

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

NARA LÍGIA MARTINS ALMEIDA

**Avaliação da atividade antimicrobiana e imunomodulatória
de *Punica granatum* Linné em dois modelos experimentais
in vivo de candidose**

BAURU

2020

NARA LÍGIA MARTINS ALMEIDA

**Avaliação da atividade antimicrobiana e imunomodulatória
de *Punica granatum* Linné em dois modelos experimentais
in vivo de candidose**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Co-orientador: Prof. Dr. James Venturini

Versão Corrigida

BAURU

2020

Martins Almeida, Nara Lúgia

Avaliação da atividade antimicrobiana e imunomodulatória de *Punica granatum* Linné em dois modelos experimentais *in vivo* de candidose / Nara Lúgia Martins Almeida. -- Bauru, 2020.

232 p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2020.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meus pais **Maria Piedade e Manoel Benedito**, e minhas irmãs **Rayssa e Dayanne** por todo exemplo e força que me proporcionaram. Vocês me ensinaram, todo os dias, que nada é mais valioso que o bem imaterial da educação. Obrigada por não medirem esforços para me ajudar em todos os momentos de minha vida, por acreditarem em mim e tornarem possível a realização dos meus sonhos.

Eu amo muito vocês!

Também dedico este trabalho a todos os animais de experimentação que perdem a vida para que as conquistas científicas, que befciam a todos os seres humanos, sejam possíveis de serem realizadas por nós.

“Minha eterna gratidão, meu respeito e a certeza que fiz o máximo para amenizar seu sofrimento, aproveitando cada dado extraído, cada experiência profissional, e também pessoal, de meu contato com eles.” Marchetti, CM.

AGRADECIMENTOS

Sem a crença em um **Deus** justo e misericordioso não teria conseguido chegar até onde cheguei. Das vezes que fraquejei até o dias de enorme alegria, senti a presença e o suporte seguros da fé, e, por isso, continuei.

Ao corpo docente do Departamento de Patologia Bucal, **Prof. Alberto Consolaro**, **Prof^a. Denise Tostes Oliveira** e **Prof. Luís Antônio de Assis Taveira**, por todos os ensinamentos que foram cruciais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Às queridas Funcionárias do Departamento de Patologia Bucal, **Fátima Silveira** e **Marina Corrêa**, pelo apoio emocional e pela inúmeras xícaras de café que aqueceram e alegraram meus dias ao longo desses 8 anos de FOB/USP. Em especial, agradeço a **Fatiminha** pela auxílio e excelência com o processamento histotécnico, que foi de suma importância para a viabilização dos resultados deste trabalho. Obrigada por todo carinho e consideração, por cada abraço apertado, e por me acolher nos momentos de tensão.

Aos meus queridos companheiros e colegas da Patologia, **José Burgos**, **Karen Pinke** e **Heliton Lima**, que sempre foram exemplos de profissionais para mim. Que me acompanham deste a iniciação científica, participando de meu amadurecimento e tornando minha caminhada intelectual e pessoal mais divertida e leve, tenho um enorme carinho por vocês. Mesmo distantes, sempre se prontificaram a me ajudar direta ou indiretamente. Em especial, agradeço a **Karen Pinke**, por todo apoio e parceria no desenvolvimento experimental e científico deste trabalho, pelo seu dinamismo, praticidade e zelo, e por fazer as coisas parecerem muito mais simples e fáceis. Aprendi muito ao seu lado, principalmente em ser mais tolerante, flexível e empática. Foi muito bom poder contar com você nesta etapa da minha vida, obrigada por toda paciência, carinho, amizade e consideração. Eu fico muito feliz e grata pela relação transparente e leve que construímos ao longo desse tempo.

Às meninas da Bioquímica, **Cintia Tokuhara, Flávia Amadeu e Talita Ventura**, que sempre me receberam no Departamento com um sorriso no rosto; sempre muito solícitas e amigas, fazendo toda a diferença naqueles dias difíceis, tornaram-se o escape fundamental para aliviar a saudade e o estresse. O carinho e a companhia de vocês foram essenciais para tornarem as coisas mais fáceis, prazerosas e divertidas. Muito obrigada pelo auxílio com a quantificação das proteínas. Em especial, agradeço a amiga de longa data **Gabriela Oliveira**, que segue comigo, ano após ano, dividindo os anseios, as dúvidas, as alegrias e tristezas também, mas sempre presente vibrando e torcendo por mim a cada meta concluída e dividindo comigo o peso da rotina. Obrigada por essa amizade tão verdadeira, fiel e duradoura. Você é o melhor presente que a graduação me trouxe.

Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP-I), na pessoa do **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**. Obrigada professor por toda disponibilidade e pela convivência agradável nesses anos de pesquisa, agradeço pela sua participação no meu exame de qualificação, colaborando e enriquecendo este trabalho com suas sugestões e questionamentos.

Aos funcionários do CIP, **Márcia Graeff, Marcelo Milanda e Rafaela Alves da Silva**, obrigada por todo o apoio, ensinamentos e consideração, desde o início da minha chegada na FOB/USP.

Ao Departamento de Farmacologia, na pessoa do técnico **Thiago José Dionísio**, por todo auxílio e paciência na execução do protocolo de análise das citocinas e pela discussão dos resultados, você é um excelente profissional. Em especial, agradeço a minha amiga **Gabriela Moraes**, pelos momentos de descontração, por dividir os medos e sonhos, a dor e as delícias da rotina acadêmica, pelas parcerias e convites acadêmicos ou festivos. Sou grata pela amizade simples e sincera que construímos ao longo do tempo.

Ao Departamento de Prótese, na pessoa do **Prof. Vinícius Carvalho Porto**, obrigada pela amizade, pela confiança, pelos bons vinhos e momentos alegres que tive a honra de dividí-los com sua família, e pela parceria ao longo de todos esses anos de convívio.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação "Prof. Dr. Antônio Gabriel Atta" FOB/USP, na pessoa da chefe técnica **Cybelle de Assumpção Fontes**, pela ajuda na elaboração da ficha técnica deste trabalho.

Às funcionárias da pós-graduação **Ana Letícia**, **Fátima Cassador** (*in memoriam*) e **Leila Regina**, por todo apoio durante o Mestrado até a confecção da Tese.

À secretária do Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia, **Luciana Zanon Fontes Lozano** por todo carinho e apoio em relação a documentação necessária para o depósito de tese.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), na pessoa do **Prof. Moacir Rossi Forim** e de sua aluna **Clara Aguiar**, pelo auxílio e execução dos resultados sobre do perfil fitoquímico por meio da análise cromatográfica do extrato de *P. granatum*.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), *Campus* de São José dos Campos, na pessoa da **Profa. Juliana Campos Junqueira** e de sua aluna **Lívia Mara**, agradeço imensamente por me receberem de braços abertos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia e por me auxiliarem na elaboração e execução da primeira etapa deste trabalho com o estudo de *G. mellonella* como modelo experimental.

À Unisagrado (USC), na pessoa do **Prof. Joel Ferreira Santiago Junior**, pela participação ativa em uma fase desafiadora, importante e complexa de minha vida. Agradeço pela compreensão e pelo cuidado comigo em sala de aula, pelo apoio e acolhimento. Sou muito feliz e grata por estar sempre disposto a me ouvir e por ser um exemplo de cirurgião-dentista para mim. Além do professor, esta Instituição me deu de presente a oportunidade de conhecer minha querida amiga **Yasmim Carboni**, que me trouxe alegria e cores para os dias tristes e cinzas de 2019, me ensinando muito sobre amizade sincera e sobre a mim mesma, sempre me apoiando e me mostrando que a vida é mesmo muito fugaz. Obrigada por dividir minhas tristezas e multiplicar minhas alegrias. Tenho muito orgulho de você Trimi!

Ao **Prof. José Maurício Sforcin**, por ter aceito, prontamente, o nosso convite para participar da banca desta Tese. Agradeço pela colaboração.

Àos meus **queridos alunos** da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP/Bauru), os quais dediquei meu tempo, esforços e estudos para sempre oferecer o melhor de mim em minhas aulas. Assim, tive a oportunidade de retribuir todos os ensinamentos a mim transmitidos, ao longo de minha vida, pelos meus queridos professores que participaram da minha trajetória profissional. Em especial, agradeço ao **Prof. Fábio Porto Foresti** e a secretária **Nicole Ogawa** por todo auxílio, orientação e colaboração e amizade desde quando ingressei nesta querida Instituição como aluna de graduação, até o meu retorno como docente, no qual me orgulho muito.

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retorcendo o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”
Freire, P.

Ao Laboratório de Imunopatologia Experimental da UNESP/Bauru (LIPE/UNESP), na pessoa do **Prof. Dr. Olavo Speranza de Arruda** e **Prof. Dr. James Venturini**, por toda a colaboração e parceria firmada desde 2011 quando ingressei na vida acadêmica e ao **Prof. Dr. James Venturini** pela co-orientação deste trabalho. Sou grata por não medir esforços para me auxiliar e guiar no desenvolvimento da tese, mesmo que distante. Em especial, agradeço a querida **Bárbara Amorim** sempre muito solícita e disposta a me ajudar no laboratório e com os animais no biotério, principalmente nas fases de crise e dificuldades. Você é uma pessoa incrível e forte, obrigada pelos momentos de reflexão e parceria.

Às minhas queridas amigas do LIPE, **Amanda Ribeiro**, **Camila Marchetti**, **Débora Almeida** e **Luiza Mimura**, que sempre me apoiaram, torceram e acompanharam minha evolução pessoal a acadêmica ao longo desses anos. Obrigada pelos momentos únicos e memoráveis que passamos juntas. Desejo muito sucesso para toda vocês. Em especial, agradeço à minha amiga-irmã **Thais Fraga**, pelo auxílio ímpar no manejo dos animais, pela colaboração laboratorial e científica, e pela ajuda nas análises estatísticas. Você é uma das pessoas mais inteligentes e focadas que eu já conheci. Sua garra e seu comprometimento com a ciência sempre me inspiraram e me motivaram a buscar o meu melhor como profissional.

Além disso, seu coração é lindo, você sempre me apoiou e me ajudou nos momentos difíceis e decisivos de minha vida e me fez sempre enxergar o melhor de mim; o quanto eu era capaz. Você é um presente que Bauru me deu e que vou levar e cuidar para a toda a vida.

À minha amiga **Eliane Costa**, por seguir me acompanhando e torcendo por mim desde o Mestrado, fazendo parte das inúmeras situações divertidas e importantes da minha vida; a sua presença sempre tornou as coisas mais tranquilas e menos complicadas. Obrigada pelas cervejas geladas e por sempre estar ao meu lado.

À minha amiga **Fernada Nascimento**, por dividir comigo as incertezas e as alegrias da pós-graduação, por estar presente nos meus momentos de fraqueza e desânimo, e pela empatia e amizade contruída de forma sólida, franca e divertida.

Por fim, agradeço a **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para que minha trajetória, nesses quatro anos de doutorado, se tornasse mais prazerosa e proveitosa, meus sinceros e eternos agradecimentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP)** na pessoa do Excelentíssimo Diretor **Prof. Carlos Ferreira dos Santos**, impulsionando o meu desenvolvimento científico e acadêmico nesta Universidade que é referência mundial. Sou eternamente grata por fazer parte desse time de grandes.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq, nº 307232/2015-8), pelo incentivo à pesquisa no Brasil.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES, Código de Financiamento 001), pelo apoio financeiro por meio da minha bolsa de Doutorado, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), por meio do auxílio financeiro oferecido através do Projeto Temático (nº de processo 2015/03965-2), o qual viabilizou a compra de materiais para a execução deste trabalho.

À **Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru**, na pessoa da atual Presidente, **Prof^a. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da **Prof^a. Denise Tostes Oliveira**, responsável por esta área.

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** (UNESP/Bauru), que foi o divisor de águas da minha vida, responsável pela minha formação e pela minha evolução profissional.

Ao **Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL)**, na pessoa da **Dra. Patricia Sammarco Rosa**, bioterista responsável pelo cuidado, manutenção e armazenamento dos camundongos utilizados neste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais **Piedade e Taquinho**, pelo exemplo de força, luta, trabalho duro, educação e amor. Por todas as renúncias e sacrifícios que fizeram em suas vidas para que os meus sonhos, e os das minhas irmãs, pudessem ser realizados. Por cada final de semana, feriado, Natal e Ano Novo trabalhados incessantemente com muito esforço e cansaço para que não nos faltasse absolutamente nada. Eu não tenho palavras para agradecer tamanho amor e cuidado. Obrigada por cada “*não*”, por cada “*nós te amamos muito*” disfarçado de um singelo “*se cuida*” ao final de cada ligação para poder conter as lágrimas de saudade e orgulho por eu ter conseguido chegar até aqui. E se eu estou aqui, é por única e exclusiva culpa de vocês. Eu sou uma filha privilegiada por ter nascido do amor destas duas pessoas incríveis, e eu prometo devolver todo o investimento que fizeram em mim. Eu me sinto orgulhosa de ter tido uma educação familiar baseada no amor, na luta, no trabalho, na determinação e na união, mesmo que do nosso jeito doido de nos relacionarmos. Obrigada por me apoiarem e por me oferecerem a força de vocês quando as minhas já estavam se esgotando. Vocês são a minha inspiração, a minha base e meu porto seguro. Eu os amo incondicionalmente!

Ao meu amado companheiro e parceiro de vida **Felipe Faria de Castro**, por todo amor a mim demonstrado, diariamente, por pequenos grandes gestos de carinho, cuidado, gentileza, respeito e consideração. Por respeitar meus momentos de fraqueza e cansaço e minha individualidade, por me apoiar e criticar construtivamente as minhas decisões, por vibrar a cada conquista, por fazer planos e colocá-los em prática comigo, e por ser tão paciente e carinhoso, mesmo quando nem eu mais me suportava. Obrigada principalmente por me compreender, confiar e cuidar de mim; eu te admiro tanto. Você é a personificação da paz em minha vida e foi essencial para que eu pudesse concluir essa importante etapa de minha vida. Obrigada por sempre me fazer sentir capaz, amo você. Também agradeço aos meus queridos sogros, **Beth e Gerson**, por me tratarem com muito carinho e preocupação. Vocês são a extensão da minha família aqui em Bauru e sou eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim. Obrigada por me acolherem e transformarem dias difíceis e cansativos em momentos de alegria e descontração.

À minha querida orientadora **Prof^a. Vanessa Soares Lara**. Desde a minha iniciação científica, ou seja, do nosso primeiro contato, sempre tive uma admiração genuína pelo seu trabalho e pela sua conduta, que foram crescendo ao longo da nossa trajetória aluna-orientadora nesses 8 anos de convívio, baseados em muito aprendizado e parceria. Com o passar do tempo e com as inúmeras situações adversas e desafiadoras que passei, você foi trabalhando, nesta sua aluna encanada, a capacidade de acreditar em mim mesma e em coisas que eu nem poderia imaginar possuir, mas as quais eu sempre me arrisquei a sonhar em ter.

Seu trabalho de orientação ultrapassa a participação na construção de teses ou dissertações, envolve uma arte, quase que artesanal, de lapidar pessoas por meio do ensino, do rigor, da paciência, do capricho e do reconhecimento. E é por isso que eu te admiro tanto e te acho uma mulher extremamente elegante, não apenas no modo em como se veste, claro, mas principalmente pela forma como trata as pessoas ao seu redor, sempre com muito respeito, empatia e disposição.

Obrigada por me permitir aprender tanto e amadurecer, todos os dias, com você. Mesmo com a agenda repleta de compromissos riscados e reagendados, os quais muitas vezes percebia sua frustração em não conseguir cumpri-los, sempre deu um jeitinho de me atender oferecendo seu tempo, e isso é o maior presente que alguém pode receber. Sou extremamente grata pelas nossas reuniões acadêmicas cobertas de leituras científicas, muito café e boas risadas, além das informais, em sua casa, na presença de sua família, a qual tenho um enorme apreço.

Obrigada por me incentivar, me aconselhar, me ouvir, me apoiar, me abraçar, e acreditar em minha capacidade de elaborar e executar este trabalho. Obrigada pela energia positiva e pela força que transmitiu para mim em dias em que não me sentia bem; sua sensibilidade em perceber se estava triste, preocupada ou feliz sempre me chamou atenção. Peço desculpas pelos erros no caminho e por, em algum momento, me sentir perdida, aflita e confusa. Mas você, como uma boa capitã, sempre retornou o barco para o seu lugar de origem e continuou o percurso ao meu lado. A senhora foi luz na escuridão, e ser luz não é sobre brilhar, mas sim sobre iluminar caminhos.

Por fim, obrigada pela confiança e por ser tão presente em minha vida. Por despertar o gosto pela pesquisa e meu amor pela docência, de uma forma gentil, inspiradora e única. Você é meu maior exemplo de mulher, profissional e pesquisadora. Sorte daqueles que cruzarem seu caminho.

*“Só eu sei cada passo por mim dado
nessa estrada esburacada que é a vida,
passei coisas que até mesmo Deus duvida,
fiquei triste, capiongo, aperreado,
porém nunca me senti desmotivado,
me agarrava sempre numa mão amiga,
e de forças minha alma era munida
pois do céu a voz de Deus dizia assim:
– Suba o queixo, meta os pés, confie em mim,
vá pra luta que eu cuido das feridas.”*

Bráulio Bessa (poeta e cordelista nordestino)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica e imunomodulatória do extrato hidroalcoólico das cascas de *Punica granatum* Linné em dois modelos experimentais *in vivo* de candidose (sistêmica e oral). Paralelamente, a presença de efeitos adversos nas administrações diárias de *P. granatum* foi avaliada. Testes estatísticos foram aplicados de acordo com a presença ou não de normalidade em todas as avaliações, considerando $p < 0,05$. No modelo sistêmico, após a seleção das concentrações não tóxicas de *P. granatum* e de anfotericina B nas larvas de *G. mellonella*, foram realizados dois desenhos experimentais: profilaxia pela inoculação intra-hemocele de uma dose única de extrato, 24 horas antes da infecção por *C. albicans*, e terapia pela inoculação de dose única 1 hora após a infecção fúngica. Como controle, as larvas foram infectadas/não tratadas, tratadas com anfotericina B ou não infectadas/não tratadas. Ambos os tratamentos foram eficazes contra a infecção por *C. albicans* por meio de curvas de sobrevivência. No entanto, o efeito profilático de *P. granatum* resultou em maior tempo de sobrevivência do que a terapia. Na sequência, doses múltiplas do extrato foram administradas em larvas antes da infecção, resultando em maior porcentagem de sobrevivência e maior densidade de hemócitos quando comparadas às larvas infectadas e não tratadas. No modelo localizado, o perfil fitoquímico e a CIM do extrato e fluconazol foram avaliados *in vitro*. Para análise toxicológica, camundongos BALB/c receberam o extrato a 150 ou 300 mg/Kg, ou fluconazol a 100 mg/Kg, por gavagem, durante 7 dias. Como controle, água foi administrada. O *screening* hipocrático e o peso dos animais foram mensurados diariamente. Após a eutanásia, baço, fígado e rins foram analisados microscopicamente; e marcadores bioquímicos séricos foram quantificados. Para análise antimicrobiana, animais imunossuprimidos foram infectados por *C. albicans* em toda cavidade oral e, após 7 dias, receberam 7 doses diárias de *P. granatum*. Para controle, animais infectados receberam água ou fluconazol, bem como animais não foram infectados. O peso corporal foi mensurado diariamente. Após eutanásia, baço, fígado e rins foram pesados e analisados microscopicamente, e a língua foi avaliada macroscópica, microbiológica e microscopicamente. Para análise imunomodulatória, a produção de citocinas foi mensurada nos homogenatos de linfonodos cervicais e língua por Milliplex®. Como resultado, foi identificado em *P. granatum* o composto punicalagina

e a CIM foi mensurada em 18,75 mg/mL. Animais saudáveis que receberam fluconazol apresentaram redução do peso corporal, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, e aumento de TGP e triglicérides, diferentemente dos grupos tratados com *P. granatum*. A placa micelial formada na língua foi atenuada pós-tratamento com *P. granatum* ou fluconazol, acarretando na redução do número de UFC/g; conseqüentemente, os escores microscópicos foram mais baixos na língua dos animais tratados em relação aos controles. Ainda, o tratamento com o extrato demonstrou ser hepatoprotetor e, possivelmente, anti-inflamatório, pelo aumento de IL-10 e TGF- β 1, em relação aos controles da infecção. Concluindo, em ambos os modelos experimentais *in vivo* de candidose sistêmica e localizada, o extrato de *P. granatum* atuou como potente agente antimicrobiano contra *C. albicans* e desempenhou papel protetor, não tóxico e imunomodulador no tratamento da candidose.

Palavras-chave*: Romã (Fruta). Candidíase Invasiva. Candidíase Bucal. Fluconazol. Anfotericina B.

