

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/03/2018.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



CAROLINE CORADI TONON

TERPINEN-4-OL:

**ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO/ADITIVO, ADESÃO EM CO-CULTURA E
ALTERAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA SOBRE *CANDIDA* SPP**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



CAROLINE CORADI TONON

TERPINEN-4-OL:

**ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO/ADITIVO, ADESÃO EM CO-CULTURA E
ALTERAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA SOBRE *CANDIDA* SPP**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia Área de Biologia Crânio Facial e Biomateriais, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Odontologia.

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise Madalena
Palomari Spolidorio**

Araraquara

2016

Tonon, Caroline Coradi

Terpinen-4-ol: estudo do efeito sinérgico/aditivo, adesão em co-cultura e alteração dos fatores de virulência sobre Candida spp. / Caroline Coradi Tonon. -- Araraquara: [s.n.], 2016.
49 f. : 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Candida albicans 2. Candida tropicalis 3. Biofilmes I. Título

CAROLINE CORADI TONON

**TERPINEN-4-OL:
ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO/ADITIVO, ADESÃO EM CO-CULTURA E
ALTERAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA SOBRE *CANDIDA* SPP**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof.^a Dr.^a Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Cristiane Duque

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Janaína de Cássia Orlandi Sardi

Araraquara, 22 de março de 2016.

DADOS CURRICULARES

CAROLINE CORADI TONON

NASCIMENTO: 07/08/1990 – Jaú – São Paulo

FILIAÇÃO: Luiz Fernando Tonon e Ana Marcia Coradi Tonon

1998 – 2005: Ensino Fundamental

2006 – 2008: Ensino Médio

2009 – 2013: Ensino Superior – Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2014 – 2016: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração Biologia Crânio Facial e Biomateriais, nível Mestrado pela faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2015 – Atual: Especialização em Implantodontia pela Associação Brasileira de Odontologia de Araraquara.

Dedicatória

A Deus

Pela fé, esperança e força concedida e por ter guiado meus passos para que chegassem a este momento.

Aos meus pais

Ao meu pai, Luiz Fernando, que não está mais aqui comigo, mas tenho certeza de que estaria muito orgulhoso de me ver alcançar esta etapa.

À minha mãe, Ana Marcia, meu exemplo e inspiração na vida.

As palavras são poucas para expressar tamanho amor e admiração que tenho por vocês, que me inspiraram a ser um ser humano melhor e buscar por meus objetivos de vida. Por sempre me colocarem em primeiro lugar e buscar o melhor para mim, me dando a oportunidade de realizar meus sonhos. Obrigada pelo apoio incondicional, amizade, carinho e paciência. Vocês são minha base e força.

Às minhas irmãs

Karina e Taís, minhas melhores amigas, que me proporcionam momentos de grande alegria e cumplicidade. Agradeço o companheirismo, o apoio, e a paciência.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio pela orientação, amizade e atenção em todos os momentos. Obrigada pela motivação, na confiança recebida e na liberdade e apoio nas decisões tomadas. Agradeço diariamente pela Mestre paciente que proporcionou anos de trabalho prazerosos e de ótima convivência.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, representados pela digníssima Diretora Prof. Dr. Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice-Diretora Elaine Maria Sgavioli Massucato.

À Coordenação da Pós-Graduação Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior.

À Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi pela atenção, paciência e amizade. Agradeço os ensinamentos na área de Microbiologia, conselhos e atenção dadas a este trabalho.

Aos amigos Renata S. Francisconi e Marco Aurélio Paschoal por todos os ensinamentos no meio acadêmico, tanto laboratoriais, quanto científicos. Agradeço a paciência, a atenção e a disposição em me ensinar. Vocês foram de extrema importância para o meu desenvolvimento como pesquisadora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo (2015/00155-0) e auxílio pesquisa (2015/08742-1) para realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora;

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, José Alexandre e Cristiano pela atenção que sempre nos dispensaram em todos os momentos;

Aos funcionários da Biblioteca por estarem sempre dispostos a nos ajudar;

Às secretárias do Departamento de Fisiologia e Patologia, Silvana e Carla por nos atender sempre com muita eficiência.

Aos funcionários da portaria e seguranças por fazerem das minhas inúmeras entradas e saídas, inclusive aos de finais de semana e feriado, sempre “Bem-Vindas”;

Aos amigos e funcionários José Antônio (Zé), Juliana e Aline pela ajuda concedida em várias etapas do trabalho sempre com muita alegria, paciência e disposição;

Às queridas amigas de laboratório de microbiologia, as “Penélopes”, Renata S. Francisconi, Ester A. F. Boridini e Patrícia M.M. Huacho pelos momentos de trocas de experiências, apoio e amizade;

Aos amigos de Pós-Graduação que ajudaram diretamente para a realização deste trabalho: Marília F. Correia (estatística), Luis Carlos Leal Santana (cultura de células). Renata, Ester e Patty que colocaram a mão na massa tantas vezes junto a mim.

