que esteve mais próximo de mim, e quem esteve comigo nos meus melhores e piores dias. Meu muito obrigado, por sua ajuda neste trabalho e por todo seu amor e carinho.

Quero muito agradecer à professora Dra. e querida orientadora Rosane Nassar Meireles Guerra, por ter me acolhido como seu aluno, e pela paciência de ter me ensinado com tanto carinho e riqueza de detalhes. Profa., a senhora é uma pessoa maravilhosa (não poderia deixar de dizer isso), e excelente professora seria pouco para lhe qualificar, seus ensinamentos ultrapassam a academia e quero-os levar para toda a vida. Profa, você é uma inspiração pra mim e para todos, por isso meu muito obrigado!!!

Também dedico meus agradecimentos a grande família LIF, com quem estou a 10 anos (LIF, LPI e LIAC), pela convivência e parceria diária, mas em especial aos amigos Alex, Pâmela, Simone, Nicolle, Aluísio, Andrea, à professora dra. Mayara Cristina Pinto Silva e à professora dra. Elisângela Araújo Pestana Motta, com destaque mais que especial para Josivan Régis Farias e Danielle Cristine Gomes Franco, que estiveram comigo desde o início e foram meus braços na hora do trabalho, mas também o abraço amigo na hora das dificuldades e do lazer. Pessoal sem vocês nada disso seria possível, então deixo aqui meus agradecimentos.

Gostaria de agradecer aos meus antigos orientadores: Wanderson Silva Pereira, que foi a pessoa que mostrou a pesquisa e responsável pelos primeiros ensinamentos, e à Professora Flávia Raquel Fernandes Nascimento que foi fundamental na minha evolução acadêmica e profissional. A vocês deixo o meu agradecimento

E meus sinceros sentimentos às famílias das vítimas pelo Covid-19.

EPÍGRAFE

Eu aprendi qual é o valor de um sonho alcançar
Eu entendi que o caminho Pedras terá
Eu vi em campo aberto se erguer construção
E foi com muitas pedras
E foi com muitas mãos

Eu vi o meu limite vir diante de mim
Eu enfrentei batalhas que eu não venci
Mas o troféu não é só pra quem não fracassar
Eu tive muitas quedas
Mas não fiquei no chão

E ao olhar pra trás
Tudo que passou
Posso agradecer quem comigo estava
Ergo minhas mãos
Pra reconhecer

Que hoje eu sou
Quem eu sou
Pois Sua mão me acompanhava
Mas eu sei
Não é o fim
É só o começo da jornada
E eu abro o meu coração
Pra uma nova história

Vejo vitórias se hoje eu olho para trás
E a minha frente eu creio que tem muito mais
Eu sei que minha jornada aqui só começou
E ao longo dessa estrada
Sozinho eu não estou

Canção de Vocal Livre: “É só o começo”

RESUMO

Candida albicans é um fungo oportunista responsável por infecções locais ou sistêmica como a sepse. O principal tratamento para sepse fúngica inclui o uso de Fluconazol ou da Anfotericina B, no entanto, a resistência e as reações adversas a esses medicamentos servem como argumento para a busca por tratamentos alternativos, sendo, dentre um destes, a base de espécies vegetais. Neste contexto, *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy, planta conhecida popularmente por pau-de-lacre, apresenta ação antifúngica já comprovada em ensaios *in vitro*, mas a avaliação do seu efeito *in vivo* ainda é pouco explorada. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-*Candida* de *V. guianensis* em infecção letal induzida por *Candida albicans*. Neste estudo foi utilizado o extrato hidroetanólico das folhas de *V. guianensis* (EHVG) e Antraquinona (um dos compostos majoritários do EHVG) para avaliar a ação anti-*Candida* em larvas de *Tenebrio molitor* e camundongos *Swiss*. Nos ensaios com *T. molitor*, as larvas foram divididas em 4 grupos: Controle, ANFO B, EHVG e Antraquinona para avaliação da toxicidade aguda (via injeção intracelômica), avaliação de sobrevida em infecção letal por *Candida albicans* (inóculo 5×10^3 CFU por larva) e avaliação de CFU em infecção sub-letal (5×10^2 CFU por larva). Nos ensaios em camundongos, os animais foram imunossuprimidos com ciclofosfamida [50mg/kg, via intraperitoneal (ip.)], 48 horas antes da infecção. Para a infecção letal foram utilizados blastoconídeos de *C. albicans* (6×10^7 CFU) e a avaliação de sobrevida ocorreu durante 7 dias. O inóculo sub-letal 2×10^7 , via ip., foi utilizado para avaliação imunológica. Os animais foram distribuídos conforme o tratamento nos grupos: CONTROLE: Infectado e não tratado; ANFO B: animais infectados e tratados com Anfotericina B, via ip. (600µg/Kg) e EHVG: infectado e tratados com o extrato, via oral (5mg/Kg) e SHAM: não infectado e não tratado. visando determinar a dose a ser utilizada na infecção letal em camundongos. Os resultados mostraram que EHVG na maior dose (100mg/kg) apresentou toxicidade para 60% nas larvas. Em modelo infecção letal o tratamento com EHVG (5mg/kg) resultou em aumento de sobrevida das larvas de *T. molitor* com efeito semelhante a Anfotericina B. Por outro lado, o tratamento com antraquinona foi menos efetivo que o EHVG. Na infecção sub-letal o tratamento com EHVG (5mg/Kg) reduziu a infecção, indicando que o extrato apresenta ação anti-*Candida* associada ação conjunta de metabólitos secundários. Na avaliação imunológica, 24h após a infecção, considerando a contagem total e diferencial e o número de unidades formadoras de colônias (CFU) de células sanguíneas e do lavado peritoneal (LP). O tratamento com EHVG aumentou a sobrevida (60%) e a expectativa de vida dos camundongos, possivelmente porque reduziu o número de CFU no sangue e no peritônio. O tratamento com EHVG também aumentou a celularidade total no sangue, e o número de neutrófilos. No peritônio o tratamento modulou a população celular, aumentando o recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal. Estes resultados indicam que o EHVG apresenta ação antifúngica e efeito imunomodulador capaz de prolongar a sobrevida de animais invertebrados ou vertebrados infectados com *C. albicans*. Sugerimos que os efeitos benéficos do EHVG na sepse letal estejam relacionados a presença de um fitocomplexo formado por compostos presentes no extrato possivelmente relacionados a presença de Vismiona D, Antraquinona, Catequina e Kaempferol.