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), disponíveis no domínio <http://decs.bvr.br/>

ABSTRACT

Evaluation of the antimicrobial and immunomodulatory activity of *Punica granatum* Linn. in two *in vivo* experimental models of candidiasis

The aim of this work was to evaluate the antifungal and immunomodulatory activity of the hydroalcoholic extract of the peels of *Punica granatum* Linn. in two *in vivo* experimental models of candidiasis (systemic and oral). In parallel, the presence of side effects in the daily administrations of *P. granatum* was evaluated. Statistical tests were applied according to the presence or not of normality in all evaluations, considering $p < 0.05$. In the systemic model, after selecting the non-toxic concentrations of *P. granatum* and amphotericin B in the larvae of *G. mellonella*, two experimental designs were performed: prophylaxis by intra-hemocele inoculation of a single dose of extract, 24 hours before infection with *C. albicans*, and therapy by inoculation of a single dose 1 hour after fungal infection. As a control, the larvae were infected/untreated, treated with amphotericin B or uninfected/untreated. Both treatments were effective against *C. albicans* infection through survival curves. However, the prophylactic effect of *P. granatum* resulted in a longer survival time than therapy. Subsequently, multiple doses of the extract were administered to larvae before infection, resulting in a higher percentage of survival and a higher density of hemocytes when compared to infected and untreated larvae. In the localized model, the phytochemical profile and MIC of the extract and fluconazole were evaluated *in vitro*. For toxicological analysis, BALB/c mice received the extract at 150 or 300 mg/Kg, or fluconazole at 100 mg/Kg, by gavage, for 7 days. As a control, water was administered. Hippocratic screening and animal weight was measured daily. After euthanasia, spleen, liver and kidneys were analyzed microscopically; and serum biochemical markers were quantified. For antimicrobial analysis, immunosuppressed animals were infected with *C. albicans* on entire oral cavity and, after 7 days, received 7 daily doses of *P. granatum*. For control, infected animals received water or fluconazole, and animals were not infected. Body weight was measured daily. After euthanasia, the spleen, liver and kidneys were weighed and analyzed microscopically, and the tongue was evaluated macroscopically, microbiologically and microscopically. For immunomodulatory analysis, cytokine production was measured in the homogenates of cervical lymph nodes and tongue

by Milliplex®. As a result, the punicalagin compound was identified in *P. granatum* and the MIC was measured at 18.75 mg/mL. Healthy animals that received fluconazole showed reduced body weight, hepatotoxicity and nephrotoxicity, and increased TGP and triglycerides, differently from groups treated with *P. granatum*. The mycelial plaque formed on the tongue was attenuated after treatment with *P. granatum* or fluconazole, resulting in a reduction in the number of CFU/g; consequently, the microscopic scores were lower in the tongue of the treated animals compared to the controls. Still, the treatment with the extract proved to be hepatoprotective and, possibly, anti-inflammatory, due to the increase production of IL-10 and TGF- β 1, in relation to infection controls. In conclusion, in both *in vivo* experimental models of systemic and localized candidiasis, *P. granatum* extract acted as a potent antimicrobial agent against *C. albicans* and played a protective, non-toxic and immunomodulatory role in the treatment of candidiasis.

Keywords: Pomegranate. Invasive Candidiasis. Oral Candidiasis. Fluconazole. Amphotericin B.

*In accordance with Health Sciences Descriptors (DeCS) available at <http://decs.bvr.br/>

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina de soro bovino
Ca	Animais infectados por <i>C. albicans</i>
células/mL	Células por mililitro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetros
CTRL	Grupo Controle
°C	Graus Celsius
d	Dia
DMSO	Dimetilfulóxido
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massas
ESI	Ionização eletrospray
[ESI(+)]	Modo de íon positivo
[ESI(-)]	Modo de íon negativo
EtOH 70%	Álcool 70 por cento
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
eV	Elétron-volt
FLU	Fluconazol à 100 mg/Kg
g	Gramas
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
h	Horas
H&E	Hematoxilina/Eosina
H ₂ O	Água
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6

IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12p70
IL-17A	Interleucina 17A
IL-17E/IL-25	Interleucina 17E/ Interleucina 25
IL-17F	Interleucina 17F
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IMS	Animais imunossuprimidos
IPS	<i>Insect physiologic saline</i>
Kg	Quilogramas
Kv	Quilovolt
L	Litros
L.min ⁻¹	Litros por minuto
mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitro
mg/Kg	Miligramas por quilograma
min	Minutos
MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein- 1 alpha</i>
mL	Mililitros
mL.min ⁻¹	Mililitros por minuto
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
mM	Micromolar
MS	<i>Mass spectrometry</i>
nm	Nanometros
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada em Fosfato)
PDA	<i>Photodiode array detectors</i> (Detector de Arranjo de Diôdo)
pg/mL	Picograma por mililitro
Pg150	<i>Punica granatum</i> à 150 mg/Kg
Pg300	<i>Punica granatum</i> à 300 mg/Kg

pH	Potencial Hidrogeniônico
PTFE	Politetrafluoroetileno (<i>Teflon</i>)
QC	<i>Quality Control</i>
q-TOF MS	Sistema do tipo quadrupolo-tempo de voo
®	Marca registrada
rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TGF-β2	<i>Transforming Growth Factor Beta 2</i>
TGF-β3	<i>Transforming Growth Factor Beta 3</i>
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
t_R	Tempo de retenção
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por grama
UHPLC-qTOF-MS/MS	<i>Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>
UHPLC	<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
μL	Microlitros
μL/dia	Microlitros por dia
μm	Micrometros
UV	Ultravioleta
V	Volt
v/v	Volume por volume
YEPD	<i>Yeast Extract Potato Dextrose</i>
%	Porcentagem
λ _{máx}	Comprimento de onda máximo
+7d	Mais 7 dias de infecção por <i>C. albicans</i>
↑ (UP)	Aumento da produção (suprarregulação) de citocinas/quimiocinas
↓ (DOWN)	Redução da produção (subrregulação) de citocinas/quimiocinas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	<i>Candida albicans</i> : um patógeno oportunista	31
2.2	Infecções nosocomiais por <i>Candida</i> spp.	33
2.3	Manifestações clínicas da Candidose Oral.....	34
2.4	Fatores predisponentes à Candidose Oral.....	35
2.5	Resposta Imune do hospedeiro frente à <i>C. albicans</i>	36
2.6	Terapia Antifúngica e Resistência Microbiana.....	38
2.7	Modelos de Vertebrados para o estudo da Candidose Oral.....	41
2.8	Modelos de Invertebrados para o estudo da Candidose Sistêmica....	44
2.9	Plantas Medicinais: <i>Punica granatum</i> e seu potencial farmacológico.	47
3	PROPOSIÇÃO	53
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4	MÉTODOS	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	CAPÍTULO 1	63
5.2	CAPÍTULO 2	87
6	CONCLUSÕES	177
	REFERÊNCIAS	181
	APÊNDICES	213
	ANEXOS	231

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) emergiu ao longo do tempo como um patógeno oportunista de extrema relevância clínica. É um organismo comensal e bem adaptado ao seu hospedeiro humano, e qualquer alteração no microambiente, como o imunocomprometimento de seu hospedeiro, favorece sua proliferação e fornece a esse patógeno a oportunidade de invadir tecidos, manifestando-se por meio de infecções mucosas superficiais até doença disseminada invasiva com envolvimento de múltiplos órgãos (FIDEL, 2011; WILLIAMS; LEWIS, 2011; PATIL *et al.*, 2015; LEWIS; WILLIAMS, 2017).

O trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis é colonizado de forma assintomática, onde sua proliferação é controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro e outros microrganismos presentes na microbiota (MASON *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). Entretanto, o repertório de fatores de virulência que *C. albicans* possui, permite transição rápida de comensal (levedura) para patógeno (hifa) (MAYER *et al.*, 2013; HOFES *et al.*, 2016).

Como principal reservatório, o dorso da língua é o ponto inicial de infecção para a maioria das manifestações clínicas de candidose oral. Em casos graves, *C. albicans* se espalha a partir de superfícies mucosas colonizadas ou da pele causando infecções sistêmicas (MILSOP; FAZE, 2016). A rápida disseminação deste fungo da circulação para os órgãos viscerais pode provocar falência de órgãos, se não for controlada.

O aumento contínuo da incidência de candidose é reflexo do aumento do uso de antibióticos de amplo espectro, agentes imunossupressores, dispositivos e cateteres, e o aumento de transplantes de órgãos e células hematopoiéticas. Associado a estes fatores, a escassez de classes antifúngicas, juntamente com as limitações dos agentes terapêuticos atuais, prejudica a capacidade de combater infecções fúngicas. As desvantagens mais significativas do uso de medicamentos sintéticos são em relação a sua seletividade subótima, toxicidade aumentada e probabilidade aumentada do desenvolvendo de resistência microbiana (WILLIAMS; LEWIS, 2011; VILA *et al.*, 2020).

Dentre os medicamentos antifúngicos mais utilizados no combate contra *C. albicans*, anfotericina B e fluconazol possuem seu destaque. Anfotericina B é

1 Introdução

considerada o “padrão ouro” na terapia antifúngica sistêmica, mesmo sendo inerentemente tóxica devido à sua falta de seletividade, dado que as células fúngicas e as células de mamíferos são eucarióticas e compartilham muitos processos biológicos semelhantes (PAPPAS *et al.*, 2009; PIERCE; LOPEZ-RIBOT; 2013). Já os azóis, como fluconazol, embora demonstrem baixa toxicidade para as células humanas; são fármacos fungistáticos, e isso levou ao surgimento da resistência fúngica (PIERCE; LOPEZ-RIBOT; 2013).

Diante destas limitações, a busca por terapias alternativas para o tratamento eficaz da candidose localizada ou sistêmica e compatível ao hospedeiro é relevante, e o uso de plantas medicinais parece ser uma solução promissora (CASAROTO; LARA, 2011). A literatura científica aponta que o extrato das cascas de *P. granatum* causa danos graves para a estrutura celular das leveduras de *C. albicans*, inviabilizando sua transição para hifa (estado patogênico) e, conseqüentemente, impedindo a invasão tecidual. Além disso, esta planta medicinal provoca inibição da atividade das enzimas oxidantes e acabam modulando o processo inflamatório frente a patógenos bucais (ENDO *et al.*, 2010; ANIBAL, 2010; ANIBAL *et al.*, 2013).

As propriedades antifúngicas das diferentes partes de *P. granatum* ocorrem devido a presença de compostos bioativos como taninos, flavonóides, elagitaninos, numerosos alcaloides de piperidina, ácido orgânico e compostos polifenólicos (NASCIMENTO JÚNIOR *et al.*, 2016; SEERAM *et al.*, 2016). Especificadamente, o extrato das cascas de romã apresenta níveis relativamente altos de compostos polifenólicos totais e elagitaninos, particularmente em relação à punicalagina. Punicalagina e punicalina, taninos hidrolisáveis, são os principais compostos bioativos responsáveis pela atividade antimicrobiana desta planta (FARIA; CALHAU, 2011; MONEIM, 2012). A sua presença pode afetar a membrana celular através da precipitação de proteínas e alterar a estrutura molecular dos fungos (ENDO *et al.*, 2010; ANIBAL, 2010; ANIBAL *et al.*, 2013).

Paralelamente, o reconhecimento de que *C. albicans* é um importante patógeno bucal, especialmente em pacientes imunocomprometidos, tem levado ao desenvolvimento de modelos experimentais *in vivo* de candidose que funcionam como uma ferramenta útil para manipular ensaios necessários direcionados a busca por terapias alternativas viáveis, eficazes e biocompatíveis, como por exemplo, a

1 Introdução

utilização do extrato de *P. granatum* (GOMES *et al.*, 2016; NASCIMENTO JÚNIOR *et al.*, 2016; BASSIRI-JAHROMI *et al.*, 2018).

A utilização de animais invertebrados como modelo experimental tem aumentado significativamente nos últimos anos. Esse tipo de modelo fornece meios para a execução de estudos em larga escala, servindo como triagem para estudos em animais vertebrados, como camundongos e ratos, auxiliando na gestão sustentável através do princípio de redução do número de animais utilizados para experimentação. Além disso, a experimentação com animais invertebrados possui vantagens sobre os modelos convencionais de mamíferos, incluindo menor custo, resultados mais rápidos e reproduzíveis e menor envolvimento sobre questões éticas (JUNQUEIRA, 2012).

O modelo experimental de larvas de *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) tem sido caracterizado como confiável para estudos sobre a patogenicidade de *C. albicans* sistemicamente, bem como em relação à resposta imune inata desenvolvida, pois sua hemolinfa é constituída de seis tipos de hemócitos (pró-hemócitos, coagulócitos, esferulócitos, oenocitóides, plasmatócitos e granulócitos), que são células morfofisiologicamente análogas às células imunes de mamíferos, e desempenham um importante papel em relação à resposta imune frente a *C. albicans* (FUCHS *et al.*, 2010a; KELLY; KAVANAGH, 2011; WU *et al.*, 2016; SHEEHAN; KAVANAGH, 2018). O trato gastrointestinal de insetos e mamíferos também compartilham algumas similaridades histológicas, anatômicas e fisiológicas. As microvilosidades no intestino médio de larvas *G. mellonella*, contêm microrganismos que se assemelham aqueles encontrados nas microvilosidades intestinais de mamíferos (MYLONAKIS *et al.*, 2005; FUCHS *et al.*, 2010b; DESBOIS; COOTE, 2012).

Além disso, estas larvas possuem capacidade para sobreviver a temperaturas superiores a 30°C e existe a possibilidade de administração de doses precisas de compostos por meio de três rotas (aplicação tópica, alimentação ou injeção intra-hemocele). Como consequência destas semelhanças e da facilidade de manipulação, insetos têm sido utilizados como modelos experimentais *in vivo* eficazes para estudar a virulência de patógenos bem como a ação de compostos antimicrobianos, proporcionando resultados comparáveis com aqueles que podem ser obtidos utilizando mamíferos (FUCHS *et al.*, 2010b; JUNQUEIRA, 2012).

1 Introdução

A íntima semelhança com os processos patológicos humanos e a resposta imune do hospedeiro torna o modelo animal o mecanismo ideal para estudar a patogênese de *Candida* spp. De fato, uma grande variedade de modelos animais clinicamente relevantes são disponíveis para estudar as várias doenças sistêmicas ou mucosas (NETT; ANDES, 2015; JABRA-RIZK *et al.*, 2016; SEGAL; FRENKEL, 2018). Neste contexto, o modelo experimental *in vivo* de candidose oral descrito por Takakura *et al.* (2003), tem inspirado a execução de outros trabalhos (TAKAKURA *et al.*, 2004; DE CAMPOS RASTEIRO *et al.*, 2014; TAGUCHI *et al.*, 2010).

Para o estabelecimento da infecção oral, neste modelo, os camundongos são imunossuprimidos pela administração de injeções subcutâneas de prednisolona antes da inoculação oral, através de um *swab* com o inóculo de *C. albicans*. Este protocolo resulta em uma infecção reprodutível, mimetizando uma das manifestações clínicas vista em humanos, a candidose pseudomembranosa. A infecção pode ser validada clinicamente em camundongos pela presença de placas brancas típicas, por análise macroscópica (score clínico) e microscópica (análise histopatológica), através do tecido infectado; e quantitativamente, pela carga fúngica (UFC), por meio da análise microbiológica (TAKAKURA *et al.*, 2003).

Portanto, a utilização de modelos experimentais *in vivo*, como por exemplo, os modelos utilizando camundongos (candidose localizada) ou as larvas de *G. mellonella* (candidose sistêmica), facilitam a transposição de resultados *in vitro* para *in vivo*, auxiliam no estudo sobre novas abordagens terapêuticas para o tratamento da candidose e permitem avaliar o desenvolvimento da resposta imune elaborada pós-tratamento.

Por fim, levando em consideração a susceptibilidade de pacientes imunossuprimidos para infecções fúngicas e a resistência microbiana associada a antifúngicos tradicionais, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e imunomodulatória de *P. granatum* no tratamento da candidose sistêmica, utilizando um modelo experimental invertebrado com larvas de *G. mellonella*, e da candidose oral, utilizando o modelo experimental com camundongos imunossuprimidos da linhagem BALB/c.

Considerando o exposto, as hipóteses testadas no presente estudo foram que, 1) as administrações diárias com o extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* irão resultar em diminuição da carga fúngica de *C. albicans*, e 2) a

1 Introdução

resposta imune elaborada após as administrações com o extrato desempenhará, possivelmente, um papel imunoprotetor no tratamento da candidose sistêmica ou localizada.

2 Síntese Bibliográfica

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA**2.1 *Candida albicans*: um patógeno oportunista**

O fungo *C. albicans* apresenta-se como uma levedura diploide com dois pares de oito cromossomos. Multiplica-se por brotamento e, em determinadas situações, pode produzir tubo germinativo e então desenvolver-se como pseudo-hifa ou hifa verdadeira (WILLIAMS; LEWIS, 2011; NAGLIK *et al.*, 2011). É de longe o principal agente causador de candidose oral, representando até 95% dos casos. Apesar de ser considerado um patógeno, *C. albicans* é um organismo comensal, onipresente, que geralmente coloniza a mucosa oral e é amplamente isolado das cavidades orais de indivíduos saudáveis. De fato, até 80% da população em geral é portadora assintomática (FIDEL, 2002; SOUTHERN *et al.*, 2008; MASON *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2013).

O repertório de fatores de virulência que *C. albicans* possui é significativo, e estão associados à: 1) adesão ao epitélio oral, por meio da hidrofobicidade da superfície celular (aderência reversível) e da expressão de adesinas da superfície celular (Als3, Hwp1), 2) formação de biofilme, associado ao desenvolvimento de estomatite protética e da falha na terapia antifúngica, 3) evasão das defesas do hospedeiro, por meio da resistência ao estresse fagocítico (resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo), além de degradação proteolítica dos fatores imunes como anticorpos e peptídeos antimicrobianos e 4) invasão e destruição do tecido, pelo desenvolvimento hifal e tigmotropismo (penetração de tecido), secreção de enzimas hidrolíticas, como aspartil proteinases secretora (SAPs), fosfolipases e lipases (degradação tecidual), secreção da toxina hipoespecífica (candidalisina) e degradação da caderina-E, além da indução da endocitose (VILA *et al.*, 2020).

Em primeiro lugar, para que o fungo *Candida* cause infecção, ele deve ser retido na boca. Contudo, a remoção de células frouxamente aderidas nas superfícies mucosas através dos efeitos do fluxo salivar e da deglutição é um fator importante na defesa do hospedeiro contra o crescimento excessivo de *Candida* (LEWIS; WILLIAMS, 2017). Portanto, a capacidade de contornar esse mecanismo de remoção pode ser considerada como um atributo-chave de sua virulência. Durante seu estado leveduriforme, *C. albicans* adere reversivelmente às células epiteliais

2 Síntese Bibliográfica

orais através de interações eletrostáticas, e a ligação às superfícies epiteliais orais é mediada por receptores da parede celular como a família de glicoproteínas da sequência do tipo aglutinina (ALS) (HOYER, 2001; WILLIAMS; LEWIS, 2011; NAGLIK *et al.*, 2011).

A mais notável entre os membros da família é a adesina hipo-específica Als3p, que também demonstrou atuar como um receptor para adesão bacteriana às hifas de *C. albicans* (SILVERMAN *et al.*, 2010; PETERS *et al.*, 2012). Da mesma forma, a proteína da parede hifal (Hwp1) é outra adesina importante, uma vez que a exclusão dos genes *Alsp3* ou *Hwp1* resultou em atenuação da virulência (SUNDSTROM, 2002, SWIDERGALL; FILLER, 2017). Quando aderido a mucosa do hospedeiro, *C. albicans* pode mudar a morfologia para filamentoso invasivo que facilita a penetração epitelial (LEWIS; WILLIAMS, 2017; DESAI, 2018). De fato, o núcleo da patogênese de *C. albicans* esta relacionado à sua capacidade de alteração morfológica de levedura à hifa (CALDERONE, 2012; MATHE; VAN DIJCK, 2013; WALL *et al.*, 2019).

A transição é desencadeada em resposta a uma variedade de estímulos ambientais do hospedeiro que ativam múltiplas vias de sinalização regulatória, levando à expressão de ativadores principais de formação de hifas (WANG, 2015; KADOSH, 2019). Os distintos estados morfológicos de *C. albicans* determinam fases de colonização, crescimento e de disseminação, onde a forma de levedura está associada à disseminação inicial, enquanto a forma hifal permite a *C. albicans* invadir o tecido hospedeiro (LO *et al.*, 1997; JABRA-RIZK *et al.*, 2016; HOFES *et al.*, 2016; TSUI *et al.*, 2016).

De fato, a formação de hifas está associada à expressão de fatores de virulência que auxiliam a adesão e invasão nas células hospedeiras. Uma propriedade importante das células hifais é a capacidade de crescimento direcional em resposta ao contato com uma superfície (tigmotropismo), permitindo que o fungo invada especificamente as junções intercelulares (HOFES *et al.*, 2016; DESAI, 2018). Além da penetração ativa, que é um processo realizado pelos fungos, outro mecanismo complementar utilizado por *C. albicans* para invasão de células hospedeiras é a endocitose, processo passivo induzido pelos fungos, mas conduzido pela célula hospedeira, pelo qual enzimas líticas das hifas se ligam e degradam a caderina-E e outras proteínas juncionais das células epiteliais, penetrando-as (PHAN *et al.*, 2007; HOFES *et al.*, 2016; SWIDERGALL; FILLER, 2017).

2 Síntese Bibliográfica

Além do efeito físico do crescimento filamentosos, a destruição do revestimento epitelial do hospedeiro por *C. albicans* é aumentada pela enzima hidrolítica extracelular e pelas interações com o sistema imunológico do hospedeiro. Reconhece-se agora que o componente bacteriano da microbiota oral desempenha um papel importante no desenvolvimento e exacerbação da candidose oral (NOVERR, 2011; LEWIS; WILLIAMS, 2017; HARRIOTT; SULTAN *et al.*, 2018).

2.2 Infecções nosocomiais por *Candida* spp.

Microrganismos considerados contaminantes ou colonizantes possuem características oportunistas e são amplamente relatados em surtos de infecções hospitalares com alta taxa de letalidade, particularmente em pacientes imunossuprimidos, onde desenvolvem-se infecções rapidamente progressivas, de difíceis diagnósticos e refratárias à terapêutica. Portanto, as infecções nosocomiais são consideradas como as principais causas de morbidade e mortalidade na população (PFALLER, 2000; CANTÓN *et al.*, 2001; BUSTAMANTE, 2005; COSTA *et al.*, 2010).

As infecções causadas por *Candida* variam desde uma simples irritação na pele até o desenvolvimento de lesões sistêmicas e de candidemia. O aparecimento de infecções nosocomiais tem ocorrido devido a infecções fúngicas, especialmente por espécies de *Candida*. Leveduras deste gênero são responsáveis por até 78% das infecções nosocomiais (WEINSTEIN; HAYDEN, 1998; CANTÓN *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007). O uso negligenciado de antibióticos de amplo espectro, o uso de cateter e a nutrição parenteral em pacientes hospitalizados contribuem para uma maior disseminação de *Candida* spp. (FRAZER *et al.*, 1992; FRIDKIN; JARVAIS, 1996).