E à todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Tonon C C Terpinen-4-ol: estudo do efeito sinérgico/aditivo, adesão em co-cultura e alteração dos fatores de virulência sobre *Candida* spp [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

O gênero *Candida* pode ser encontrado em até 50% dos indivíduos saudáveis não causando danos aparentes, porém, sob condições predisponentes como doenças sistêmicas ou condições fisiológicas, pode tornar-se patogênico causando inflamação e destruição tecidual. *Candida* spp. na forma de biofilmes são importantes no desenvolvimento de infecções, pois estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos. Terapias alternativas com extratos naturais abrem novas perspectivas para prevenção e controle das doenças bucais na busca de efeitos terapêuticos favoráveis. O Terpinen-4-ol é um monoterpreno que atua na indução da perda da membrana e apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana e atividade anti-inflamatória. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antifúngico, sinérgico/aditivo, inibição da adesão em células orais e alteração dos fatores de virulência do Terpinen-4-ol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Assim, foi realizada a identificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do Terpinen-4-ol sobre cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028) e *C. tropicalis* (ATCC4563), empregando-se o método de microdiluição em caldo. Biofilmes mono e dual-espécies foram preparados usando o modelo de placa de microtitulação estática e quantificados por unidades formadoras de colônias (UFC/mL). O efeito do Terpinen-4-ol na adesão de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi realizado em co-cultura com células orais NOK Si como também os fatores de virulência (proteases, fosfolipases e hemolisina) foram avaliados in vitro. A CIM para Terpinen-4-ol foi 2,31 mg/ml para ambas espécies e a CFM 0,002 mg/ml e 0,004 mg/ml respectivamente para *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Quando testados em combinação houve efeito aditivo e sinergismo (T-4-ol 1,06 mg/ml e Nis 0,00012 mg/ml) para *Candida albicans*. Em biofilme, os resultados apresentaram aditismo para ambas as espécies. O Terpinen-4-ol demonstrou uma redução na adesão de *Candida tropicalis* em células NOK Si, já a Nistatina teve maior efeito tanto para *Candida albicans* quanto para *Candida tropicalis*. Quanto à atividade enzimática, Terpinen-4-ol e Nistatina não demonstraram ação na produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina quando comparados ao grupo controle (sem tratamento). A combinação de Terpinen-4-ol e Nistatina apresentou efeito antifúngico potencializado sobre as duas espécies de *Candida* avaliadas, mostrando efeito sinérgico/modulador em culturas planctônicas e biofilmes. Terpinen-4-ol reduz a adesão de *C. tropicalis* e a Nistatina reduz a adesão de ambas as espécies em células orais imortalizadas (NOK Si). As concentrações sub-inibitorias (CIM₅₀) de Terpinen-4-ol e Nistatina utilizadas não apresentaram atividade na produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina.

Palavras Chave: *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Biofilmes.

Tonon C C Terpinen-4-ol: Study of synergistic / additive effect, adhesion in co-culture and the modification of virulence factors of *Candida* spp [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

ABSTRACT

The genus *Candida* can be found in up to 50% of healthy individuals without causing apparent damage, however, under predisposing conditions such as systemic diseases or physiological conditions, can become pathogenic causing inflammation and tissue destruction. *Candida* spp. in the form of biofilms are important in the development of infections because they are associated with high levels of resistance to antimicrobial agents. Alternative therapies with natural extracts open new perspectives for prevention and control of oral diseases in search of favorable therapeutic effects. The Terpinen-4-ol is a monoterpene engaged in membrane loss of induction and presents broad spectrum of antimicrobial and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to evaluate the antifungal effect, synergistic / additive inhibition of adhesion on oral cells and modification of virulence factors of Terpinen-4-ol of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Thus, the identification of Minimum Inhibitory Concentration was performed (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of Terpinen-4-ol on standard strains *C. albicans* (ATCC 90028) and *C. tropicalis* (ATCC4563), using the method microdilution broth. Biofilms mono and dual-species were prepared using the microtiter plate static model and quantitated by colony forming units (CFU / mL). The effect of Terpinen-4-ol in the adhesion on *C. tropicalis* and *C. albicans* was carried out in co-culture with oral cells NOK Si as well as virulence factors (proteases, phospholipases and hemolysin) were evaluated in vitro. The MIC for Terpinen-4-ol was 2.31 mg / ml for both species and CFM 0.002 mg / ml and 0.004 mg / ml respectively for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. When tested in combination there was synergism and additive effect (T-4-ol 1.06 mg / ml and 0.00012 mg Nis / ml) for *Candida albicans*. In the biofilm, the results presented aditismo for both species. The Terpinen-4-ol was a reduction in adhesion of *Candida tropicalis* on cells NOK Si, Nystatin already had most effective for *Candida albicans* and for *Candida tropicalis*. For enzymatic activity, Terpinen-4-ol and Nystatin showed no action on the production of proteinase, phospholipase and hemolysin when compared to the control group (no treatment). The combination of Terpinen-4-ol and Nystatin presented antifungal effect potentiated on the two *Candida* species evaluated, showing synergistic / modulatory effect on planktonic and biofilm cultures. Terpinen-4-ol reduces the adhesion of *C. tropicalis* and Nystatin reduces the adhesion of both species in oral immortalized cells (NOK Si). The sub-inhibitory concentrations (MIC50) of Terpinen-4-ol and Nystatin used did not show activity in the production of proteinase, phospholipase and hemolysin.