Palavras-chave: *Vismia guianensis*; Sepse; *Tenebrio molitor*; *Candida albicans*; Antifúngico, Neutrófilos

ABSTRACT

Candida albicans is an opportunistic fungus responsible for local or systemic infections such as sepsis. The main treatment for fungal sepsis includes the use of Fluconazole or Amphotericin B. However, resistance and adverse reactions to these drugs serve as an argument for the search for alternative treatments, including, among them, the plant species. In this context, *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy, a plant popularly known as “*pau-de-lacre*”, has antifungal action already proven *in vitro*, but its *in vivo* effect is still little explored. Thus, this work aimed to evaluate the effect of *V. guianensis* on lethal infection induced by *Candida albicans*. The anti-*Candida* effect of the hydroethanolic extract of the *V. guianensis* leaves (EHVG) and Anthraquinone (one of the major compounds of EHVG) was evaluated in *Tenebrio molitor* larvae and Swiss mice. The *T. molitor* larvae were divided into 4 groups: Control, ANFO B, EHVG and Anthraquinone for evaluation of acute toxicity and to determine the dose to be used in lethal infection in mice. Treatments and infection occurred by intracellomic route. To determine the EHVG effect on *T. molitor* survival the larvae were lethally infected with *C. albicans* (5×10^5 CFU/mL) and just after treated according the following groups: Control: infected and untreated, ANFO B: Infected and treated with Amphotericin; EHVG: infected and treated with the extract, and Anthraquinone: infected and treated with this chemical compound. For other evaluations the *T. molitor* larvae distributed in the same groups of received a sublethal inoculum (5×10^4 CFU/mL). For mouse trials, the animals were immunosuppressed with cyclophosphamide [50mg/kg, intraperitoneally (ip.)], 48 hours before infection, and the for the lethal infection they received blastoconids of *C. albicans* (6×10^7 CFU, via ip.) and evaluated for 7 days. The immunological evaluation occurred in groups infected with a sublethal inoculum (2×10^7 CFU, via ip.) For the evaluations male Swiss mice were distributed in the following groups: CONTROL: Infected and untreated; ANFO B: animals infected and treated with Amphotericin B (600µg/Kg, via ip.) and EHVG: infected and treated with the extract, (5mg/Kg, orally), and SHAM: uninfected and untreated. The results showed that EHVG at the highest dose (100mg/kg) was toxic to 60% in larvae, but the treatment with low doses of EHVG (5mg/kg) increased survival of *T. molitor* larvae with an effect like Amphoterecin B. In this assay treatment with Anthraquinone was less effective than EHVG. The treatment with EHVG reduced the sub-lethal infection confirming the antifungal effect of this extract as previously described *in vitro*. This antifungal effect may be due to the presence of more than one compound present in the extract. Treatment with EHVG also increased survival (60%) and the life expectancy in mice, possibly because it reduced the number of CFU in the blood and peritoneum. Treatment with EHVG also increased total number of blood leukocytes, mainly neutrophils. In the peritoneum the treatment EHVG increased the recruitment of macrophages. Altogether these results indicate that EHVG presents antifungal action and immunomodulatory effect able to improve the survival of invertebrate or vertebrate animals infected with *C. albicans*. The beneficial effects of EHVG on lethal sepsis are related to the presence of a phytocomplex formed by compounds present in the extract possibly related to the presence of Anthraquinone in association with Vismione, Catechin and Kaempferol.

Keywords: *Vismia guianensis*; Sepsis; *Tenebrio molitor*; *Candida albicans*; antifungal, Neutrophils