Para os levantamentos epidemiológicos das infecções fúngicas nosocomiais tem sido utilizada uma ampla variedade de técnicas imunológicas, bioquímicas e genéticas, as quais têm possibilitado a caracterização dos isolados (SOLL, 2000; MAROL; YUCESYOY, 2007; ZENG *et al.*, 2008). A taxa média de mortalidade em pacientes hospitalizados com candidose sistêmica no Brasil é de aproximadamente 50% da população (COLOMBO *et al.* 1999; COLOMBO *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 2007), índice relativamente alto quando comparado ao dos

2 Síntese Bibliográfica

Estados Unidos (38%), Israel (21,5%) e Espanha (22 a 33,3%) (BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993; SOTA *et al.*, 1999; SABALLS *et al.*, 2000; RENNERT *et al.* 2000).

2.3 Manifestações clínicas da Candidose Oral

As manifestações clínicas da candidose oral apresentam-se em grande diversidade de quadros, como candidose mucocutânea e candidose invasiva ou sistêmica. A candidose mucocutânea consiste em manifestações superficiais, apresentando as seguintes formas: candidose intertriginosa, onicomicose, candidose oral, vulvovaginite, balanopostite e candidose mucocutânea crônica. Já a candidose invasiva ou sistêmica caracteriza-se por apresentar infecções profundas ou invasivas, podendo localizar-se em um órgão ou disseminar-se via sanguínea (candidemia). Apresentam-se como quadros de sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, renal, ocular, do sistema nervoso central, ou disseminada de difícil tratamento (VILA *et al.*, 2020).

Como principal reservatório para o transporte oral de *Candida*, o dorso da língua é o ponto inicial de infecção para a maioria das formas clínicas de candidose oral. Isso inclui a candidose orofaríngea, caracterizada por invasão do revestimento epitelial da orofaringe, que geralmente ocorre como uma extensão da candidose oral. Existem várias manifestações clínicas e vários sistemas de classificação para candidose oral; no entanto, a classificação mais simplista abrange manifestações orais que geralmente podem ser classificadas em três grandes categorias principais, como: 1) manifestações agudas, 2) manifestações crônicas e 3) síndromes mucocutâneas crônicas (GARCIA-CUESTA *et al.*, 2014; SCULLY; GIOVANNI, 2019).

É importante ressaltar que várias formas clínicas podem ocorrer na cavidade oral e em vários locais ao mesmo tempo. Além disso, embora outras espécies de *Candida não-albicans* possam causar candidose oral, as manifestações orais são idênticas, independentemente da espécie causadora (GARCIA-CUESTA *et al.*, 2014; SCULLY; GIOVANNI, 2019).

Dentre as manifestações agudas da candidose oral, a candidose pseudomembranosa, popularmente conhecida como “aftas”, apresenta-se como placas multifocais amarelas ou brancas presentes em toda a mucosa oral, principalmente no dorso da língua. A característica dessa infecção é que essas

2 Síntese Bibliográfica

placas, constituídas por células epiteliais e por células imunológicas, descamam juntamente com a fermentação das hifas, e podem ser removidas por raspagem, deixando uma base eritematosa (MILLSOP; FAZE, 2016, LEWIS; WILLIAMS, 2017; HELLSTEIN; MAREK, 2019). O diagnóstico da candidose pseudomembranosa é essencialmente baseado na presença das características clínicas (PETERS; EISENBERG, 1990; GARCIA-CUESTA *et al.*, 2014).

Embora a forma de candidose pseudomembranosa seja comum em neonatos e a grande maioria dos casos se deve ao uso de esteroides inalados, existe uma relação direta com a imunodeficiência. De fato, a candidose pseudomembranosa é considerada a principal causa de infecções oportunistas em indivíduos HIV+ e com câncer e em pacientes recebendo terapias imunossupressoras. No caso de indivíduos HIV+, a infecção crônica é recorrente, podendo posteriormente progredir para candidose orofaríngea levando a dificuldades na deglutição e, conseqüentemente, na nutrição (PFALLER; DIEKEMA *et al.*, 2007; NUCCI *et al.*, 2010).

Já as infecções invasivas estão associadas a internações prolongadas, com elevada taxa de mortalidade. Nesses casos, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica (PFALLER; DIEKEMA *et al.*, 2007; NUCCI *et al.*, 2010).

2.4 Fatores predisponentes à Candidose Oral

Os fatores predisponentes e/ou condições que estão envolvidos no desenvolvimento das muitas manifestações clínicas da candidose oral podem ser divididos em: 1) fatores locais, como disfunção salivar (reduções quantitativas e qualitativas da saliva e de fatores antimicrobianos), má higiene da prótese e desgaste prolongado, próteses mal ajustadas (trauma da mucosa), terapia tópica com corticosteróides (enxágue com esteroides ou géis tópicos para tratamento da doença da mucosa oral e inaladores de esteroides) e o hábito de fumar, e 2) fatores sistêmicos, como imunosenescência relacionada à idade (bebês e idosos), antibióticos de amplo espectro (alteração na microbiota bucal), terapia imunossupressora (corticosteroides sistêmicos, agentes imunomoduladores biológicos), quimiorradiação (câncer de cabeça e pescoço), condições de

2 Síntese Bibliográfica

imunocomprometimento (aplasia tímica, hiperimunoglobulina E (IgE), síndromes da candidose mucocutânea crônica, síndrome de Sjögren, doença do enxerto contra o hospedeiro, vírus da imunodeficiência – HIV e leucemia), deficiências nutricionais (ferro, zinco, magnésio, selênio, ácido fólico, vitaminas A, B6, B12 e C) e disfunção endócrina (diabetes, doença de Addison e hipotireoidismo) (RAMIREZ-AMADOR *et al.*, 1997; REDDING *et al.*, 1999; WILLIAMS; LEWIS, 2011, JABRA-RIZK *et al.*, 2016).

2.5 Resposta Imune do hospedeiro frente à *C. albicans*

Como *C. albicans* é um frequente colonizador comensal da mucosa oral, a resposta imune do hospedeiro na cavidade oral é orientada para um estado mais tolerogênico, para evitar uma resposta inflamatória excessiva que pode ser prejudicial ao tecido (NOVAK *et al.*, 2008). No entanto, a parede celular rica em polissacarídeos torna o fungo *C. albicans* altamente imunogênico e facilmente reconhecido pelos receptores de reconhecimento de padrões do hospedeiro (PRRs) (GOW *et al.*, 2007; GOW *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2013).

As células epiteliais, após o reconhecimento de *Candida*, induzem a secreção de vários peptídeos antimicrobianos com efeito de morte direta na célula fúngica, que ajuda no controle da colonização local (NAGLIK *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011; NAGLIK *et al.*, 2017). Secreção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e CCL5) pelas células epiteliais, sinalizam o recrutamento de células fagocíticas, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas no local da infecção (MOYES; NAGLIK, 2011; HEBECKER *et al.*, 2014).

As células epiteliais orais são a primeira linha de defesa contra *C. albicans*, atuando como uma barreira física. No entanto, o fluxo constante de saliva também atua como um importante mecanismo protetor impedindo a adesão de *Candida* às células epiteliais e, portanto, a secreção de saliva é fundamental para a manutenção do estado comensal de *C. albicans* na boca (SULTAN *et al.*, 2018; AMERONGEN; VEERMAN, 2002). Além disso, a saliva é altamente enriquecida com peptídeos antimicrobianos (AMPs), que desempenham um papel vital na imunidade inata e na defesa contra a colonização microbiana (SALVATORI *et al.*, 2016; VILA *et al.*, 2019). Enquanto a maioria dos AMPs são produzidos por vários tipos celulares,

2 Síntese Bibliográfica

as histatinas, uma família de 12 peptídeos catiônicos ricos em histidina com amplo espectro atividade antimicrobiana, são únicas, pois são produzidas exclusivamente pelas glândulas salivares (OPPENHEIM *et al.*, 1988; EDGERTON *et al.*, 1998).

Entre os membros, a histatina-5 possui especificamente atividade antifúngica potente, principalmente contra *C. albicans* (EDGERTON *et al.*, 1998). O mecanismo anti-*Candida* da histatina-5 é descrito como envolvendo a ligação a receptores na parede celular fúngica e captação intracelular onde atinge as mitocôndrias, interrompendo homeostase celular (HELMERHORST *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2003). Dada à importância da saliva, não surpreende que a hipofunção salivar seja considerada um fator predisponente à candidose oral.

Em termos de imunidade adaptativa, a importância das células T na mediação da resposta imune à *Candida* é claramente ilustrada pela alta proporção de indivíduos HIV+ com baixa contagem de células TCD4+ (Th) que desenvolvem candidose orofaríngea (KLEIN *et al.*, 1984; JABRA-RIZK *et al.*, 2016). As células auxiliares TCD4+ (Th) podem se diferenciar em três tipos de células auxiliar efectoras, Th1, Th2 e Th17, e cada uma secretando um conjunto diferente de citocinas com resposta imune final específica (SALLUSTRO; LANZACECCHIA, 2002).

Dentro do contexto da candidose oral, uma resposta dupla dependente de células do tipo Th1 e do tipo Th17 são os principais subconjuntos Th envolvidos (CONTI *et al.*, 2009; PIROFSKI *et al.*, 2009). No entanto, embora o subconjunto Th1 desempenhe um papel central durante as infecções sistêmicas e estabelecidas por *Candida*, as células Th17 estão principalmente envolvidas nas defesas locais do hospedeiro, controlando o crescimento inicial de *Candida* e inibindo a invasão tecidual na mucosa (CONTI *et al.*, 2009; CONTI *et al.*, 2016).

As fases iniciais da candidose oral são definidas por uma resposta típica de neutrófilos. As células Th17 reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de vários receptores de lectina do tipo C (CLRs) e o inflamassoma, liberando IL-23, IL-1 β , IL-6 e TGF- β , que direcionam as células Th17 para as áreas de mucosa. As citocinas IL-17A, IL-17F, IL-22 são liberadas no local da infecção e recrutam neutrófilos, amplificando a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (GAFFEN *et al.*, 2011).

Além disso, um subconjunto de células Th17 (nTh17) residentes no tecido mucoso secretam IL-1, mediando assim a imunidade protetora antifúngica no início

2 Síntese Bibliográfica

da infecção, desde o início da diferenciação das células Th em células Th17 efetoras e o recrutamento para o local da infecção ao longo do tempo (KHADER *et al.*, 2009; CUA; TATO *et al.*, 2010; GLADIATOR *et al.*, 2013).

A proliferação do residente mucoso nTh17 foi demonstrada como induzida por *C. albicans* através da secreção de candidalísina, que mostrou ser essencial para o desenvolvimento de candidose oral em camundongos. Assim, como componente da resposta imune mucosa inata, nTh17 responde à candidalísina secretada, sinalizando sinergicamente com IL-17 por indução de IL-1 de células epiteliais, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (VERMA *et al.*, 2017).

A importância do subconjunto de células Th17 na imunidade protetora contra a infecção da mucosa por *C. albicans* é bem ilustrado pelo crescimento excessivo de *Candida* na pele e mucosa de pacientes com candidose mucocutânea crônica; esses pacientes exibem uma deficiência autossômica recessiva no receptor de citocina IL-17 (IL-17RA) ou uma deficiência autossômica dominante de IL-17F. Além do mais, pacientes com síndrome de hiper-IgE (HIES) apresentam uma mutação no fator de transcrição STAT3, que é importante em várias etapas ao longo do caminho de desenvolvimento da resposta Th17 (CONTI; GAFFEN *et al.*, 2010; PUEL *et al.*, 2011).

Em todos esses casos, a incapacidade de induzir uma resposta Th17 e a secreção deficiente de IL-17 leva ao recrutamento insuficiente de neutrófilos na corrente sanguínea e falha em conter o crescimento de fungos na mucosa (VAN DER MEER *et al.*, 2010; VILA *et al.*, 2020). É importante enfatizar a importância da manutenção da microbiota oral na prevenção da transformação de *C. albicans* de comensal para patogênico, acarretando. No entanto, ainda existem lacunas consideráveis sobre o conhecimento dos mecanismos relacionados à interação patógeno-hospedeiro e, portanto, para contribuir para a concepção de novas estratégias terapêuticas, precisamos melhorar ainda mais nossa compreensão sobre as defesas do hospedeiro.

2.6 Terapia Antifúngica e Resistência Microbiana

Os medicamentos antifúngicos sintéticos comumente empregados para o tratamento das infecções causadas por *Candida* são fluconazol, voriconazol,

2 Síntese Bibliográfica

itraconazol e anfotericina B (COSTA et al., 2004; GUALCO et al., 2007). O fluconazol, voriconazol e itraconazol são derivados azólicos, compostos de três grupamentos amina, que atuam na inibição da síntese do ergosterol (COMO; DISMUKES, 1994; GHANNOUM; HOSSAIN, 2000; KLEPSEK et al., 2000; SILVA et al., 2007).

Os medicamentos azólicos bloqueiam a enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol (VANDEN BOSSCHE, 1997; MAERTENS, 2004). Sendo assim, os antifúngicos triazólicos são considerados bastantes efetivos para o tratamento de candidose oral e candidemia em pacientes neutropênicos devido a sua eficácia antimicrobiana e sua alta biovolatilidade o qual permite uso via oral ou intravenoso. Além disso, os medicamentos azólicos são consideravelmente menos tóxicos que a anfotericina B (NENOFF et al., 1999; BURGESS et al., 2000; PAPPAS et al., 2004).

Métodos de referência e padronização estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) permitem detectar isolados resistentes a determinados antifúngicos através de valores de concentração inibitória mínima (CIM). Embora estes testes apresentem reprodutibilidade, a interpretação de CIM, como resistente ou como suscetível para muitos antifúngicos, não foi ainda bem estabelecida e pode variar em relação aos trabalhos na literatura, por fatores inerentes ou do medicamento utilizado ou do microrganismo e questão (FLECK; HOF, 2008).

São descritos na literatura três mecanismos de resistência aos azólicos, como: 1) redução do acúmulo intracelular do fármaco resultante da utilização reduzida deste agente antifúngico ou do aumento da excreção do fármaco devido à ação de produtos de genes de resistência aos antifúngicos, 2) alteração estrutural da enzima 14- α -demetilase, resultando em uma diminuição na sua ligação aos azólicos e 3) síntese aumentada de 14- α -demetilase, devido à amplificação do gene (transformação de lanosterol em ergosterol não é totalmente impedida quando sob a ação do derivado azólico) (NENOFF et al., 1999).

A resistência aos derivados azólicos pode ser influenciada pela imunossupressão dos pacientes por meio do uso prolongado do agente antifúngico, pelo uso de outras substâncias quimioterápicas e pela resistência intrínseca de

2 Síntese Bibliográfica

espécies de *Candida não-albicans* (LATTIF *et al.*, 2004). O uso frequente de terapia antifúngica em indivíduos HIV+, em decorrência de constantes recidivas de candidose oral ou esofágica, é o principal fator desencadeador da resistência ao fluconazol. Espécies como, *C. glabrata* e *C. krusei* têm mostrado ser resistentes ao fluconazol devido ao uso prolongado deste agente antifúngico (TAYLOR *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2002).

Já anfotericina B é um medicamento poliênico utilizado também no tratamento de infecções fúngicas, entretanto as mais graves, como as sistêmicas. Seu mecanismo de ação é através da ligação ao ergosterol de membrana, produzindo poros, resultando no aumento da permeabilidade levando a um desequilíbrio osmótico pela perda de íons intracelulares e conteúdo citoplasmático, consequentemente, causando lise e morte das células (REX *et al.*, 1994). Este medicamento antifúngico pode ser usado para o tratamento de doenças endêmicas causadas por diferentes agentes, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, causadores de lesões sistêmicas graves. Além disso, este fármaco tem sido amplamente utilizado no tratamento da candidose invasiva (CUENCA-ESTRELA *et al.*, 2000; CARRILLO-MUNOZ *et al.*, 2001).

O mecanismo de resistência a anfotericina B pode ocorrer devido a uma alteração dos lipídios na membrana celular do fungo, sendo que o ergosterol dá lugar à formação de outros tipos de lipídios (SANGLARD, 2002). Embora existam poucos relatos descritos na literatura sobre a resistência aos poliênicos, este mecanismo pode ocorrer em isolados de *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* assim como de *Trichosporon* spp. e *Fusarium* spp. (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1996; VANDEN BOSSCHE, 1997; BOFF *et al.*, 2008).

Apesar dos poucos relatos de resistência dos isolados frente à anfotericina B, seu uso tem sido limitado devido aos graves efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, devido à similaridade do alvo farmacológico e a administração invasiva feita por via endovenosa (NENOFF *et al.*, 1999). As espécies de *Candida* podem ser resistentes a agentes antifúngicos usados para propostas terapêuticas ou profiláticas. Por essa razão, é preciso lançar mão de estudos direcionados a identificação de novos compostos bioativos que possuam atividade antimicrobiana contra *Candida* spp. e que sejam isentos ou causem o mínimo de efeitos adversos.

2.7 Modelos de Vertebrados para o estudo da Candidose Oral

Além dos dilemas éticos associados à experimentação humana, os seres humanos são notoriamente diferentes em termos de hábitos alimentares e sociais, *status* imunológico e quanto à fisiologia oral, incluindo função salivar. Esses fatores, além de variações raciais, étnicas e interculturais, influenciam a etiologia e patogênese de doenças como a candidose. O desenvolvimento de um modelo animal ideal para o estudo da candidose oral torna-se uma ferramenta padronizada que pode ser controlada e manipulada para obter dados universalmente comparáveis sobre a etiopatologia, diagnósticos e gerenciamento do processo da doença (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; JUNQUEIRA, 2011).

Embora muitos dos estudos pioneiros sobre candidose oral tenham sido realizados em primatas, pequenos mamíferos, incluindo ratos e camundongos, ainda estes roedores são a escolha comum para tais estudos sobre razões econômicas e éticas, e por sua relativa similaridade anatômica e imunológica aos seres humanos. A principal vantagem do modelo utilizando roedores para estudo da candidose é o tamanho suficiente da cavidade oral, o que permite facilmente a inoculação por *Candida* e a coleta de amostras. Além disso, a língua deste animal é facilmente colonizada por *Candida*, provocando manifestações clínicas como candidose pseudomenbranosa, glossite romboidal mediana e candidose atrófica (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; CHAMILOS *et al.*, 2007; NAGLIK *et al.*, 2008; JUNQUEIRA, 2011).

Os modelos utilizando camundongos são ideais para desvendar respostas imunes adaptativas dos tecidos da mucosa sob infecção por *Candida*, pois a imunobiologia da mucosa oral murina saudável tem sido bastante caracterizada. Além disso, os camundongos são facilmente obtidos em grande número em biotérios e sua manutenção é relativamente barata (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001).

Uma ressalva ao estudo das interações entre *C. albicans* e hospedeiros utilizando roedores é que *C. albicans* não é um colonizador de superfícies mucosas nesses animais. O equivalente a microbiota normal de roedores é a levedura de *Candida pintolopessi*, que às vezes pode causar doenças em roedores imunocomprometidos. Isso tem benefícios e limitações. Uma vantagem é que qualquer resposta do hospedeiro a *C. albicans* não é afetada por respostas imunes

2 Síntese Bibliográfica

adaptativas ao fungo (NAGLIK *et al.*, 2008). E a desvantagem é que o estabelecimento, a colonização ou infecção da mucosa, geralmente requer intervenção com antibióticos, indução de xerostomia, tratamento com agentes imunossupressores ou uso de animais geneticamente modificados.

O efeito da xerostomia em camundongos sialoadenectomizados prolongou a colonização oral por *C. albicans* 75 dias pós-infecção *versus* 30 dias de colonização para os animais controle com 1 ou 4 inoculações de suspensão de *C. albicans* (TOTTI *et al.*, 2002). O procedimento com 4 inoculações aumentou a permanência de *C. albicans* na cavidade oral de camundongos sialoadenectomizados e produziu lesões no dorso da língua, apresentando pseudo-hifas no interior do epitélio, acantose e infiltrado neutrofílico, formando microabcessos intra-epiteliais, com maior prevalência de lesões nas papilas cônicas simples (TOTTI *et al.*, 2004). Esse modelo favoreceu a permanência de *C. albicans* na cavidade oral e as sucessivas inoculações influenciaram na presença e extensão da doença ao longo do tempo.

Um novo modelo murino de candidose oral usando administração de estrogênio foi desenvolvido. Camundongos BALB/c receberam uma dose intramuscular e subcutânea semanal de 5 µg de estrogênio, dos quais a administração intramuscular foi mais eficaz para induzir a colonização oral. Após 2 e 3 semanas de infecção por *C. albicans*, leveduras e hifas foram detectadas na camada de células espinhosas queratinizadas do epitélio em diferentes locais, como o dorso da língua, o assoalho de boca, palato e mucosa alveolar respectivamente. Na quinta semana, células fúngicas e hifas ainda estavam claramente presentes no epitélio oral. Neste estudo, os autores também avaliaram a imunização para *C. albicans* (RHAMAN *et al.*, 2007).

Embora estes fatores predisponentes, como xerostomia e administração de estrogênio, tenham sido utilizados para induzir candidose oral em camundongos, a maioria dos modelos foram realizados em camundongos imunossuprimidos (TAKAKURA *et al.*, 2003; TAKAKURA *et al.*, 2004; TAGUCHI *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012; HAYAMA *et al.*, 2012). Takakura *et al.* (2003) desenvolveram um modelo para candidose experimental induzida que combina imunossupressão e tratamento com tetraciclina para o sucesso da progressão da doença, permitindo o estudo da patogênese fúngica e novas opções terapêuticas. Esses autores observaram sinais característicos de candidose pseudomembranosa na cavidade bucal de

2 Síntese Bibliográfica

camundongos tratados com prednisolona na concentração de 100 mg/Kg de peso corporal e 0,83 mg/mL de tetraciclina na água de beber. Aos 3 e 7 dias pós-infecção, 10^5 a 10^6 UFCs foram recuperados da cavidade oral de cada animal, e placas esbranquiçadas semelhantes à coalhada foram observadas na maioria do dorso das línguas.