Key words: *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Biofilm.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	14
3 PUBLICAÇÃO	15
4 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICE A – Material e Método.....	38

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans e espécies relacionadas são patógenos oportunistas capazes de causar infecções variando desde desordens mucocutâneas não comprometedoras ao indivíduo até doenças invasivas envolvendo múltiplos órgãos. A frequência dessas infecções vem aumentando mundialmente devido a uma multiplicidade de fatores predisponentes, os quais incluem doenças sistêmicas (diabetes e AIDS), condições fisiológicas (gravidez, infância ou idade avançada), fatores nutricionais, tratamento com antibióticos de amplo espectro, drogas imunossupressoras e corticosteróides, e alguns fatores locais como xerostomia e uso de aparelhos protéticos (Tekeli et al.⁵⁴, 2004; Manfredi et al.³⁶, 2006).

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas e 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos (Eggimann et al.¹⁹, 2003) como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* (Akpan, Morgan⁴, 2002; Farah et al.²⁰, 2000). *Candida albicans*, a principal espécie relacionada à candidíase oral, apresenta fatores de patogenicidade que predispõe, com maior frequência, o aparecimento das infecções. (Mayer et al.³⁷, 2013). Devido a essa grande incidência de infecções fúngicas, observa-se diversas dificuldades não apenas no diagnóstico, mas também no tratamento capaz de controlar esse tipo de infecção (Girois et al.²², 2006).

Esses microrganismos, quando incorporados a uma matriz de substâncias poliméricas compõem o biofilme que é definido como uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolônias irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda uma às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, realizando trocas metabólicas e genéticas intra e interespecies (Donlan, Costerton¹⁷, 2002). Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, pois servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (Donlan¹⁶, 2001; Kuhn et al.³¹, 2002).

Uma vez na cavidade bucal, as espécies de *Candida* encontram diversos locais de mucosas onde podem aderir-se, língua ou superfícies dos dentes, próteses fixas e/ou removíveis e de outros microrganismos que já colonizam estas superfícies, promovendo ancoragem para hifas e permitindo seu crescimento pelo tecido epitelial (Vitkov et al.⁵⁶

2002). Para iniciar a doença, estas devem aderir a células epiteliais da mucosa bucal e subsequentemente, invadir e destruir estas células (Farah et al.²⁰, 2000). A adesão ao tecido hospedeiro é o primeiro passo no processo patogênico e os mecanismos de adesão por *Candida* ssp. aos diferentes tipos celulares ou superfícies são complexos e se dá pela combinação de receptores e mecanismos não específicos (forças eletrostáticas, agregação e hidrofobia da superfície celular) (Manfredi et al.³⁶, 2006). A adesão envolve interações entre as células fúngicas e as superfícies do hospedeiro (Cannon, Chaffin⁸, 2001), sendo promovida por alguns componentes da parede celular do fungo como manose, receptores C3d, manoproteínas, sacarinas e adesinas. O grau de hidrofobicidade e a habilidade de se ligar à fibronectina do hospedeiro também são relatados como importantes mecanismos utilizados nos estágios iniciais da infecção (Akpan, Morgan⁴, 2002).

Candida ssp. podem produzir fatores de virulência que facilitam sua proliferação e consequentemente, a adesão no epitélio e invasão do tecido conjuntivo. Exoenzimas são produzidas para melhorar sua capacidade de colonizar e estabelecer infecções (Willis et al.⁵⁸, 2001; Sardi et al.⁴⁹, 2010), tais como aspartil protease secretada e fosfolipases, que degradam imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular, inibem a fagocitose por neutrófilos e induzem reações inflamatórias (Reynaud et al.⁴⁶, 2001; Hube et al.²⁶, 1998). Outro fator de virulência está relacionado à aquisição de ferro, elemento essencial para muitos microrganismos, e sua absorção pode desempenhar um papel especial em infecções (Ramanan, Wang⁴⁵, 2000). A secreção de hemolisina, seguida de aquisição de ferro, facilita a invasão de hifas e o desenvolvimento de candidíase disseminada (Tsang et al.⁵⁵, 2007).