Animais com sinais de candidose pseudomembranosa apresentaram colonização extensa no epitélio da superfície dorsal por numerosas hifas, bem como a destruição severa do revestimento epiteliais. Além disso, este modelo permitiu verificar a atividade terapêutica do fluconazol e anfotericina B, os quais reduziram quantitativamente e clinicamente as lesões por *C. albicans*. A vantagem deste modelo é o desenvolvimento de candidose oral do tipo pseudomembranosa, que mimetiza a infecção natural em humanos e é útil para avaliação tanto sintomatológica quanto micológica e permite o estudo da resposta imune quanto aos tratamentos antifúngicos (COSTA *et al.*, 2013).

Vários tratamentos para candidose oral foram testados neste modelo, incluindo: fatores salivares (TAKAKURA *et al.*, 2004; KAMAGATA-KIYOUURA *et al.*, 2004), moléculas sensíveis ao *quorum sensing* (HISAJIMA *et al.*, 2008), terapia fotodinâmica (COSTA *et al.*, 2012; MIMA *et al.*, 2010), extratos vegetais (TAGUCHI *et al.*, 2010; NINOMIYA *et al.*, 2012) e inibidores da bomba de efluxo (HAYAMA *et al.*, 2012). Portanto, o modelo experimental de candidose oral descrito por Takakura *et al.* (2003) utilizando camundongos imunossuprimidos é uma ferramenta útil para estudar a resposta do hospedeiro à infecção da mucosa oral por *C. albicans*, bem como a eficácia de novos agentes antifúngicos para o tratamento.

Além do modelo murino desenvolvido por Takakura *et al.* (2003) outros modelos de candidose experimental em camundongos imunossuprimidos foram publicados na literatura. Teichert *et al.* (2002) induziram candidose oral em camundongos com imunodeficiência grave, coletando amostras de *C. albicans* da cavidade oral, com um *swab*, 3 vezes por semana, durante um período de 4 semanas. Os animais foram tratados com terapia fotodinâmica usando azul de metileno e laser de diodo. A terapia exibiu atividade antifúngica, diminuindo o número de células fúngicas e aumentando o infiltrado inflamatório e a exocitose neutrofílica, demonstrando a capacidade do modelo de gerar uma resposta imune, apesar da ausência de células T e células B (TEICHERT *et al.*, 2002).

2 Síntese Bibliográfica

Solis e Filler (2012) descreveram um método simples para induzir candidose orofaríngea injetando acetato de cortisona (220 mg/kg), por via subcutânea, antes da infecção por *C. albicans*. Os camundongos foram inoculados sublingualmente por 75 min com um *swab* saturado com a suspensão de *C. albicans*. No dia 5 após a inoculação, 10^5 a 10^6 UFC foram recuperados do tecido oral e a histopatologia mostrou aspectos característicos de candidose orofaríngea (SOLIS; FILER, 2012).

2.8 Modelos de Invertebrados para o estudo da Candidose Sistêmica

Modelos de experimentação animal ainda são necessários para testar tratamentos antifúngicos antes do uso em seres humanos. Infecções fúngicas induzidas experimentalmente são classicamente realizadas em roedores (camundongos e ratos) ou coelhos (SINGKUM *et al.*, 2019). Apesar de sua alta relevância, os modelos de pequenos roedores apresentam desvantagens significativas. Em particular, eles exigem infraestrutura especializada, são difíceis de implementar, as durações da experimentação são geralmente longas, e considerações éticas limitam seu uso.

Alavancados pelos movimentos de defesa dos animais, os questionamentos acerca da experimentação animal tomaram força e questões sobre alternativas viáveis para a substituição de cobaias devem ser levadas em consideração. A Lei Arouca, a qual trata do uso de diretrizes para o uso de animais de experimentação, recomenda que seja colocado em prática o uso dos 3 “erres” *replacement* (substituição), *reducement* (redução) e *refinement* (refinamento) (BONELLA, 2009).

Por essas razões, modelos alternativos foram desenvolvidos com o intuito de serem utilizados como triagem e, dessa forma, reduzir o número de mamíferos em experimentação. Vários modelos interessantes de mini-hospedeiros, como a traça de cera *Galleria mellonella*, a lombriga *Caenorhabditis elegans* e a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, têm sido utilizados para estudar a fisiopatologia de diferentes espécies de fungos (JACOBSEN 2014; REGULIN; KEMPKEN, 2018) e, mais recentemente, alguns tratamentos antifúngicos também foram avaliados nesses modelos (GLAMPEDAKIS *et al.*, 2018; WURSTER *et al.*, 2019).

2 Síntese Bibliográfica

Na última década, modelos utilizando mini-hospedeiros invertebrados, com genética e imunidade bem caracterizada, têm sido efetivamente utilizados para explorar vários aspectos da patogenicidade e resposta imune do hospedeiro. Vários fatores desencadearam o desenvolvimento desses modelos. Em primeiro lugar, o uso de modelos animais de mamíferos gerou barreiras logísticas para estudos em larga escala. Segundamente, a percepção de que mecanismos imunológicos inatos são conservados evolutivamente entre invertebrados e mamíferos e que vários fatores comuns de virulência estão envolvidos na patogênese fúngica permaneceram filogeneticamente em hospedeiros diferentes - por exemplo, moscas da fruta, nemátodos e mamíferos - expandiram ainda mais esse tipo de pesquisa. E, por fim, organismos invertebrados têm sido cada vez mais utilizados como ensaios *in vivo* para estudos sobre a eficácia de fármacos antifúngicos devido ao seu baixo custo e simplicidade de manuseio (CHAMILOS *et al.*, 2007; JUNQUEIRA, 2011).

Além disso, como as sequências genômicas de fungos com grande relevância médica, como espécies de *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* foram concluídas, o aumento da informação genética criou uma necessidade crescente de formas inovadoras simples de rastrear mecanismos de virulência e avaliar a contribuição de genes individuais para a patogênese fúngica (CHAMILOS *et al.*, 2007; JUNQUEIRA, 2011).

Laboratorialmente, *D. melanogaster* pode ser infectada com patógenos fúngicos usando vários métodos, como injeção, pulverização direta de esporos de fungos nas moscas, além da ingestão. O genoma e sistema imunológico de *D. melanogaster* bem caracterizados determinam uma grande vantagem desse inseto sobre os demais. A sequência do genoma de *D. melanogaster* foi uma das primeiras sequências eucariótica a ser concluída e disponibilizada (FUCHS; MYLONAKIS, 2006; CHAMILOS *et al.*, 2007; CHAMILOS *et al.*, 2009).

Pesquisadores levantaram a hipótese de que *C. albicans* desenvolveu mecanismos para invadir hospedeiros díspares e testou se mutantes de *D. melanogaster* poderiam servir como hospedeiro no modelo para a triagem de genes de virulência de *C. albicans*. Das 34 cepas mutantes de *C. albicans* testadas, apenas o mutante prototrófico *cas2* exibiu virulência atenuada no receptor Toll das moscas mutantes. Da mesma forma, camundongos BALB/c infectados sistemicamente com o mutante *cas2* de *C. albicans* tiveram sobrevida significativamente melhor e menor carga fúngica nos rins e baço do que aqueles

2 Síntese Bibliográfica

infectados com a cepa selvagem. O CAS5 codifica um regulador transcricional chave dos genes envolvidos na célula integridade da parede. Essas descobertas corroboram a noção de que *D. melanogaster* é um modelo promissor para estudos em larga escala de genes envolvidos na patogênese da infecção por *C. albicans* em mamíferos (CHAMILOS *et al.*, 2006).

Entretanto, *D. melanogaster* é substancialmente menor do que *G. mellonella*. Sendo assim, o modelo experimental utilizando larvas de *G. mellonella* leva vantagem pelo seu tamanho relativamente grande (cerca de 5 cm de comprimento), o que permite a injeção de inóculos padronizados de fungos e o sucesso em estudos sobre a farmacodinâmica de medicamentos. Além disso, *G. mellonella* pode ser mantida sob condições de temperatura variando de 25°C a 37°C. A capacidade de estudar patógenos a 37°C permite o estudo de características de virulência relacionadas à temperatura, como é o caso de *C. albicans* (JUNQUEIRA, 2011).

As larvas de *G. mellonella* apresentam em sua hemolinfa seis tipos de hemócitos (pró-hemócitos, coagulócitos, esferulócitos, oenocitóides, plasmatócitos e granulócitos), os quais têm a capacidade de neutralizar e eliminar patógenos desempenhando um importante papel na defesa contra fungos e demais patógenos (ASHHURST; RICHARDS, 1964; RATCLIFFE, 1985; LAVINE; STRAND, 2002). A principal desvantagem desses insetos é a ausência de métodos para análise genética e a falta de uma sequência completa do genoma para esse modelo (FUCHS; MYLONAKIS, 2006; CHAMILOS *et al.*, 2007; MYLONAKIS, 2008).

Em resumo, o modelo experimental *in vivo* de larvas de *G. mellonella* é particularmente interessante pelo custo acessível e por não necessitar de infraestrutura especializadas e pela fácil manipulação. As larvas de *G. mellonella* são razoavelmente pequenas, permitindo um manuseio preciso e suave e podem sobreviver a 37°C. Os resultados experimentais são reprodutíveis e fáceis de serem observados através da melanização das larvas e diminuição da mobilidade e morte através da curva de sobrevivência (SINGKUM *et al.*, 2019).

Em virtude dos trabalhos apresentados, este modelo permite a avaliação das interações dos microrganismos e seu hospedeiro sistemicamente e facilita o estudo de novos compostos com potencial antifúngico, funcionando como uma ferramenta útil na triagem para a redução da utilização de mamíferos em estudos com modelo animal.

2.9 Plantas Medicinais: *Punica granatum* e seu potencial farmacológico

Com o crescente desenvolvimento da resistência microbiana frente aos fármacos sintéticos e o aparecimento de efeitos adversos pelos causado pelo uso de medicamentos antifúngicos, pesquisas por novos componentes antimicrobianos têm se tornado cada vez mais relevantes. Desde a última década, o interesse por produtos naturais tem aumentado, com as plantas medicinais sendo fontes eminentes de compostos bioativos. Muitas plantas utilizadas na medicina popular têm sido estudadas para a descoberta e desenvolvimento de fitofármacos por meio de suas atividades antimicrobianas, como fonte de novos compostos antifúngicos que causem poucos efeitos colaterais e que possuam grande espectro de ação (PHONGPAICHIT *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2006; ANIBAL, 2010).

A romã, *Punica granatum* Linné (*P. granatum*), é conhecida há muito tempo por seu fruto comestível, sendo mencionada na Bíblia e no Alcorão, estando associada com fertilidade. Para os gregos, a romã era um símbolo da fecundidade; para os judeus, simbolizava a esperança de um ano novo próspero; já para os romanos, a fruta significava ordem, sorte e riqueza. É nativa da Pérsia e se disseminou pela Ásia, Norte da África e Europa Mediterrânea, incluindo a Turquia. É conhecida por ser uma das frutas mais saudáveis e nutritivas, por sua alta atividade antioxidante (GIL *et al.*, 2000; AVIRAM *et al.*, 2004; SEERAM *et al.*, 2006; AVIRAM *et al.*, 2008) e alto conteúdo de compostos anticarcinogênicos (KIM *et al.*, 2002; LANSKY *et al.*, 2005; MALIK *et al.*, 2005; ADHAMI; MUKHTAR, 2006; MALIK; MUKHTAR, 2006; BELL; HAWTHORNE, 2008).

Estudos estabeleceram que certos compostos do suco da romã reduziram significativamente a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), podendo também reduzir a pressão sanguínea e possuir efeito antiaterosclerótico (AVIRAM *et al.*, 2008). A medicina popular recomenda tanto a casca do caule como do fruto para tratar diversas doenças. A casca do caule é empregada como vermífugo, em especial para tênia. Do fruto, são utilizadas as cascas dessecadas ou frescas para o tratamento de diarreias e infecções de pele e mucosas. E as sementes frescas são utilizadas para afecções de boca e garganta (MATOS, 1989; LANSKY *et al.*, 1998).

A romã e seus derivados apresentaram efeito fotoquimiopreventivo contra danos causados por raios ultra-violeta na pele humana (AFAQ *et al.*, 2009); a ingestão diária de uma alta concentração de lignanas (1,5 mg) presentes no suco da

2 Síntese Bibliográfica

romã pode reduzir o risco de câncer de mama pós-menopausa (TOUILLAUD *et al.*, 2007); foi constatado, também, que flavonoides presentes no suco da romã preveniram a oxidação do LDL e também foram anti-artrogênico (WANG *et al.*, 2004). Ainda, pessoas tratadas com infusão das flores e folhas da romã tiveram redução dos níveis das enzimas TGO/TGP, e dos danos no fígado, demonstrando um efeito hepatoprotetor dessa planta (CELIK *et al.*, 2009).

A romã é uma fruta rica em compostos fenólicos, o qual inclui flavonóides e taninos hidrolisáveis (AFAQ *et al.*, 2005). Extratos de diferentes partes do fruto como o suco (AVIRAM *et al.*, 2000), as sementes (WANG *et al.*, 2004) e a casca (LANSKY; NEWMAN, 2007), tem apresentado grande atividade antioxidante. Estudos tem demonstrado que seu suco possui propriedades antiaterogênica (AVIRAM, 2002), anti-inflamatória e anticâncer (AFAQ *et al.*, 2005; MALIK *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2007), devido às suas 8 propriedades antioxidantes (SOOBATTE *et al.*, 2005). De acordo com Singh *et al.* (2002), as propriedades antioxidantes do extrato da romã podem ser encontrados principalmente nas cascas e nas sementes sendo que o extrato metanólico da casca demonstrou elevada atividade antioxidante entre os extratos testados. Mirdehghan e Rahemi (2007) observaram que os níveis de compostos fenólicos totais eram mais altos na casca da romã do que nos arilos (SINGH *et al.*, 2002; MIRDEHGHAN; RAHEMI, 2007).

Dentre os fitoconstituintes presentes no fruto de *P. granatum* estão os alcaloides (peletierina, metilpeletierina, pseudopeletierina e isopeletierina), manita, vários fenóis (delfinidina, cianidina e pelargonidina), flavonoides, ácido elágico (ésteres de glucose) e ácido gálico. A casca é rica em alcaloides e taninos, incluindo granatinas A e B, galagildilactona, casuarinina, pedunculagina, telimagrandina I, corilagina, punicalina e punicalagina, sendo este o principal composto responsável pela atividade antimicrobiana (FETROW; AVILA, 2000; CATÃO *et al.*, 2006), que pode ser explicada pela capacidade deste composto se hidrolisar em ácido elágico e outros polifenóis menores *in vivo* e atravessar a membrana mitocondrial *in vitro* (SEERAM *et al.*, 2004; LARROSA *et al.*, 2006).

Os principais compostos fenólicos presentes no suco da romã podem ser classificados em quatro grupos. O primeiro grupo inclui as antocianinas. No segundo grupo estão presentes os taninos hidrolisáveis do tipo galagil, incluindo grupos de isômeros de punicalagina (α e β), punicalina (galagilglucose) e outros compostos relacionados. No terceiro estão os compostos fenólicos, incluindo o ácido elágico e

2 Síntese Bibliográfica

seus glicosídeos. E o quarto grupo é formado por um extenso grupo de taninos hidrolisáveis, no qual esses compostos são diferentes combinações de glucose, ácido gálico, ácido hexahidroxidifênico e ácido tertagálico (GIL *et al.*, 2000).

Diversos trabalhos demonstram a atividade antimicrobiana do extrato de *P. granatum* contra vários microrganismos relevantes na área da saúde, como *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Erwinina carotovora*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans* e *Nocardia asteroides* (DINIZ *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2000; PRASHANTH *et al.*, 2001; HOLETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2002).

Ao testar os compostos isolados de *P. granatum* contra várias espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pesquisadores observaram efeito inibitório, demonstrando que o ácido gálico apresenta elevada atividade antibacteriana contra todas as cepas sensíveis a essa fração (NAZ *et al.*, 2007).

Pesquisadores observaram *in vitro* que as bactérias orais e o fungo *C. albicans* são sensíveis ao extrato de *P. granatum* e afirmaram a importância das indicações terapêuticas das plantas medicinais como método alternativo na clínica odontológica, uma vez que o extrato hidroalcoólico da casca de *P. granatum* apresentou potente atividade antimicrobiana sobre os microrganismos presentes no biofilme supra-gengival, como também demonstrou inibição da aderência microbiana na superfície (PEREIRA *et al.*, 2011).

De modo inovador e de grande relevância para a área da saúde, pesquisadores observaram que o extrato do suco de *P. granatum* inibiu a ligação do vírus HIV com o linfócito TCD4+ e seus receptores (CXCR4/CCR5), impedindo, desse modo, o desencadeamento da doença. Para indivíduos HIV+, a descoberta de um composto natural que impeça essa ligação tornaria o tratamento mais eficiente e menos agressivo, aumentando as chances de uma vida mais saudável (NEURATH *et al.* 2005).

Quando analisado o extrato de *P. granatum* na inibição de leveduras do gênero *Candida*, vários trabalhos mostram atividade dessa planta, como demonstrado por Navarro *et al.* (1996), Vasconcelos *et al.* (2003), Duraipandiyar *et al.* (2006), Vasconcelos *et al.* (2006), Reddy *et al.* (2007), Al-Zoreky (2009) e Duman *et al.* (2009). Os compostos presentes no extrato de *P. granatum* se ligam à parede celular, atravessam essa estrutura e interferem na produção de proteínas e enzimas

2 Síntese Bibliográfica

responsáveis pela adesão microbiana. (VASCONCELOS *et al.*, 2006). Além disso, os taninos atuam perturbando a co-agregação entre os microrganismos na parede celular (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Corroborando a pesquisa anterior, pesquisadores relataram que a atividade antimicrobiana está relacionada diretamente com a alta quantidade de taninos presentes nos extratos (DJIPA *et al.*, 2000).

Anibal (2007) avaliou a atividade da romã através dos extratos brutos diclorometano e metanólico, contra cepas padrão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. utilis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, e *C. rugosa*, demonstrando atividade antifúngica desta planta de interesse para a terapia alternativa contra esses microrganismos (ANIBAL, 2007). Neste mesmo contexto, a partir de um estudo avaliando a atividade antifúngica do extrato e dos compostos isolados a partir das cascas de *P. granatum* contra *C. albicans*, pesquisadores identificaram e verificaram na fração acetato de etila, que a atividade antifúngica de *P. granatum* é predominantemente devido à presença da punicalagina, principal composto presente no extrato das cascas da Romã (ENDO *et al.*, 2010).

Portanto, frente aos diferentes compostos bioativos com potencial antimicrobiano e protetor presentes no extrato das cascas de *P. granatum*, bem como sua ampla utilização na área da saúde, novas abordagens terapêuticas utilizando o extrato da romã no tratamento contra infecções orais causadas por *C. albicans*, devem ser estudadas e desenvolvidas.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica e imunomodulatória do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linné em dois modelos experimentais *in vivo* de candidose (sistêmica e oral) a fim de verificar a interferência do extrato no desenvolvimento destas patologias e a modulação da resposta imune do hospedeiro pós-tratamento. Em paralelo, pretendemos ainda investigar se existe a presença de efeitos adversos nas administrações diárias de *P. granatum*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**CAPÍTULO 1: Modelo experimental *in vivo* de candidose sistêmica em larvas de *Galleria mellonella***

A fim de avaliar o efeito da atividade antimicrobiana e imunomoduladora de *P. granatum*, utilizou-se um modelo experimental de candidose sistêmica, realizando as seguintes etapas:

- Análise do perfil fitoquímico de *P. granatum* (HPLC-PDA).
- Avaliação da toxicidade de *P. granatum* e da Anfotericina B em *G. mellonella*, através do percentual de sobrevivência e tempo médio de vida de larvas de *G. mellonella*.
- Avaliação da atividade antimicrobiana de *P. granatum* frente à infecção por *C. albicans*, através do percentual de sobrevivência e tempo médio de vida de larvas de *G. mellonella*.
- Avaliação do potencial profilático de *P. granatum* frente à infecção por *C. albicans*, através do percentual de sobrevivência e tempo médio de vida de larvas de *G. mellonella*.
- Determinação da densidade hemocitária, a partir da contagem de hemócitos da hemolinfa das larvas de *G. mellonella*.

CAPÍTULO 2: Modelo experimental *in vivo* de candidose oral

Nesta etapa da avaliação do potencial anti-*Candida albicans* e imunomodulatório de *Punica granatum*, utilizou-se um modelo experimental de candidose oral (localizada), associado a um parâmetro de comparação, o fluconazol, por meio das seguintes etapas:

A) Análise fitoquímica e inibitória do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*

- Separação e identificação cromatográfica (UHPLC-qTOF-MS/MS) dos compostos bioativos presentes no extrato bruto hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*
- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *P. granatum* frente a *C. albicans*.

B) Avaliação da toxicidade do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* e do fluconazol administrados em camundongos BALB/c saudáveis, por meio dos seguintes parâmetros:

- Cinética e Percentual da perda de peso corporal (final *versus* inicial).
- *Screening* hipocrático (consumo de ração e água, percentual de defecação, resposta ao toque, e resposta ao aperto da cauda).
- Análise de marcadores bioquímicos séricos (ureia, creatinina, TGP, triglicerídeos e proteínas totais).
- Peso e Análise de alterações histopatológicas presentes no baço, fígado e rins, por meio da coloração por Hematoxilina/Eosina (H&E).

C) Autenticação do estabelecimento do modelo experimental de candidose oral localizada em camundongos BALB/c imunossuprimidos após 7 dias de infecção por *C. albicans*, e verificação da duração da infecção até 14 dias, por meio dos seguintes parâmetros:

- Cinética e Percentual da perda de peso corporal (final *versus* inicial).
- Escore clínico da língua, considerando a extensão das placas brancas miceliais na superfície dorsal.

3 Proposição

- Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de *C. albicans* por grama de tecido (UFC/g), a partir do homogenato da língua.
- Quantificação de leveduras/hifas presentes no dorso da língua por meio da coloração por ácido periódico de Schiff (PAS), a partir de cortes microscópicos.

D) Avaliação da atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico das cascas *P. granatum* após 7 dias de administração diária por gavagem, em camundongos BALB/c com candidose oral localizada estabelecida experimentalmente, por meio dos seguintes parâmetros:

- Análise do peso corporal dos animais:
 - ✓ o Cinética e Percentual da perda de peso (final *versus* inicial).
- Análise da língua:
 - ✓ Macroscópica: Escore clínico, considerando a extensão das placas brancas miceliais na superfície dorsal.
 - ✓ Microbiológica: Contagem das UFC/g, a partir do homogenato.
 - ✓ Microscópica: Quantificação das leveduras/hifas e análise subjetiva do infiltrado inflamatório, por meio da coloração de H&E e PAS, respectivamente.
- Análise do baço, fígado e rins:
 - ✓ Microscópica: Análise de alterações histopatológicas presentes no baço, fígado e rins, por meio da coloração por H&E.

E) Avaliação da atividade imunomodulatória do extrato hidroalcoólico das cascas *P. granatum* após 7 dias de administração diária por gavagem, em camundongos BALB/c com candidose oral localizada estabelecida experimentalmente, por meio dos seguintes parâmetros:

- Análise dos linfonodos cervicais e da língua:
 - ✓ Peso dos linfonodos (g).

Quantificação simultânea de citocinas e quimiocinas (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-17E, IL-17F, IL-22, IL-23, MIP-1 α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 e TNF- α), por meio do *kit* MILLIPLEX®, a partir do homogenato de cada tecido.

4 Métodos

4 MÉTODOS

Para a execução dos objetivos deste trabalho, o mesmo foi dividido em dois capítulos, detalhadamente descritos no item 5, para a melhor compreensão dos resultados obtidos a partir de cada modelo experimental *in vivo* utilizado. O **CAPÍTULO 1** abordou o modelo experimental de candidose sistêmica em larvas de *G. mellonella*, já no **CAPÍTULO 2** foi apresentado e discutido o modelo experimental de candidose oral desenvolvido em camundongos BALB/c imunossuprimidos.

Cada capítulo está estruturado da seguinte maneira: título, resumo, uma breve introdução sobre o tema, os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados e a discussão sobre eles e, na sequência, as referências bibliográficas. Ao final da tese, será apresentada uma conclusão sobre cada capítulo e uma conclusão geral sobre a ação antifúngica e imunomodulatória de *P. granatum* frente à candidose, baseada nos modelos *in vivo* utilizados para o desenvolvimento desta Tese.

5 Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CAPÍTULO 1: MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* DE CANDIDOSE SISTÊMICA EM *GALLERIA MELLONELLA*

Esta etapa inicial do trabalho foi realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), *Campus* de São José dos Campos, no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, sob a supervisão da Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, no período de 02/01/2017 a 23/03/2017. Este trabalho foi publicado em 06 de agosto de 2018 na revista ***Journal of Clinical and Experimental Toxicology***, ISSN: 2630-4570 doi.org/10.4066/2630-4570, com o título ***“Antimicrobial and immunomodulatory activity of pomegranate in the systemic candidiasis on *Galleria mellonella*”***.

Neste capítulo, será abordado o modelo experimental *in vivo* de candidose sistêmica em larvas de *G. mellonella*. A elaboração, execução, bem como os resultados obtidos e discussão serão descritos cronologicamente ao longo do texto.

*Almeida NLM, Figueiredo-Godoi, LMA, Venturini J, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of pomegranate in the systemic candidiasis on *Galleria mellonella*. J Clin Exp Tox. 2018b;2(2):8-17. doi: 10.4066/2630-4570.014.*

Antimicrobial and immunomodulatory activity of pomegranate in the systemic candidiasis on *Galleria mellonella*

Nara Ligia Martins Almeida¹, e-mail: nlmaunesp@hotmail.com; Livia Mara Alves Figueiredo-Godoi², e-mail: livia.figueiredo@ict.unesp.br; James Venturini³, e-mail: james.venturini@ufms.br; Luiz Leonardo Saldanha^{4,5}, e-mail: lluizsaldanha@gmail.com; Anne Lígia Dokkedal⁵, e-mail: dokkedal@fc.unesp.br; Juliana Campos Junqueira², e-mail: juliana@ict.unesp.br; Vanessa Soares Lara¹, e-mail: vanessa@fob.usp.br.

5 Resultados e Discussão

¹Department of Surgery, Stomatology, Pathology and Radiology, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisola, 9-75, Vila Universitária, 17012-901, Bauru, Brazil. Phone number: +55143235-8248;

²Department of Biosciences and Oral Diagnosis, São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology, São José dos Campos, Avenida Engenheiro Francisco José Longo 777, Sao Dimas, 12245-000, São José dos Campos, Brazil. Phone number: +55123947-9342;

³Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária, 79070-900, Campo Grande, Brazil. Phone number: +55673345-7370;

⁴Department of Botany, São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, S/N, Distrito de Rubião Júnior, 18618-689, Botucatu, Brazil. Phone number: +551438800124;

⁵Department of Biological Sciences, São Paulo State University (Unesp), Faculty of Sciences, Avenida Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, Bairro Vargem Limpa, 17033-360, Bauru, Brazil. Phone number: +55143103-6078.

*Corresponding author:

PhD Vanessa Soares Lara

Bauru School of Dentistry, Department of Surgery, Stomatology, Pathology and Radiology

Bauru-SP, Brazil

Tel : +55143235-8248

E-mail: vanessa@fob.usp.br

Abstract

The increasing resistance of microorganisms to conventional antifungal drugs has encouraged studies designed to discover alternative therapies for infections caused by *Candida* spp. Pomegranate (*Punica granatum* L.) is an effective herbal extract with broad spectrum of antimicrobial action and able to modulate the immune response. In this study, we evaluated the antimicrobial and immunomodulatory pomegranate activity on *in vivo* candidiasis using *Galleria mellonella* model by survival percentage and hemocyte counts present in hemolymph, respectively. After

5 Resultados e Discussão

selection of the non-toxic concentrations of both pomegranate and amphotericin B to *G. mellonella* larvae, two experimental designs were performed: prophylaxis by inoculating a single dose of extract, 24 hours before *C. albicans* infection, and therapy by inoculating single dose 1 hour after fungal infection. As control, larvae were infected/untreated, treated with amphotericin B or non-infected/untreated. Both treatments were effective against *C. albicans* infection by means of larvae survival curves. However, prophylactic effect of pomegranate resulted in longer survival time than therapy. Next, multiple doses of the extract were administered in larvae prior to infection, resulting in highest survival percentage and higher hemocyte density when compared to the infected and non-treated larvae. Concluding, the findings suggest that pomegranate possess antimicrobial action against *C. albicans* and immunomodulated the response in *G. mellonella*, with systemic candidiasis, principally in the prophylaxis using multiple doses.

Key-words: *Punica granatum*, toxicology, *Candida albicans*, microbial resistance, alternative treatment.

Introduction

The fungus *Candida albicans* (*C. albicans*) is a commensal organism of the mucosal microbiota in the oral cavity, gastrointestinal and genitourinary tracts, presenting ability to switch reversibly between yeast, pseudohyphal, and hyphal growth forms. This polymorphism is one of the most investigated virulence attributes in mucosal infections and disseminated infections affecting susceptible individuals [1]. The hyphal form plays key roles in the infection process, and can promote tissue penetration and escape from immune cells, causing vaginitis, oral candidiasis, cutaneous candidiasis, candidemia, and systemic infections [2]. Systemic candidiasis is the most frequent hospital infection accounting for up to 15% of bloodstream infections, and *Candida* species are the main causative agents in 50–70% of systemic fungal infections [3-5].

The candidiasis treatment consists in the administration of antifungal agents such as nystatin, amphotericin B, clotrimazole, fluconazole, ketoconazole and itraconazole. However, the use of these drugs can cause side effects and lead to microbial development of resistance, being related in the presence of a small number

5 Resultados e Discussão

of tolerant fungal cells, since the drugs decrease of the ergosterol synthesis in the cell membrane [6]. The increase in the microorganism resistance to conventional antifungal drugs has encouraged studies designed to discover new treatments for infections caused by *Candida* spp.

Therefore, alternative therapies for the candidiasis treatment are crucial and the use of herbal medicines seems being a promising solution [7, 8]. Usually, the plants present numerous bioactive compounds that may be potent antimicrobial agents against *C. albicans* [9, 10]. Thus, natural products can be a treatment viable alternative to replace or associate with conventional synthetic chemicals. In this context, the antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* Linné) against microorganisms has been widely investigated [11-14]. This extract is rich in two types of polyphenolic compounds: anthocyanins, which give the red color to fruits and juice, and hydrolyzable tannins, commonly related to the antimicrobial activity of this plant [15].

Evaluating the antifungal activity of the extract and compounds isolated from peels of *P. granatum* against *C. albicans*, the antifungal activity has been associated predominantly to the presence of punicalagin, considered the main component of this plant [16]. In addition, the pomegranate peels extract causes serious damage to the *C. albicans* yeasts cellular structure, interfering on fungal growth/development, and consequently preventing tissue invasion [17]. However, the mechanism of action of the bioactive principles of this plant on the microorganisms is not clearly elucidated [18]. In addition to this anti-*Candida* action, *P. granatum* also has immunomodulatory properties. The flavonoids extracted from the fermented juice and the oil from the seeds of this herbal medicine caused inhibition of the activity of cyclooxygenases and lipoxygenases [19, 20].

Considering the *C. albicans* clinical importance, *in vivo* experimental models may be used as an important tool to study the *Candida*-host interaction, evaluating the pathogenicity, its development, diagnosing and controlling the disease, as well as testing new alternatives therapies for treatment [21, 22], including the use of herbal medicines. *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) has emerged as a modern alternative to study microbial infection based *in vivo* model systems. Among the several characteristics, *G. mellonella* larvae have the advantage of being able to grow at a broad range of temperatures, mimicking the natural environment of mammalian hosts, consequently allowing the *C. albicans* growth. In addition, *G.*

5 Resultados e Discussão

mellonella model has been used to study the new drugs development as well as the immune response of the host. Therefore, *G. mellonella* is an *in vivo* experimental model advantageous for searching the *C. albicans* pathogenicity and new anti-fungal therapies [23-25].

Moreover, the immune response of these insects bear many similarities to those obtained using mammals [26, 27]. The *G. mellonella* larvae possess six different types of hemocytes in the hemolymph which are arranged in: pro-hemocytes, coagulocytes, spherulocytes, enocitoids, plasma cells and granulocytes which play a key role in cellular defense and are involved in phagocytosis, nodule formation and encapsulation. The plasma cells were also divided according to morphology and function in four other subclasses [28-31]. The result of the humoral immune response is the production of a range of antimicrobial peptides that immobilize and kill the pathogen [32].

Thus, in the present study, we evaluated the antimicrobial activity of pomegranate in an experimental model of systemic candidiasis employing *G. mellonella* by the survival percentage and median time. Moreover, in order to evaluate the immunomodulatory activity of this herbal, hemocytes present in larvae hemolymph were counted.

Material and Methods

Pomegranate and Amphotericin B

The pomegranate fruit peels were purchased in November from 2014 at the Supermarket from the Fruit Distributor and Seedlings *Boa Fruta* (Petrolina, PE, Brazil). The cultivation was done in Petrolina (9°46'30"S and 24°21'30"W) and an aliquot of fresh fruit peels (920 g) was submitted to complete drying with air circulation at 45°C. The hydroalcoholic pomegranate crude extract (70% EtOH) was obtained by percolation with the dried material (400 g) at room temperature. After removal of solvent, the extract was lyophilized, yielding 52 g (13%) [14]. As control, it has used the conventional synthetic antifungal, Amphotericin B deoxycholate (C₄₇H₇₃NO₁₇) which was purchased by Sigma[®] (Sigma Aldrich[®] Inc., St. Louis, USA).

Chemical pomegranate profiling

Chromatographic screening by high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detector (HPLC-PDA) was performed to characterize the main compounds present in the 70% EtOH. An aliquot of 10 mg of the crude extract was solubilized in 1 mL of MeOH:H₂O (1:1, v/v), and filtered with PTFE membrane filter (0.45 µm). The analysis was performed using a Phenomenex[®] (Torrance, California, USA) Luna C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm) column and the mobile phase were MeOH + Acid Formic (0.1%) (A) and H₂O + Acid Formic (0.1%) (B). The column was maintained at 40°C and the gradient used was 5-100% of B in A over 60 min. The analytical chromatograms were obtained at 254 nm.

Microrganism and Culture

The *Candida albicans* fungal (ATCC 18804) was kept in a freezer -80°C in the Laboratory of Oral Microbiology and Immunology of the Institute of Science and Technology – UNESP, and cultured in broth Yeast Nitrogen Base (YNB, Sigma Aldrich[®] Inc., St. Louis, USA) supplemented with glucose at the concentration of 100 mM for 24 hours at 37°C. Cell suspension was adjusted to a final concentration of 10⁸ viable cells/mL. The cells number was confirmed by determination of colony forming units per milliliter (CFU/mL) on plates contain Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YEDP, Sigma Aldrich[®] Inc., St. Louis, USA) [33].

Galleria mellonella

In the last larval stage (and/or already pupae), *G. mellonella* was placed in plastic containers with holes in the covers and a filter paper was placed to support egg-laying. The eggs containers were incubated at room temperature. After 20 days, the larvae were separated according to weight and transferred to containers with holes in the covers and food (meal of cornmeal, brewer's yeast, soybean meal, skimmed milk powder, honey, wax and glycerol) [34]. The larvae were maintained at 28°C and stored darkness in Laboratory of Oral Microbiology and Immunology of the Institute of Science and Technology, UNESP, at final larval stage, with a body weight of approximately 250–300 mg. All the larvae used in the experiment had clear color and they were free of spots and/or dark pigments on their cuticle, which could indicate impairment of the animal due to some infectious process and influence the experiment results (Supplementary Material S1). Initially, pomegranate and

5 Resultados e Discussão

Amphotericin B toxicity in *G. mellonella* was evaluated before assessment of its antimicrobial action. Finally, the prophylactic and therapeutic potential of the pomegranate extract against *C. albicans* infection was evaluated. In all steps, *G. mellonella* survival test was performed.

Toxicity of pomegranate (Pg) and Amphotericin B (AmpB) in *Galleria mellonella*

Different concentrations of Pg (1, 0.5, 0.25, 0.10 and 0.05 mg/mL), diluted in phosphate buffered saline (PBS) and dimethyl sulfoxide (DMSO 5%), or different concentrations of AmpB (31.25, 15.65, 7.8 and 3.9 µg/mL), diluted in sterile distilled water, were inoculated into the last right proleg of each larva (n=15/concentration). For control, larvae were inoculated with PBS into the right proleg (n=15). An aliquot of 10 µL of each concentration was inoculated with a Hamilton[®] syringes (Hamilton Inc., USA). Next, the larvae were kept in a Petri dish at 37°C in the darkness, without nutrition (Supplementary Material S2). From 24 hours after the inoculations, the number of dead *G. mellonella* was daily recorded up to 168 hours (i.e., 7 days) for analysis of the survival curve. The larvae were considered dead when they did not show any movement after being touched. After obtaining non-toxic concentrations in *G. mellonella*, they were used for assessment of the antimicrobial action of pomegranate against *C. albicans*.

Antimicrobial activity of pomegranate

Analysis of antimicrobial activity was based on the methodology described by Mylonakis et al. (2005) [27] and Fuchs et al. (2010) [28]. After determination the non-toxic concentrations of Pg and AmpB, larvae were randomly divided into two groups: prophylactic and therapeutic. In the prophylactic group (n=15), larvae were first injected with single dose of Pg (0.10 mg/mL) into the last right proleg; after 24 hours, the larvae were infected with 10 µL of *C. albicans* (Group Pg + Ca) into the last left proleg. In the therapeutic group (n=15), the larvae were infected with 10 µL of *C. albicans* in the last proleg right and, after 1 hour, they were treated with 10 µL of Pg (0.10 mg/mL) in the last left proleg (Group Ca + Pg). As gold standard, larvae were infected with *C. albicans* and treated with AmpB (3.9 µg/mL) 1 hour post infection (Group Ca + AmpB).

As control groups, larvae were pre-treated with PBS and infected with *C. albicans* after 24 hours (Group PBS + Ca) - prophylactic control (n=15); larvae were

5 Resultados e Discussão

infected with *C. albicans* and, 1 hour later, treated with PBS (Group Ca + PBS) - therapeutic control (n=15); and larvae were inoculated with PBS in right and left proleg (Group PBS + PBS) - negative control (n=15). For all treatments, after the last injection, the larvae were kept in a Petri dish at 37°C in the darkness. The number of dead larvae was observed and recorded 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hour pos-infection (i.e., 7 days), for analysis of the survival curve [35].

Pomegranate prophylactic potential against C. albicans infection

By consider that the prophylaxis with single dose resulted in a longer survival time of the larvae (until 120 hours) in relation to the therapy (survival until 72 hours), the pomegranate prophylactic potential was evaluated by the administration of multiple doses prior *C. albicans* infection (see Results/Observations section). Therefore, larvae received 1, 2 or 3 doses (i.e., 24 hours; 48 and 24 hours; or 72, 48 and 24 hours before *C. albicans* infection) of 10 µL of Pg (0.10 mg/mL) into the last right proleg. Afterwards, the larvae were infected with *C. albicans* (10 µL) into the last left proleg. These groups (n=15 per group) were named as following: Pg + Ca (24 h), Pg + Ca (48/24 h) and Pg + Ca (72/48/24 h). As controls (n=15 per group), larvae were inoculated with PBS into the right and left prolegs (Group PBS + PBS) as well as larvae were previously treated with PBS and infected with *C. albicans* after 24 h (Group PBS + Ca). After the last inoculation, the larvae were kept in a Petri dish at 37°C in the darkness. The larvae were submitted to analysis of the survival curve and to the determination of hemocyte density.

Determination of hemocyte density

After the last inoculation of *C. albicans* or PBS, the larvae were kept at 37°C for 3 hours and sequenced in ice-cold Petri dishes (-20°C) for 2 minutes. The larvae were then cut in the cephalocaudal direction with a scalpel blade and squeezed to remove the hemolymph, which was transferred to a microtube and diluted in cold sterile insect physiologic saline (IPS - 150 Mm sodium; 5 mM potassium chloride; 100 Mm Tris-hydrochloride, pH 6.9 with 10 mM EDTA, and 30 mM sodium citrate). Next, the cellular suspension (10^6 cells/mL) was submitted to Tripán Blue solution for counting the hemocytes using a hemocytometer [36]. The results were presented by mean \pm SD. For the quantification of *G. mellonella* hemocyte, 15 larvae per group were used, totalizing 75 larvae.

5 Resultados e Discussão

Statistical analysis

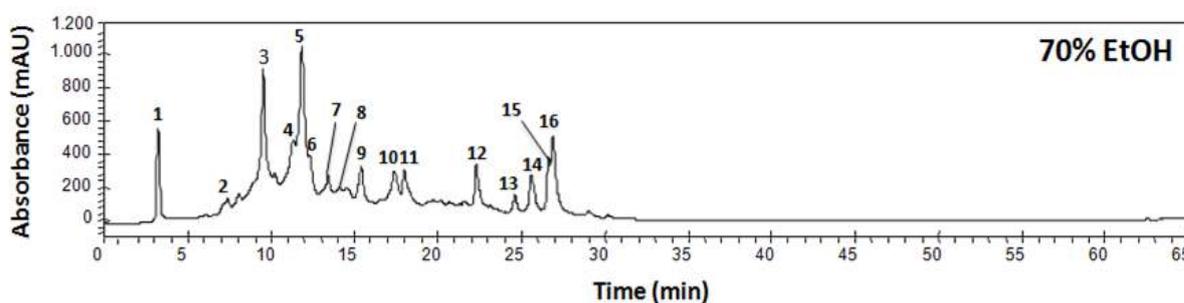
For antimicrobial activity analysis, survival curves of *G. mellonella* were plotted and statistical analysis was performed by using the log-rank test (Mantel-Cox). For determination of hemocyte density was used means \pm SD for the ANOVA One-Way, followed by *post-hoc* Tukey HSD. Both analyzes were made in the *GraphPad Prism*[®] statistical software and the significance level was set up at $p < 0.05$.

Results/Observations

Chemical profiling of pomegranate

The analytical chromatogram analysis (HPLC-PDA) of the crude extract (70% EtOH) revealed 16 compounds by combining the interpretation of retention time (R_t) and UV spectra region (λ_{max}). Peaks, detected from HPLC-PDA chromatography, with absorption in the spectral range of 254 to 380 nm, 260 to 380 nm and 254 to 362 nm in this plant matrix indicate the possible presence of punicalin, ellagic acid and ellagitannin respectively [37, 38] (Table 1 and Figure 1).

Figure 1. Analytical chromatogram of ultraviolet spectra peaks (UV) of pomegranate peels extract (70% EtOH) obtained by high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detector (HPLC-PDA). Solvents MeOH + Formic Ac. (0.1%) (A) and H₂O + Formic Ac. (0.1%) (B). Gradient: 5-100% B in A in 60 min. Phenomenex[®] Luna C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m) HPLC (Jasco[®]). Column Oven: 40°C. Flow: 1 mL min⁻¹. Injection vol.: 15 μ L. $\lambda = 254$ nm. Peaks are numbered according to the compounds listed in Table 1.



5 Resultados e Discussão

Table 1. Compounds identified from pomegranate peels extract (70% EtOH) by high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detector (HPLC-PDA).

Peaks	Assignment	R_t (min)	UV (λ_{max})
1	Punicalin	3.28	254, 380
2	<i>u.c.</i>	7.17	266, 380
3	Derivative ellagitannin	9.26	260, 380
4	<i>u.c.</i>	11.35	254, 380
5	Derivative ellagitannin	12.0	260, 380
6	Valoneic acid dilactone	12.36	254, 374
7	<i>u.c.</i>	14.17	260, 374
8	<i>u.c.</i>	14.33	260, 374
9	<i>u.c.</i>	15.53	278
10	Gallic acid derivative	17.39	272
11	<i>u.c.</i>	18.03	266
12	Ellagic acid derivative	22.29	254, 362
13	Ellagic acid derivative	24.59	254, 362
14	Ellagic acid derivative	25.64	254, 362
15	Ellagic acid derivative	26.65	254, 362
16	Ellagic acid derivative	28.88	254, 368

u.c. corresponds to unidentified compounds.