Os agentes antifúngicos mais utilizados na prevenção e tratamento contra o gênero *Candida* são a anfotericina B, nistatina e fluconazol. A nistatina, usada no tratamento do candidíase oral, é um antifúngico poliênico, com características fungicidas e fungistática (Cione et al.¹³, 2010), atua desestruturando a membrana celular de fungos e leveduras e age na permeabilidade da membrana celular (Lavra et al.²⁹, 2008). Porém, estudos têm demonstrado a existência de *C. albicans* resistentes e que alguns medicamentos ocasionam lesões nos rins e fígado (Chami et al.¹², 2004; Rosato et al.⁴⁷, 2009). Além disso, deve-se destacar o fato do desenvolvimento da resistência microbiana ser crescente, ocasionado por mutações, permitindo que os medicamentos existentes atuem apenas em parte da população microbiana (Mohamadi et al.³⁸, 2014).

Assim, o uso de extratos vegetais e compostos fitoquímicos vem ganhando força na medicina, sendo que uma grande porcentagem das novas moléculas descobertas, com vistas à sua introdução na indústria farmacêutica, provém de constituintes de plantas e/ou derivados semi-sintéticos. Estudos com produtos de origem natural apresentaram resultados entusiasmantes sobre os patógenos bucais, no controle da resposta inflamatória mostrando que estes agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas (Abe et al.¹, 2003; Alessi et al.⁵, 1995; Catalán et al.¹¹, 2008; Duarte et al.¹⁸, 2006; Maggi et al.³⁶, 2009.)

O Terpinen-4-ol atua na indução da perda da membrana, interferindo na integridade e na fisiologia da célula do microrganismo (Oliveira et al.⁴², 2011). O mesmo apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana e atividade anti-inflamatória (Sun et al.⁵², 2012, Nogueira et al.³⁷, 2014). O Terpinen-4-ol é um monoterpene encontrado em outras plantas além da *Melaleuca alternifolia*, tais como *Hajeb Layoun arboreta* (Tunisia) e *Alpinia zerumbet* e estudos indicam que além das propriedades citadas acima, possui efeito anti-tumoral (Wu et al.⁵⁹, 2012). Estudos de Ramage et al.⁴⁴ (2012), mostraram que o Terpinen-4-ol exibe fortes propriedades antimicrobianas contra culturas planctônicas e biofilmes fúngicos e pode ser adequado para a profilaxia e tratamento de candidose orofaríngea estabelecida.

Estudos também mostram que o Terpinen-4-ol tem boa atividade antifúngica com CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima) e mostram efeitos relativamente rápidos sobre *C. albicans* em diferentes tipos de ensaios (Moleyar, Narasimham³⁹, 1986; Carson, Riley¹⁰, 1995; Griffin et al.²³, 1999; Adegoke et al.², 2000; Coxet al.¹⁵, 2001; Inouye et al.²⁷, 2001; Hammer et al.²⁵, 2003).

Muitas abordagens têm sido utilizadas para melhorar o efeito de terapia antimicrobiana de microrganismos resistentes e uma delas é a combinação de drogas (Khan et al.³⁰, 2012). O conceito de sinergia antimicrobiana é baseado no princípio de que, em combinação com outras drogas, a formulação pode aumentar a eficácia, reduzir a toxicidade, diminuir os efeitos colaterais adversos, aumentar a biodisponibilidade, diminuir a dose, e reduzir o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (Li et al.³³, 1993; Inui et al.²⁸, 2007). Um método utilizado para verificar o sinergismo entre drogas é o “Checkerboard” (Tabuleiro Xadrez), no qual variadas concentrações dos produtos selecionados podem ser aplicados sobre um mesmo isolado (Jonhson et al.²⁹, 2004). Estudos mostraram efeitos sinérgicos quando agentes antifúngicos foram combinados (Guo et al.²⁴, 2008; Li et al.³⁴, 2008; Sun et al.⁵², 2008; Fiori et al.²¹, 2012). Assim, pode-se avaliar combinações de pequenas concentrações

das drogas para verificar se ocorre melhor efeito sobre os isolados estudados, resultando em baixa toxicidade e melhor eficácia (Silva et al.⁵¹, 2011; Ahmad et al.³, 2013; Wei et al.⁵⁷, 2011; Cordeiro et al.¹⁴, 2013; Canton et al.⁹, 2005).

Com base na literatura apresentada, observou-se a necessidade de intensificar estudos envolvendo a porção solúvel Terpinen-4-ol sobre biofilmes de *Candida* spp. e compreender a capacidade antimicrobiana deste componente, possibilitando sua aplicação clínica na prevenção e tratamento das patologias bucais.