R_t (min) corresponds to retention time of the compound from its injection to the detection system output in minutes.

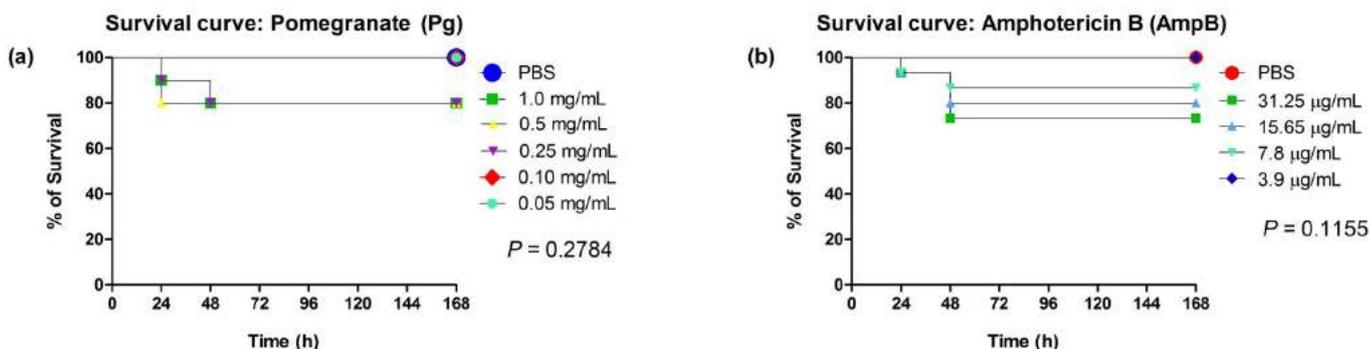
UV (λ_{max}) corresponds to detection of the ultraviolet (UV) spectrum region at the wavelength (nm) maximum.

Toxicity of pomegranate (Pg) and Amphotericin B (AmpB)

No differences were observed in the pomegranate or Amphotericin B toxic evaluation, independently of the concentration ($p=0.2784$ for Pg and $p=0.1155$ for AmpB). Pomegranate at concentrations of 0.10 and 0.05 mg/mL (Figure 2a) and Amphotericin B at concentration of 3.9 μ g/mL (Figure 2b), showed no toxicity to the larvae, indicating survival of 100%, similar to the control group (PBS). Therefore, the highest non-toxic concentrations (0.10 mg/mL for Pg and 3.9 μ g/mL for AmpB) were used in the next protocols.

5 Resultados e Discussão

Figure 2. Toxicity test in *G. mellonella*. Survival curves of larvae were plotted and statistical analysis was performed by using the log-rank test (Mantel-Cox). After infections (0 h), the number of dead *G. mellonella* was daily recorded (24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h) for analysis of the survival curve (n=15 per concentration). For control, larvae were inoculated with PBS into the right proleg (PBS) (n=15). Different concentrations of pomegranate - Pg (1, 0.5, 0.25, 0.10 and 0.05 mg/mL), diluted in PBS and DMSO (5%), were inoculated in the last right proleg of each larva (a). Different concentrations of Amphotericin B – AmpB (31.25, 15.65, 7.8 and 3.9 µg/mL), diluted in sterile distilled water, were inoculated in the last right proleg of each larva (b).



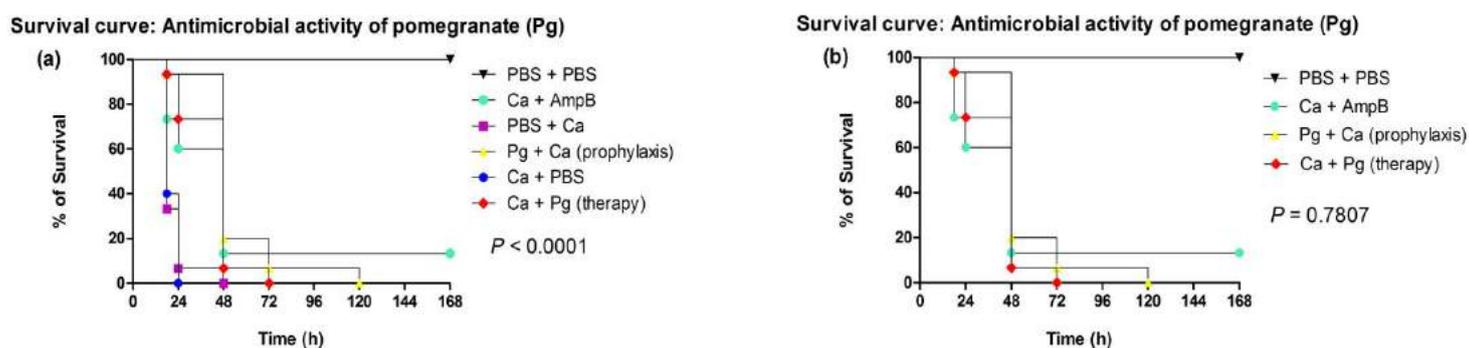
Antimicrobial activity of pomegranate

The values of survival percentage reached to 6.6%, after prophylaxis with single dose (Pg + Ca) and therapy (Ca + Pg) by means of pomegranate. However, the prophylaxis resulted in a longer survival time of the larvae, i.e., until 120 h, compared to the 72 hours (survival median time obtained after therapeutic treatment). The survival median time was at 48 hours for both types of treatment. Also, both presented significant difference ($p < 0.0001$) in relation to the respective controls (infected with *C. albicans* without any treatment), which presented higher values of larval death (93% after 24 h in the PBS + Ca; and 60% after 18 h in the Ca + PBS), reaching survival median time in 18 hours for both groups (Figure 3a).

The infection treatment by *C. albicans* using the non-lethal AmpB concentration (3.9 µg/mL) resulted in the survival of 13.3% of the larvae until the seventh day of infection (168 h), and the survival median time also was in 48 hours. In the PBS + PBS group, there was no death of *G. mellonella*. The prophylaxis (Pg + Ca), therapy (Ca + Pg) and control with AmpB (Ca + AmpB) did not present significant difference between them ($p = 0.7807$) (Figure 3b).

5 Resultados e Discussão

Figure 3. Antimicrobial activity of pomegranate (Pg) in *G. mellonella*. After injections (0 h), the number of dead *G. mellonella* was daily recorded (24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h) for analysis of the survival curve (n=15 per group). Survival curves of *G. mellonella* were plotted and statistical analysis was performed by using the log-rank test (Mantel-Cox). As controls, larvae were inoculated with PBS in right and left proleg (PBS + PBS), as well as larvae were infected with *C. albicans* and treated with AmpB 1 h post infection (Ca + AmpB). For prophylaxis with single dose, larvae were pre-treated with Pg (Pg + Ca) or PBS (PBS + Ca - control) and, after 24 h, they were infected with *C. albicans*. For therapy, larvae were infected with *C. albicans* and, after 1 h, they were treated with Pg (Ca + Pg) or (Ca + PBS - control) (a). Comparison of survival percentage of *G. mellonella* considering all groups or between PBS + PBS, Ca + AmpB, Pg + Ca, and Ca + Pg groups (b).



Prophylactic potential of pomegranate against *C. albicans* infection

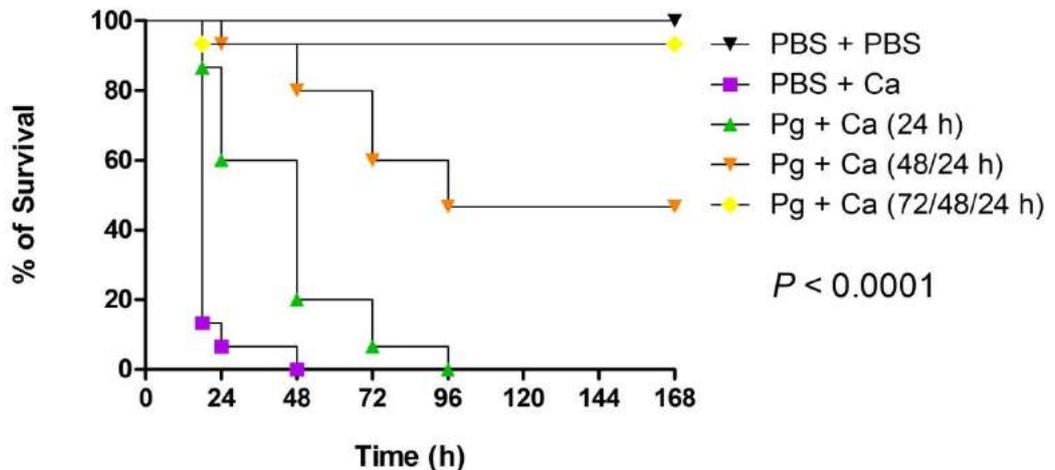
Considering the results above-mentioned, it was evaluated prophylactic potential of pomegranate after administration of multiple doses (0.10 mg/mL) prior to *C. albicans* infection [Pg + Ca (24/48/72 h)], in *G. mellonella*. This prophylaxis based on three doses resulted in a higher percentage of survival (93.3%) until the last experimental day (i.e., 168 hours), than the other treated groups. This percentage differed significantly ($p < 0.0001$) from the survival percentage of infected and untreated larvae (PBS + Ca), and it was similar to that observed in the control group (PBS + PBS), which no death of *G. mellonella* was observed.

The survival percentage of larvae reached 46.6% until the 168 hours, with survival median time in 96 hours, after prophylaxis with two doses [Pg + Ca (48/24 hours)]. After a prophylaxis with single dose [Pg + Ca (24 hours)], 6.6% of the larvae survived after 72 hours, and the survival median time was at 48 hours. The non-treated group (PBS + Ca) showed 93% of the dead larvae after 24 hours post-infection, with survival median time also at 18 hours (Figure 4).

5 Resultados e Discussão

Figure 4. Prophylactic potential of multiple doses of pomegranate against *C. albicans* infection in *G. mellonella*. Survival curves of *G. mellonella* were plotted and statistical analysis was performed by using the log-rank test (Mantel-Cox). After injections (0 h), the number of dead *G. mellonella* was daily recorded (24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h) for analysis of the survival curve (n=15 per group). Larvae received 1, 2 or 3 doses of pomegranate (i.e., 24 h; 48 and 24h; or 72, 48 and 24 h), before *C. albicans* infection ([Pg + Ca (24h)], [Pg + Ca (48/24 h)] or [Pg + Ca (72/48/24 h)]). As controls, larvae were inoculated with PBS (PBS + PBS), and larvae were previously treated with PBS and infected with *C. albicans* after 24 h (PBS + Ca).

Survival curve: Pomegranate prophylactic potential (Pg)

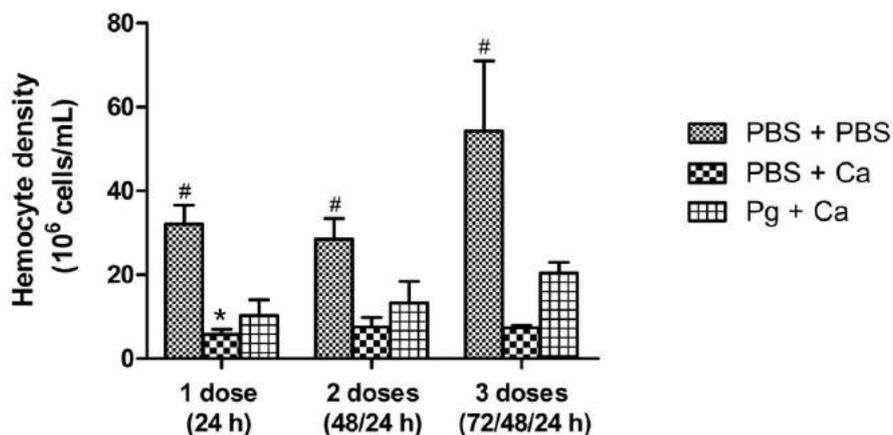


Determination of hemocyte density

Finally, after the efficacy demonstrated in relation prophylactic administration of pomegranate, it was measured the hemocytes number of *C. albicans*-infected larvae previously treated or not with multiple doses of extract. The hemocyte density assay allows a quantitatively evaluation of immune response of larvae elicited after this treatment [36]. As expected, the control group (PBS + PBS) presented the highest values of hemocyte quantification, regardless of the number of doses of PBS administered. The infected, but non-treated, group (PBS + Ca), in turn, showed the lowest values ($p < 0.001$) in relation to matched control. Only the prophylaxis with single dose of *P. granatum* extract [Pg + Ca (24 hours)] resulted in significantly higher values of hemocyte density, compared to the infected group (PBS + Ca). Although, there was no statistical difference between the prophylaxis with multiple doses and the infected group, the values of hemocyte density were higher when the larvae were treated, especially 72 hours before (Figure 5).

5 Resultados e Discussão

Figure 5. Determination of hemocyte density in *G. mellonella* larvae, after prophylaxis with single dose [Pg + Ca (24h)] or multiple doses [Pg + Ca (48/24 h) or Pg + Ca (72/48/24 h)] of pomegranate. As controls, larvae were only inoculated with PBS (PBS + PBS), and larvae were previously treated with PBS and infected with *C. albicans* after 24 h (PBS + Ca). Statistical comparisons were separately performed for each time/doses. (#) $p < 0.001$ vs PBS + Ca or Pg + Ca; (*) $p < 0.001$ vs Pg + Ca. ANOVA One-Way, followed by *post-hoc* Tukey HSD.



Discussion

It is known that *Candida* species are the most common fungal causes of deep-seated and disseminated infections in immunocompromised human hosts, and are associated with high morbidity and mortality in this population [43, 44]. Therefore, there are an increasing number of researchers seeking new alternatives therapies due to the high number of infections whose agents are resistant to conventional treatments as well as the emergence of new pathogenic strains.

One of the safe and economical alternatives studied is the use of medicinal plants which have shown some antimicrobial activity [45]. According to Veiga Jr. et al. 2015 [46], the World Health Organization (WHO) defines medicinal plant as any plant possessing substances which may be used for treatment purposes or used in the production of semisynthetic drugs. Pomegranate (*Punica granatum* Linné) fruit (seeds, peel, and juice) seem to have medicinal benefits, such as strong antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, antiobesity, and antitumoral properties [47]. The study of its bioactive components has aimed at the development of herbal products with therapeutic applications [14]. Many beneficial properties are related to the presence of ellagic acid, ellagitannins (including punicalagins), punicic acid and other fatty acids, flavonoids, anthocyanidins, anthocyanins, estrogenic flavonols, and

5 Resultados e Discussão

flavones, which seem to be the main therapeutically beneficial components of pomegranate. However, the synergistic action of the crude extract constituents appears to be superior when compared to individual constituents of pomegranate [47, 48].

In the present study, the prophylaxis with single dose as well as the therapy resulted in higher time survival of *G. mellonella* than non-treated larvae, which died 24 hours post-infection by *C. albicans*. From these results it was possible to suggest the anti-*Candida* activity of pomegranate, both prophylactic and therapeutic. Moreover, the survival percentage post-treatment with the herbal extract was similar to that obtained after treatment with Amphotericin B. Therefore, in this experimental model *in vivo*, pomegranate was as effective as a broad-spectrum antifungal widely used for the treatment of *Candida* infections.

In fact, when we performed the chromatographic screening of extract, the main compounds identified were ellagic acid derivatives and ellagitannins, such as punicalin. Recently, it has been found that punicalagin, pedunculagin, telimagrandin and galagildilacton have important antimicrobial action against *C. albicans* yeast cellular structure [11, 17]. Thus, the main compound involved in anti-*Candida* action present of the *P. granatum* fruit peels seems to be the punicalagin [16, 17, 38].

Although the survival percentage of *G. mellonella* after prophylaxis was similar to that obtained after the therapy using the extract, our results showed that prophylaxis, with single dose, increased the time of survival the larvae in relation to the therapy. Interestingly and innovative way, the prophylactic administration of 3 doses resulted in a higher survival percentage of the larvae when compared to single dose prophylaxis. The survival percentage was proportional to number of doses previously injected, that is, the more doses of pomegranate administered, the more larvae survived after infection. In fact, our results indicate that the sequential administration of multiple doses prior to *C. albicans* infection amplified benefic potential of this extract.

Once the efficacy of pomegranate prophylactic administration was demonstrated, changes in the hemocyte density during infection or treatment were used as a parameter of the response of the larvae [49]. It is noteworthy that the *G. mellonella* model used here is useful for as certaining immunopathological aspects because the larvae are able to activate cellular and humoral immune responses against microorganisms by means of their circulating hemocytes [50, 51]. Then, this

5 Resultados e Discussão

experimental model becomes an increasingly popular choice for the investigation of the fungal pathogenesis, as in *C. albicans* infection. In this context, *G. mellonella* has been successfully employed in studies on alternative antifungal therapies [24, 27, 52].

In this work, it was observed a significant reduction in the number of hemocytes in larvae 24 post-infection with *C. albicans* compared with larvae non-stimulated that showed the higher values of hemocyte density. Corroborating our findings, Dos Santos et al. (2017) [36] observed that *Porphyromonas gingivalis* suppressed hemocyte density in *G. mellonella*.

Possibly, the larvae death is related to the extensive fungal proliferation and alteration of *C. albicans* morphology from yeast to hyphae or pseudo-hyphae during the infection installation process. The pseudo-hyphae, in turn, can lead to death of the hemocytes through mechanisms of evasion of the immune system, and can reduce the efficacy of the phagocytic capacity of these cells against *C. albicans* [53, 54]. Moreover, it has been shown that larvae infected by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aspergillus fumigatus* and *Bacillus thuringiensis* present a reduction of the hemocystic population in general, increase in the number of granular hemocytes, and proteomic alterations indicative of cellular stress, tissue damage and sequestration of major proteins related to the formation of immune complexes [23, 55-57].

The results of present study indicate that these deleterious effects to immune system of larvae caused by infection by *C. albicans* were attenuated by the prophylactic administration of pomegranate, which avoided the striking decrease of hemocyte density elicited by fungus. These data may suggest that the antimicrobial capacity of the extract, as observed here, resulted in the reduction of the fungal load in the hemolymph. Additionally, pomegranate must have contributed to the strengthening of larvae immune response that involves non-specific immune reactions (production of antimicrobial peptides, melanization) or specific (regulation the production of antimicrobial peptides and activation of phagocytic cells) [51]. In this sense, pomegranate had an immunomodulatory effect, consequently protecting larvae against *C. albicans*, as previously showed by De Oliveira et al. (2017) [57], Dos Santos et al. (2017) [36] and Rossoni et al. (2017) [58]. In the present work, the protective effect of extract related to number of hemocytes is in accordance with

5 Resultados e Discussão

those data from survival curve. Then, pomegranate seems to present a protective role against *C. albicans* infection in *G. mellonella* larvae.

Regarding the experimental model used in the present study, insects are considered as convenient models for studying microbial infections and host resistance against microorganisms, although pathogens are capable of acting on the host epigenetic machinery and influence the evolution of resistance/tolerance to infection by the host. An increasing number of works from different fields have turned to study of insects, fish and worms by the advantages offered by these models as ethical acceptability, for being relatively simple and inexpensive and for modeling a variety of human infectious diseases. Because of this, the insects may be used to discovery of new treatment strategies, such as using of herbal medicines. In addition, these insect models give results comparable to those obtained using mammals, since the insects have an immune system analogous to the innate response of mammals [23, 41, 59, 60].

However, insect species differ in their susceptibility to fungal infections, which possibly results in the adaptation, by the natural selection process, of their immune defenses to local conditions. These differences may be linked to a wide range of factors including the presence of symbiotic organisms, melanism and genetic variation. For example, the darkened cuticle of melanic insects, such as *G. mellonella*, has been related to protection against pathogenic fungi [42, 61-64]. Therefore, further studies should be performed in order to authenticate and identify the mechanisms involved in benefic action of pomegranate.

Taking into account the incidence of invasive fungal infections caused by *Candida* spp., to date *C. albicans* remains the most frequently isolated *Candida* species in the clinical setting and is the principal agent of nosocomial yeast infections [1, 2]. Thus, the resistance of these pathogens to conventional synthetic treatments and the side effects strongly related to frequent use strengthens the search for new therapeutic alternatives with antimicrobial potential, such as the use of medicinal plants. In future, plants with antimicrobial potential, which have not yet been reported for microbial resistance and important adverse effects, such as pomegranate, may be potential agents for a synergistic action with conventional antifungal for the treatment of candidiasis.

Conclusion

The *G. mellonella* species with systemic candidiasis treated prophylactically or therapeutically with pomegranate survived for longer than infected and untreated larvae. However, when administration occurred through multiple prophylactic doses, more larvae survived the infection and for a longer time; in addition, these larvae showed a higher density of hemocytes in their hemolymph compared to untreated larvae. These data suggest that pomegranate presents antifungal and immunomodulatory activity against systemic candidiasis in *G. mellonella* model, principally after prophylaxis with multiple doses.

Acknowledgements

The authors thank Giane Carminato for their English Language Review Services. This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - finance code 001, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) – finance code 307232/2015-8 and State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant [n°. 2015/03965-2].

Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 327–335.
2. Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One* 2012; 7:e36952.

3. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; 8: 19–37.
4. Lionakis MS, Netea MG. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003079.
5. Barchiesi F, Orsetti E, Osimani P, Catassi C, Santelli F, Manso E. Factors related to outcome of bloodstream infections due to *Candida parapsilosis* complex. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 387.
6. Swinne D, Wائلة M, Nolard N. *In vitro* activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non-*Candida albicans* yeast isolates. *Rev Iberoamericana Micol* 2005;22:24–28.
7. Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Rózalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol* 2011; 60: 35–41.
8. Harris R. Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int J Aromather* 2002; 12: 83–91.
9. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 141-8.
10. Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinsteen N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. *Clin Oral Investig* 2007; 11: 143-7.
11. Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling* 2013; 29: 929-37.
12. Labsi M, Khelifi L, Mezioug D, Soufli I, Touil-Boukoffa C. Antihydatic and immunomodulatory effects of *Punica granatum* peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis. *Asian Pac J Trop Med* 2016; 9: 211-20.
13. Naqvi SAH, Khan MSY, Vohora SB. Antibacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medical plants. *Rev Fitoterapia* 1991; 62: 221–28.
14. Almeida NLM, Saldanha LL, da Silva RA, Pinke KH, da Costa EF, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. Antimicrobial activity of denture adhesive associated with *Equisetum giganteum*- and *Punica granatum*-enriched

- fractions against *Candida albicans* biofilms on acrylic resin surfaces. *Biofouling* 2018; 34: 62-73.
15. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev* 2008; 13: 128-44.
 16. Endo EH, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol* 2010; 161: 534-4.
 17. Anibal PC, Peixoto IT, Foglio MA, Hoflihg JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Braz J Microbiol* 2013; 44: 839-48.
 18. Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MC, Pereira Mdo S, Higino JS, Peixoto MH. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J* 2006; 17: 223-7.
 19. Gracious Ross R, Selvasubramanian S, Jayasundar S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits--a preliminary study. *J Ethnopharmacol* 2001; 78: 85-7.
 20. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol* 1999; 66: 11-7.
 21. Miranda TT, Vianna CR, Rodrigues L, Monteiro AS, Rosa CA, Corrêa A Jr. Diversity and frequency of yeasts from the dorsum of the tongue and necrotic root canals associated with primary apical periodontitis. *Int Endod J* 2009; 42: 839-44.
 22. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 321-6.
 23. Fallon JP, Reeves EP, Kavanagh K. The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of hemocytes. *Microbiology* 2011; 157: 1481–8.

24. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect* 2010; 12: 488–96.
25. Kelly J, Kavanagh K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a nonspecific antimicrobial response. *J Med Microb* 2011; 60: 189–96.
26. Desbois AP, Coote PJ. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. *Adv Appl Microbiol* 2012; 78: 25–53.
27. Mylonakis E, Morena R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 2005; 73: 3842–50.
28. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 2010; 1: 475-82.
29. Lionakis MS. Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2011; 2: 521-7.
30. Ligeza-Zuber M. Mechanisms of *Galleria mellonella* cellular immune response after infection with entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* *Ann Parasitol* 2012; 58: 227-8.
31. Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1378-83
32. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28: 101–12.
33. de Campos Rasteiro VM, da Costa AC, Araújo CF, de Barros PP, Rossoni RD, Anbinder AL, Jorge AO, Junqueira JC. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 489.
34. Jorjão AL, Oliveira, LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, Junqueira JC. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria*

- mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence* 2018; 9(1): 383–389.
35. Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC, Anbinder AL, Jorge AO, Junqueira JC. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence* 2015; 6: 29-39.
36. Dos Santos JD, de Alvarenga JA, Rossoni RD, García MT, Moraes RM, Anbinder AL, Cardoso Jorge AO, Junqueira JC. Immunomodulatory effect of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog* 2017; 110: 507-511.
37. Sticher O. Natural product isolation. *Natural Product Reports* 2008; 25: 517-554.
38. García-Villalba R, Espín JC, Aaby K, Alasalvar C, Heinonen M, Jacobs G, Voorspoels S, Koivumäki T, Kroon PA, Pelvan E, Saha S, Tomás-Barberán FA. Validated Method for the Characterization and Quantification of Extractable and Nonextractable Ellagitannins after Acid Hydrolysis in Pomegranate Fruits, Juices, and Extracts. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 6555-66.
39. Laland K, Uller T, Feldman M, Sterelny K, Muller GB, Moczek A, Jablonka E, Odling-Smee J, Wray GA, Hoekstra HE, et al. Does evolutionary theory need a rethink? *Nature* 2014; 514(7521): 161-4.
40. Mukherjee K, Grizanov E, Chertkova E, Lehmann R, Dubovskiy I, Vilcinskas A. Experimental evolution of resistance against *Bacillus thuringiensis* in the insect model host *Galleria mellonella* results in epigenetic modifications. *Virulence* 2017; 8(8): 1618–1630.
41. Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: Recent studies and new perspectives. *Virulence* 2012; 3(6): 474–476.
42. Dubovskiy IM, Whitten MM, Yaroslavtseva ON, Greig C, Kryukov VY, Grizanov EV, Mukherjee K, Vilcinskas A, Glupov VV, Butt TM. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? *PLoS One* 2014; 8(4): e60248.
43. Rossoni RD, Dos Santos Velloso M, Figueiredo LMA, Martins CP, Jorge AOC, Junqueira JC. Clinical strains of *Lactobacillus* reduce the filamentation

5 Resultados e Discussão

- of *Candida albicans* and protect *Galleria mellonella* against experimental candidiasis. *Folia Microbiol (Praha)* 2018; 63(3): 307-314.
44. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4: 119–28.
45. Gomes LAP, Figueiredo LMA, Palma ALR, Geraldo BMC, Castro KCI, Fugisaki LRO, Jorge AOC, de Oliveira LD, and Junqueira JC. *Punica granatum* L. (Pomegranate) Extract: *In Vivo* Study of Antimicrobial Activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* Model. *Sci World J* 2016: e8626987.
46. Veiga VF, Pinto AC, Maciel MAM. Medicinal plants: safe cure? *Quím Nova* 2005; 28: 519–528.
47. Hontecillas MVR, Lu P, Bassaganya-Riera J. Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents Evid Based Complement Alternat Med 2013: e789764.
48. Rahimi HR, Arastoo M, Ostad SN. A Comprehensive Review of *Punica granatum* (Pomegranate) Properties in Toxicological, Pharmacological, Cellular and Molecular Biology Researches. *Iran J Pharm Res* 2012; 11: 385–400.
49. Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence* 2012; 3: 497–503.
50. Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Sci* 2008; 15: 1–14.
51. Hoffmann JA, Kafatos FC, Jr., Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313–8.
52. Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence* 2012; 3: 474-6.
53. Marcos CM, de Oliveira HC, de Melo WCMA, da Silva JF, Assato PA, Scorzoni L, Rossi SA, Silva ACAP, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM. Anti-Immune Strategies of Pathogenic Fungi. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 142.
54. Sheehan G, Kavanagh K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence* 2018; 9: 163-172.

55. Arteaga Blanco LA, Crispim JS, Fernandes KM, de Oliveira LL, Pereira MF, Bazzolli DMS, Martins GF. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cell Tissue Res 2017; 370: 153-168.
56. Dubovskiy IM, Grizanova EV, Whitten MM, Mukherjee K, Greig C, Alikina T, Kabilov M, Vilcinskis A, Glupov VV, Butt TM. Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis*. Virulence 2016; 7: 860-870.
57. de Oliveira FE, Rossoni RD, de Barros PP, Begnini BE, Junqueira JC, Jorge AOC, Leão MVP, de Oliveira LD. Immunomodulatory effects and anti-*Candida* activity of lactobacilli in macrophages and in invertebrate model of *Galleria mellonella*. Microb Pathog 2017; 110:603-611.
58. Rossoni RD, Fuchs BB, Barros PP, Velloso MS, Jorge AOC, Junqueira JC, Mylonakis E. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. PLoS One 2017; 12: e0173332.
59. Fallon J, Kelly J, Kavanagh K. *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. Methods Mol Biol 2012; 845: 469-85.
60. Bierne H, Nielsen-LeRoux C. Is there a transgenerational inheritance of host resistance against pathogens? Lessons from the *Galleria mellonella*-*Bacillus thuringiensis* interaction model. Virulence 2017; 8(8): 1471-1474.
61. Gruner DS, Kolekar A, McLaughlin JP, Strong DR. Host resistance reverses the outcome of competition between microparasites. Ecology 2009; 90(7): 1721-8.
62. Maurer E, Hörtnagl C, Lackner M, Grässle D, Naschberger V, Moser P, Segal E, Semis M, Lass-Flörl C, Binder U. *Galleria mellonella* as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. Med Mycol 2018 Jun 19. doi: 10.1093/mmy/myy042. [Epub ahead of print]
63. Kraaijeveld AR, Godfray HCJ. Selection for resistance to a fungal pathogen in *Drosophila melanogaster*. Heredity 2008; 100: 400–406.

64. Trienens M, Rohlf M. Experimental evolution of defense against a competitive mold confers reduced sensitivity to fungal toxins but no increased resistance in *Drosophila* larvae. BMC Evolutionary Biology 2011; 11: 206.

CAPÍTULO 2: MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* DE CANDIDOSE LOCALIZADA

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Campus* de Bauru, sob a co-orientação do Prof. Dr. James Venturini; e na Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (FOB/USP), no Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Radiologia e Patologia, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara.

Neste capítulo será abordado o modelo experimental *in vivo* localizado de candidose. Os resultados deste trabalho serão adaptados para posterior publicação.

Avaliação da atividade antimicrobiana e imunomoduladora de *Punica granatum* Linné em modelo experimental murino de candidose oral

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano e imunomodulatório do extrato hidroalcoólico das cascas de *Punica granatum* Linné (**Pg**) no tratamento de camundongos BALB/c infectados por *Candida albicans* (**Ca**) e, posteriormente, verificar a presença de efeitos deletérios após a administração diária de Pg e fluconazol em animais saudáveis (toxicidade). Anteriormente, o perfil fitoquímico (UHPLC-qTOF-MS/MS) e a CIM do extrato de Pg e fluconazol foram avaliados *in vitro*. Na sequência, para avaliar a toxicidade, animais saudáveis (n=15/grupo) receberam 100 µL/dia do extrato a 150 ou 300 mg/Kg (**Pg150** e **Pg 300**), ou fluconazol (**FLU**) a 100 mg/Kg, por gavagem durante 7 dias. Como controle, água filtrada foi administrada (**CTRL**). O *screening* hipocrático dos animais (consumo de água, consumo de ração, defecação e reações aos estímulos induzidos) bem como o peso corporal dos animais foram mensurados diariamente. Após a eutanásia, baço, fígado e rins foram pesados e analisados microscopicamente; e

5 Resultados e Discussão

marcadores bioquímicos séricos foram quantificados. Para o ensaio antimicrobiano, camundongos imunossuprimidos (**IMS**) foram infectados por Ca em toda a cavidade oral e, após 7 dias, receberam 7 doses diárias de Pg (**IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**) ou fluconazol (**IMS/Ca+FLU**) ou água filtrada (**IMS/Ca+7d**). Para controle, foram utilizados animais saudáveis (**CTRL**) ou animais apenas infectados e eutanasiados após 7 dias de infecção (**IMS/Ca**) (n=15/grupo). O peso corporal de todos os animais foi mensurado diariamente. Após eutanásia, a língua foi avaliada macroscópica, microbiológica e microscopicamente (escore clínico de placas brancas, quantificação de UFC/g, de leveduras/hifas, e de infiltrado inflamatório intra e subepitelial). Além disso, o homogenato dos linfonodos cervicais e da língua foram submetidos a análise de citocinas e quimiocinas pela técnica Milliplex® (n=10/grupo). Os testes estatísticos foram aplicados de acordo com a presença ou não de normalidade em todas as avaliações, considerando significativamente diferente quando $p < 0.05$. Como principal composto bioativo, punicalagina foi identificada em Pg e a CIM foi mensurada em 18,75 mg/mL. Quanto a toxicidade, animais do grupo **FLU** apresentaram redução do peso corporal (-5,14%), alimentaram-se menos, não responderam ao toque e ao aperto da cauda, e apresentaram piloereção, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, bem como aumento de TGP e triglicérides, diferentemente dos grupos Pg. Quanto a análise antimicrobiana e imunomodulatória, animais infectados e tratados com **Pg** e **FLU** restabeleceram parcialmente seu peso. A placa micelial formada na superfície da língua foi atenuada pós-tratamento com **Pg** ou **FLU**, acarretando na redução do número de UFC/g ($p < 0,001$); conseqüentemente, os escores microscópicos foram mais baixos ($p < 0,05$) na língua dos animais tratados do que nos animais controle (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**). Adicionalmente, o tratamento com **Pg** demonstrou ser hepatoprotetor e, possivelmente, anti-inflamatório, pelo aumento de IL-10 e TGF- β 1, principalmente na língua, em relação aos controles. Assim, o extrato de *P. granatum* teve ação antimicrobiana e imunomodulatória no tratamento da candidose oral experimental, desempenhando papel hepatoprotetor e não-tóxico, diferente do fluconazol.

Palavras-chave*: Romã (Fruta). Fluconazol. Candidíase Bucal. Experimentação Animal.

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), disponíveis no domínio <http://decs.bvr.br/>

1 INTRODUÇÃO

A relação simbiótica existente entre os seres humanos e a microbiota da cavidade bucal e do trato gastrointestinal, é de suma importância para a manutenção da homeostase. No entanto, uma vez que este equilíbrio é interrompido por meio da presença de fatores de risco predisponentes, como o imunocomprometimento, bem como alterações no pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura e exposição contínua a fármacos antimicrobianos, os microrganismos comensais preexistentes tornam-se patógenos oportunistas (CONTI *et al.*, 2009; VILA *et al.*, 2020).

A cavidade oral abriga uma gama de microrganismos comensais que podem causar vários graus de infecção oral em indivíduos que apresentam fatores de risco como: o uso de próteses totais, a utilização de antibióticos de amplo espectro, soropositividade para HIV, transplantados, diabéticos e aqueles que fazem uso de imunossupressores com frequência. Várias espécies de *Candida* clinicamente importantes, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, fazem parte da microbiota bucal e estes fatores de risco, principalmente o imunocomprometimento, facilitam sua proliferação e, conseqüentemente, o desenvolvimento de patologias locais ou sistêmicas. Dentre essas espécies, *C. albicans* tem sido relatada como a causa mais comum de candidose oral (HELLSTEIN; MAREK, 2019; KNOKE; BERNHARDT, 2006; CALDERONE, 2002; CONTI *et al.*, 2009). A capacidade de se alternar reversivelmente entre levedura e hifa/pseudo-hifa é considerada um dos fatores de virulência mais importantes deste fungo. Esta transição pleomórfica desempenha importante papel na patogênese da doença, estando associada à invasão e à destruição teciduais (SARDI *et al.*, 2013). Embora a candidose disseminada, a partir de uma manifestação localizada, seja pouco frequente, ela possui considerável taxa de mortalidade de 47% (MILSOP; FAZE, 2016; SINGH *et al.*, 2014).

Em condições imunológicas normais, o organismo é capaz de controlar a proliferação dos fungos *Candida* bem como de outros comensais presentes na microbiota bucal (CALDERONE; FONZI, 2001) entretanto condições imunossupressoras tendem a predispor a incidência da manifestação clínica por

5 Resultados e Discussão

meio da proliferação fúngica exacerbada (SINGH *et al.*, 2014). A cronicidade da candidose ocorre devido à incapacidade do hospedeiro imunologicamente debilitado de eliminar ou minimizar a colonização e disseminação do microrganismo ou pela resistência inerente de *C. albicans* aos medicamentos antifúngicos (CALDERONE; FONZI, 2001).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra *C. albicans* envolvem tanto a imunidade inata quanto a adquirida. Os neutrófilos, granulócitos produzidos na medula óssea, são rapidamente recrutados do sangue periférico para os sítios de infecção, por isso considerados fundamentais na proteção contra infecções fúngicas. Seu papel em infecções por *Candida* é evidente, visto que a neutropenia possui íntima relação com o estabelecimento de candidose sistêmica, com graves prejuízos ao hospedeiro imunossuprimido (PELTROCHE-LLACSAHUANGA *et al.*, 2003; SHOHAM; LEVITZ, 2005). Os neutrófilos também estão envolvidos diretamente com a defesa contra infecções localizadas causadas por *Candida* (KULLBERG *et al.*, 1999; KOH *et al.*, 2008; SAUNUS *et al.*, 2008; SCHALLER *et al.*, 2004).

A presença de neutrófilos na cavidade oral está envolvida diretamente com a proteção contra infecções. A infiltração de neutrófilos é a característica marcante de lesões orais por *C. albicans*, e a sua ausência é relacionada ao agravamento da candidose oral (FARAH *et al.*, 2001). Entre as ações antifúngicas dos neutrófilos está a capacidade de matar as pseudo-hifas e hifas, que são as formas invasivas de *C. albicans*, através de mecanismos oxidativos e não oxidativos, além de matar blastoconídios intracelularmente, dentro de seus fagolisossomos (URBAN; LOURIDO; ZYCHLINSKY, 2006a; URBAN *et al.*, 2006b). A habilidade para *C. albicans* se estabelecer e se desenvolver envolve neutropenia e depressão da imunidade celular adaptativa do hospedeiro, além de persistência no tecido infectado. Estes fatos apontam para a importância tanto da imunidade adaptativa quanto da imunidade inata no controle das infecções por *C. albicans* (ROMANI, 2004).

Os linfócitos também desempenham um papel relevante na candidose oral em comparação com as outras formas de candidose. A linhagem Th17, distinta das populações Th1 e Th2 clássicas, proveniente da célula efetora TCD4+, secretam IL-17 (IL-17A), IL-17F, IL-21 e IL-22 e são induzidas a se diferenciarem por uma combinação de citocinas como TGF- β (1, 2 e 3), IL-6, IL-1 β , e IL-21, enquanto que as células Th1 se desenvolvem em resposta a IL-12 (uma citocina heterodimérica

5 Resultados e Discussão

composta de duas subunidades a IL-12p35 e IL-12p40) (GHILARD; OUYANG, 2007). A citocina IL-23, da família da IL-12, é composta pelas subunidades IL-12p40 e IL-23p19, sendo essencial para a expansão e a função das células Th17. Apesar de compartilharem da mesma família, IL-12 e IL-23 têm funções dicotômicas em modelos experimentais *in vivo* de candidose oral (TRINCHIERI *et al.*, 2003; GHILARD; OUYANG, 2007). Desse modo, a imunidade tardia do hospedeiro frente a candidose oral parece ser dominada principalmente pela sinalização da IL-17 (CONTI *et al.*, 2009).

Assim, o reconhecimento de que *C. albicans* é um importante agente patogênico, especialmente em pacientes imunocomprometidos, tem levado ao desenvolvimento de modelos experimentais *in vivo* como uma ferramenta para o estudo do desenvolvimento e progressão desta patologia, bem como de possíveis estratégias terapêuticas (NINOMIYA *et al.*, 2012; HAYAMA *et al.*, 2012). Mas alguns modelos, utilizando ratos ou coelhos, ainda são limitados pela falta de sinais locais característicos da candidose oral, pela dificuldade de manuseio, pelas repetidas aplicações do fungo e pela relação custo/benefício (LOPEZ-MARTINEZ, 2010).

Em contrapartida, no modelo experimental murino desenvolvido por Takakura *et al.* (2003), o inóculo de *C. albicans* é aplicado apenas uma vez, facilitando o manuseio e, conseqüentemente, o número de experimentos realizados. Além disso, este modelo permite de maneira simples, fácil e barata, avaliar os efeitos de novas opções terapêuticas, demonstrando ser um dos modelos mais viáveis, eficazes e reprodutíveis (TAKAKURA *et al.*, 2003; NINOMIYA *et al.*, 2012; HAYAMA *et al.*, 2012).

Neste modelo, para o sucesso da infecção por *C. albicans*, é preciso imunossuprimir os animais um dia antes da infecção e três dias pós-infecção com prednisolona, um glicocorticóide cujo papel anti-inflamatório é devido a sua capacidade de suprimir ou inibir a presença de fatores de transcrição como NF-κB (SANCHES *et al.*, 2019). O uso da prednisolona associado ao aumento da carga fúngica foi descrito recentemente em modelo murino de candidose gastrointestinal, uma vez que este glicocorticóide suprime a secreção de IL-17A e IFN-γ, citocinas-chave na defesa do hospedeiro contra a infecção por *Candida* na cavidade oral (KOBAYASHI-SAKAMOTO *et al.*, 2018). Associado a estes fatores, a autenticação da candidose oral, no modelo experimental murino desenvolvido por Takakura *et al.*

5 Resultados e Discussão

(2003), dá-se pela presença de placas miceliais brancas (pseudomembranas) no dorso da língua dos camundongos (TAKAKURA *et al.*, 2003).

As manifestações clínicas da candidose oral, em humanos, incluem as formas eritematosa (atrófica), hipertrófica ou pseudomembranosa (GARCIA-CUESTA *et al.*, 2014; SCULLY; GIOVANNI, 2019) A candidose pseudomembranosa pode ser classificada como aguda ou crônica, e clinicamente apresenta-se como placas brancas ou amareladas na superfície das mucosas, incluindo o dorso da língua, facilmente removidas (VILA *et al.*, 2020) . Embora não seja uma doença letal, a candidose oral deve ser tratada a partir da visualização das manifestações clínicas, impedindo a invasão de hifas ou pseudo-hifas nos tecidos subjacentes. O tratamento da candidose oral pode ser tópico ou intragástrico, e geralmente envolve medicamentos antifúngicos da classe dos azóis, como fluconazol e cetoconazol, que atuam na biossíntese do ergosterol por meio da inibição da enzima 14- α -desmetilase do citocromo P-450 que é responsável pela demetilação do lanosterol (VANDEN BOSSCHE, 1997; MAERTENS, 2004). Embora sejam eficazes no combate ao fungo, esses fármacos apresentam desvantagens significativas, como desconforto gastrointestinal, incluindo náuseas, vômitos e diarreia, bem como efeitos colaterais hepáticos e nefrológicos, taxa de recorrência relativamente alta e resistência subsequente a *Candida* spp., tornando a aplicação clínica destes medicamentos limitada (NENOFF *et al.*, 1999). Sendo assim, a exploração e o estudo mais aprofundado de novas estratégias, isentas de efeitos adversos, para a prevenção ou tratamento da candidose oral tornam-se de extrema relevância clínica.

O uso de plantas para fins terapêuticos é uma prática popular apoiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1946). Neste contexto, a utilização de plantas medicinais tão eficazes quanto os medicamentos sintéticos e que causem menos efeitos colaterais deve ser estudada como uma alternativa no combate à candidose oral. *Punica granatum* Linné (*P. granatum*), comumente conhecida como romã, é nativa da Ásia pertencente à família Punicaceae (QNAIS *et al.*, 2007). Diferentes partes desta planta, como sementes, suco, folhas e cascas, têm grande relevância medicinal e são utilizadas em vários países como fonte de agentes terapêuticos contra uma variedade de agentes patogênicos (ARUN; SINGH, 2012). Os constituintes da romã incluem taninos altamente hidrolisáveis (punicalinas e punicalaginas), ácido elágico (um componente dos elagitaninos) e ácido gálico (um componente dos galotaninos) (REDDY *et al.*, 2007).

5 Resultados e Discussão

A partir de um estudo avaliando a atividade antifúngica do extrato e dos compostos isolados a partir das cascas de *P. granatum*, contra *C. albicans*, pesquisadores identificaram e verificaram que a atividade antifúngica de *P. granatum* é predominantemente devido à presença da punicalagina, principal composto presente no extrato das cascas da romã (ENDO *et al.*, 2012). Entretanto, o mecanismo de ação dos princípios bioativos contra o fungo e o tipo de resposta imune esta sendo elaborada na presença deste extrato não estão claramente elucidados até o momento.

Em concordância, avaliando a atividade antifúngica e as modificações morfológicas/estruturais das células de *Candida* spp. causadas pelo extrato etanólico de *P. granatum*, outros autores observaram que o extrato obtido através da casca deste fruto reduziu a carga fúngica, provavelmente pela presença de alta concentração de compostos, como punicalagina, pedunculagina, telimagrandina e galagildilactona. Ainda, o extrato da casca de *P. granatum* foi capaz de interferir na estrutura da levedura de *C. albicans*, influenciando a colonização do microrganismo, permitindo concluir que o extrato das cascas de romã causa danos graves para a estrutura celular das leveduras de *C. albicans* (ANIBAL *et al.*, 2013).

De maneira interessante e colaborativa, a literatura científica aponta que *P. granatum* também possui potencial imunomodulador. Os flavonoides extraídos do suco fermentado e do óleo das sementes deste fitoterápico têm sido associados com a inibição da atividade das enzimas oxidantes cicloxigenases e lipoxigenases, importantes no desenvolvimento do processo inflamatório (SCHUBERT *et al.*, 1999; LABSI *et al.*, 2016). Concomitantemente, o extrato originado do pó da casca desta fruta, quando administrado em coelhos via oral por 10 dias consecutivos a 100 mg/kg, foi capaz de estimular tanto a resposta humoral como a mediada por células, indicando maior responsividade de macrófagos e dos subgrupos de linfócitos T e B (ROSS *et al.*, 2001).

Tendo em vista os benefícios relatados para a romã, o primeiro passo no desenvolvimento de qualquer fórmula farmacêutica herbácea requer estudos toxicológicos detalhados que visam determinar as concentrações mais adequadas para uma formulação farmacêutica isenta de efeitos adversos. Com isto, o presente estudo, envolvendo as características de *P. granatum* relacionadas à biocompatibilidade, isenção de efeitos adversos e eficácia no combate ao fungo *C. albicans*, pretende colaborar para o desenvolvimento de uma futura formulação

5 Resultados e Discussão

herbácea, associada ou não a outros fármacos, para o tratamento e/ou prevenção da candidose oral. Por fim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico e imunomodulatório do extrato hidroalcoólico das cascas de *Punica granatum* no tratamento da candidose oral experimental, em camundongos BALB/c. Em adição, a tolerabilidade dos animais após administração diária das doses antifúngicas de *P. granatum* também foi avaliada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A) Análise fitoquímica e inibitória do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*

2.1 Material vegetal e obtenção do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* e do fluconazol

A matéria prima (fruto) da *Punica granatum* Linné (romã) foi produzida por ANECOOP.S.COOP (Monforte1, ENTLO – 46010. Valencia, Espanha, nº 46/F 46099222/046 R.G.S 21.08955/V), importada por Maxfruta Importação LTDA (CNPJ 22.110.970/0001-82. Av Dr. Gastão Vidigal, 1946. Pavilhão HFC Box 22/23. CEAGESP Vila Leopoldina São Paulo, SP, Brasil) e obtida no Supermercado Super Bom Premium (Av. Orlando Ranieri, 6-20 - Jardim Marambá, Bauru, São Paulo, Brasil). Os frutos, *in natura*, foram selecionados manualmente considerando a uniformidade no estágio de maturação e a ausência de injúrias, lavados em água corrente, higienizados por 15 min em hipoclorito de sódio 1% e enxaguados com água destilada, a fim de remover sujidades.

A separação das cascas e polpa foi realizada manualmente e em curto período de tempo para evitar possível degradação e oxidação dos compostos bioativos. Cada fruta foi cortada em duas partes. As cascas foram removidas com faca no sentido longitudinal em dimensões aproximadas de 1 cm, após foram pesadas individualmente e colocadas em uma bandejas plástica de polietileno. Na sequência, foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar (MA035/1 - Estufa de Secagem com Renovação/Circulação de Ar, Marconi®, Piracicaba, SP, Brazil), a 45°C, por aproximadamente 72 h em baixa luminosidade.

5 Resultados e Discussão

Para obtenção do extrato hidroalcoólico da casca da romã, o material vegetal seco foi triturado e moído (MA048 - Moinho Micro de Facas, Marconi®, Piracicaba, SP, Brazil). Após, 500 g do material moído foram previamente intumescidos com 2 L de etanol 70% (v/v), durante 2 h em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador permaneceu entre 1-2,0 mL.min⁻¹ Kg de material vegetal. Após a extração, a solução foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida em temperatura inferior a 30°C (Modelo Banho Maria Heizbad-VAP, Heidolph®, Schwabach, Germany), submetendo à remoção total dos solventes orgânicos. Por fim, as amostras foram liofilizadas e ficaram armazenadas em recipientes tarados mantidos sob refrigeração até o momento da realização do protocolo experimental, obtendo rendimento equivalente a 60 g (15%).

O fluconazol foi obtido na Farmácia Specifica Ltda., Bauru, SP, Brasil e diluído em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) para os ensaios *in vitro* e suspenso em carboximetilcelulose sódica 1% (Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) para os ensaios *in vivo*.

2.2 Separação e identificação cromatográfica dos compostos de *P. grantaum*

Para a identificação dos compostos presentes no extrato, análises por cromatografia foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, Agilent 1290, Agilent Technologies, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodo (PDA) e uma coluna C18 Zorbax Eclipse Plus (21x50 mm, 1.8 µm, Agilent) como fase estacionária. Essas análises foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), no Departamento de Química, sob supervisão do Prof. Dr. Moacir Rossi Forim. A temperatura do forno da coluna e do autoamostrador foram 40°C e 10°C, respectivamente. Um gradiente de fluxo constante (0,35 mL.min⁻¹) combinando o solvente A (ácido fórmico 0,1%/água) e o solvente B (ácido fórmico 0,1%/acetonitrila) foi utilizado nas seguintes condições: 4-96% B (0,1-13 min) e 4% B (13,1-15 min post run). O volume de injeção foi de 1 µL.

5 Resultados e Discussão

A detecção por espectrometria de massas (EM) foi realizada em um sistema do tipo quadrupolo-tempo de voo (Agilent 6545 q-TOF MS) equipado com uma fonte de ionização eletrospray (ESI) no modo de íon positivo [ESI(+)] e negativo [ESI(-)] e tensão capilar de 4 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 350°C. O fluxo do gás de dessolvatação foi de 11 L.min⁻¹ e o fluxo de gás no cone foi de 8 L.min⁻¹. A baixa e alta energias de colisão foram de 3 eV e 22~40 eV, respectivamente; com fragmentor de 300 V, voltagem do skimmer de 65V e nozzle 0. Os dados de EM foram coletados em uma faixa de 100 a 1200 Da com Mass Hunter Acquisition B.09.00, e analisados com Mass Hunter Qualitative Software B.08.00 (Agilent Technologies, CA, USA).

2.3 Obtenção da pré-cultura do microorganismo e padronização do inóculo

A cepa padrão ATCC 18804, proveniente de um isolado clínico de pacientes com lesões interdigitais de pele, foi armazenada a -80°C em caldo de dextrose Sabouraud, contendo 0,5% extrato de levedura (Becton Dickinson) e glicerol a 10%. No dia do experimento a cepa foi cultivada em placa de Ágar Candida GS (Eiken Chemical Co., Ltd., Tóquio) a 37°C durante 24 h. Após o período de incubação, uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50 mL de meio de cultura YEPD e mantida na incubadora com agitação orbital a 30°C, resultando na pré-cultura. Uma alíquota de 5 mL da cultura foi retirada e colocada em tubos de 15 mL (TPP® 91015 - Techno Plastic Products, Trasadingen, SH, Switzerland) para centrifugação a 4000 rpm por 5 min e posterior separação do precipitado; em seguida, o sobrenadante foi desprezado.

A purificação das células foi feita através de três lavagens deste precipitado com 5 mL de PBS (Phosphate Buffer Solution, Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) e homogeneização em vórtex na sequência (Agitador de Tubos Tipo Vortex Mod. QL-901, Biomixer, Curitiba, PR, Brazil).

Após o processo de purificação, o precipitado foi ressuspensa em 1 mL de PBS e diluído a 1:10000. Uma alíquota da diluição (10 µL) foi colocada em câmara de Neubauer para contagem de leveduras em microscópio óptico comum (DM4 M, Leica Microsystems, Ltda®, São Paulo, SP, Brazil). Depois de obtida a concentração da suspensão, esta foi diluída em PBS para aquisição de inóculo em concentração final 10⁶ células/mL para os experimentos *in vitro* e 10⁸ células/mL para os experimentos *in vivo*.

2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de *P. granatum* e fluconazol frente a *C. albicans*

Para a determinação da CIM, o inóculo de *C. albicans* (ATCC 18804) foi padronizado (ver item 2.3) a uma concentração de 10^6 células/mL, como preconiza o protocolo EUCAST (EUCAST, 2000). O extrato de *P. granatum* e o fluconazol (controle da morte fúngica) foram ressuspensos em meio de cultura RPMI-1640 e, para auxiliar na diluição, dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% foi adicionado apenas ao extrato; ambos foram utilizados na concentração inicial de 150 mg/mL. Diluições seriadas em até 10 vezes do extrato e do fluconazol foram realizadas em placas de 96 poços contendo RPMI-1640 + 2% de glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®). Em cada poço, foram adicionados 100 μ L da suspensão de *C. albicans* (extrato + inóculo) e a placa foi incubada em estufa a 35°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, na absorvância de 540 nm, após 24 h de ensaio.

Como controles, poços contendo apenas o meio de cultura (BLANK) e poços contendo o inóculo + RPMI-1660 (controle de crescimento) foram adicionados. Além disso, poços com o extrato + RPMI-1660 (controle do extrato) foram incluídos para realizar o desconto da cor gerada por *P. granatum* para não influenciar os valores na leitura; não foi necessário realizar essa etapa para os poços com fluconazol. Portanto, a CIM foi calculada através da divisão da densidade ótica de cada concentração do extrato + inóculo pela densidade ótica (DO) do controle de crescimento (inóculo + RPMI-1660) equivalente a 100% de crescimento fúngico, e este percentual foi subtraído de 100. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os dados foram transportados para percentual de morte, a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ morte} = \left[\frac{(\text{DO do extrato} + \text{inóculo}) \times 100}{(\text{DO do inóculo} + \text{RPMI-1660})} \right] - 100$$

A menor concentração do extrato e do fluconazol que foi capaz de inibir 50% do crescimento de *C. albicans* foi considerada a CIM neste ensaio.

B) Avaliação da toxicidade do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* e do fluconazol administrados em camundongos BALB/c saudáveis**2.5 Animais**

Este trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Campus* de Bauru sob o registro nº 206/2018 (Anexo A). Foi utilizado um total de 160 camundongos fêmeas, por serem mais susceptíveis ao modelo experimental, da linhagem BALB/c, com 6 a 8 semanas de vida e aproximadamente 23 ± 2 g, provenientes do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru/SP) cedidos pela bioterista responsável Dra. Patrícia Sammarco Rosa.

Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos do Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE, UNESP, Bauru), sob a supervisão do Prof. Dr. James Venturini, em ambiente refrigerado contendo, no máximo, 5 animais por gaiola de polipropileno com maravalha autoclavada e fechada com filtro de ar em *racks* ventiladas (Alesco, Monte Mor, SP, Brazil), sala com temperatura (22 ± 2 °C) e unidade controladas, sobre ciclo claro/escuro de 12 h. Os animais foram alimentados diariamente com ração para roedores autoclavada (NutriLab) e água *ad libitum*.

Anteriormente ao início de cada experimento, foi verificada a ausência de leveduras de gênero *Candida* na cavidade oral e língua de todos os camundongos, através da coleta de material da mucosa oral com um mini-*swab* estéril (Jonhson & Jonhson®, New Brunswick, Nova Jersey, EUA). Em seguida, o mini-*swab* foi semeado em placas de Petri contendo CHROMagar *Candida* Medium (Becton Dickinson BD®, Heidelberg, Germany) com cloranfenicol, as quais foram incubadas a 37°C por 72 h.

2.6 Determinação da concentração *in vivo* do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* e do fluconazol

As doses estabelecidas para a execução inicial deste trabalho foram baseadas no teste de toxicidade oral aguda de múltiplas doses (*Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method* 423 (OECD, 2001) seguindo a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o qual sugere a utilização de 4 concentrações via ingestão intragástrica, por gavagem, (5, 50, 300 e 2000 mg/Kg – podendo chegar a

5 Resultados e Discussão

5000 mg/Kg) para testar a toxicidade de compostos, como por exemplo de extratos vegetais. Entretanto, o guia preconiza a utilização da concentração 300 mg/Kg em testes iniciais, quando não há informações suficientes acerca de doses letais do composto utilizado.

Sendo assim, corroborando Mubaraki et al. (2016) e Hafiz et al. (2016), os ensaios acerca da toxicidade de *P. granatum* foram realizados com as doses iniciais de 300 (grupo **Pg300**) e 150 (grupo **Pg150**) mg/Kg, equivalentes a 6,6 e 3,3 mg de *P. granatum* considerando o peso médio de 22 g por animal; como controle foram utilizados 100 mg/Kg do fluconazol (BARTLETT et al., 1998). O extrato foi pesado em microtubos de 2 mL (Safe-lock – 2,0 mL, Eppendorf® do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) e diluído em DMSO 5% (Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA) e, na sequência, ressuspenso no veículo carboximetilcelulose sódica a 1% (Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, MO, USA). Para o fluconazol (grupo **FLU**), foi utilizado o mesmo veículo na mesma concentração, mas não houve a necessidade de diluí-lo anteriormente em DMSO 5%.

2.7 Screening hipocrático dos animais

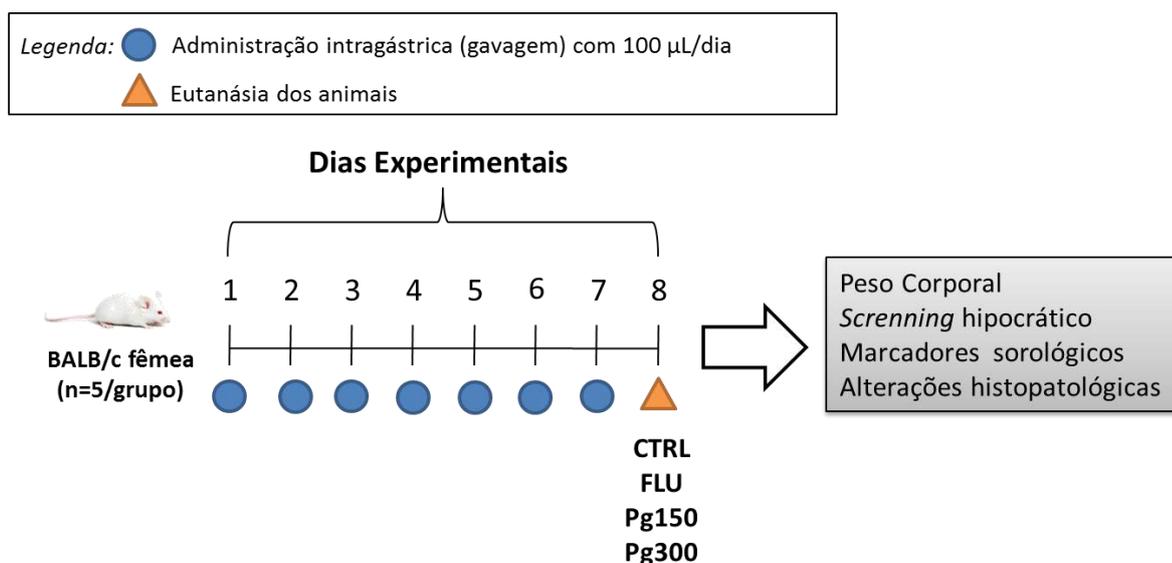
Para a análise dos parâmetros comportamentais e fisiológicos dos animais, foram realizados três experimentos independentes. Antes do início do experimento, para o acompanhamento da evolução da intoxicação, os animais foram marcados a partir da base da cauda com números de traços, feitos com uma caneta marcadora permanente azul, preta ou vermelha, correspondentes aos números de 1 a 5 em cada grupo (n=15/grupo). Nos grupos **Pg150** e **Pg300**, os animais receberam 100 µL/dia do extrato de *P. granatum* (150 mg/Kg ou 300 mg/Kg), por gavagem, durante 7 dias; e no grupo **FLU** os animais receberam fluconazol (100 mg/mL) na mesma frequência. Paralelamente aos tratamentos, constituindo o grupo controle (**CTRL**), animais receberam o veículo (carboximetilcelulose 1%) diluído em água filtrada estéril (100 µL/dia) para fins comparativos.

No primeiro dia experimental (dia 1), todos os grupos receberam a mesma quantidade de ração autoclavada (200 g/gaiola) e água *ad libitum* (300 mL/gaiola). O consumo de ração e de água foram mensurados diariamente com o auxílio de uma balança e de uma proveta, respectivamente. Do mesmo modo, as fezes eram coletadas da gaiola, e pesadas para obtenção do percentual de defecação comparando o final *versus* inicial. Na sequência, os animais foram avaliados quanto

5 Resultados e Discussão

a resposta ao toque (após ser tocado com uma pinça por um intervalo de tempo de 15 segundos) e ao aperto da cauda (reação de expulsão logo após ter a região próxima à ponta da cauda pressionada com bastante intensidade); os animais que respondiam aos estímulos foram contabilizados. O período total de observação das alterações após administração diária da dose única das concentrações de *P. granatum* e do fluconazol foi de 7 dias, sendo que nas primeiras 24 h os animais foram monitorados de 3 em 3 h. O delineamento experimental da análise toxicológica encontra-se na Figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental da avaliação toxicológica após as administrações diárias de 100 μ L de fluconazol ou *Punica granatum* em camundongos BALB/c saudáveis. Para a realização deste ensaio, foram totalizados 60 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (n=15 por grupo). Para obtenção do grupo CTRL, animais receberam administrações diárias, via gavagem, do veículo (carboximetilcelulose 1%) diluído em água filtrada. Ainda, animais receberam fluconazol (100 mg/mL) + veículo (grupo FLU) ou *P. granatum* + veículo, nas concentrações de 150 ou 300 mg/mL (grupos Pg150 e Pg300, respectivamente). No canto inferior direito, estão listados os parâmetros analisados. Foram realizados três experimentos independentes.



2.8 Avaliação do peso corporal dos animais

Do início do experimento (dia 1) até a eutanásia (dia 8), os animais de todos os grupos foram pesados e, através desta mensuração, foi avaliada a cinética do peso corporal e o percentual (%) da perda de peso dos animais (final *versus* inicial). Para representar este percentual, a média do peso inicial foi considerada como 100%. Na sequência, calculava-se o percentual correspondente a média do peso final de cada grupo. Este percentual, subtraído de 100, foi representado por

5 Resultados e Discussão

meio de valores negativos correspondentes a perda. Assim, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\% \text{ de perda de peso} = \left(\frac{\text{média do peso final} \times 100}{\text{média do peso inicial}} \right) - 100$$

2.9 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

A eutanásia dos animais foi realizada no oitavo dia experimental. Os animais de todos os grupos foram anestesiados com uma dose letal, por injeção intramuscular no fêmur, de Ketamina® (União Química, São Paulo, Brasil), na concentração de 100 mg/Kg por peso corporal, e Xylazina® (Produtos Veterinários, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/Kg de peso corporal. Após, foi realizada a coleta cirúrgica do sangue e dos órgãos (baço, fígado e rins) para a realização das análises.

2.10 Avaliação sorológica por meio de marcadores bioquímicos

Após a eutanásia, com o auxílio de uma seringa de 20 mL, foi realizada a punção cardíaca no ventrículo direito para a coleta do sangue dos animais. Aproximadamente um volume de 200 µL de sangue foi coletado em microtubos, centrifugado (5 min a 10.000 rpm) e aspirado para a separação do plasma (soro) livre de hemólise.

As amostras de soro foram mantidas sob refrigeração e submetidas a análise de marcadores bioquímicos séricos: ureia, creatinina, transaminase glutâmico pirúvica (TGP), triglicerídeos e proteínas totais utilizando os kits comerciais (Bioclin® K047, K016, K035, K031 e K117, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa - MG), com metodologias cinéticas, enzimáticas ou colorimétricas em temperatura de 37°C, de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro semi-automático a 490-540nm (Analisador Bioquímico Bio-Plus®, Produtos para Laboratórios Ltda, Barueri).

2.11 Avaliação da presença de alterações histopatológicas no baço, fígado e rins

Logo após a coleta do sangue, foi realizada a perfusão no ventrículo esquerdo com aproximadamente 50 mL de PBS para a remoção do sangue residual

5 Resultados e Discussão

nos vasos e capilares dos órgãos de interesse. Na sequência, baço, fígado e rins foram removidos cirurgicamente, pesados e encaminhados para processamento histotécnico em formalina tamponada (10%). Para análise do peso de cada órgão, a média dos valores obtidos dos grupos **FLU**, **Pg150**, **Pg300** foi comparada com a média dos valores do grupo **CTRL** (100%), obtendo por fim valores percentuais relativos.

No processamento histotécnico, os órgãos foram inicialmente fixados em formol a 10% (pH 7,4) por 48 h; na sequência, foram incubados em concentrações seriadas de alcoóis, em xilol e, por fim, embebidos em parafina. Após obtenção de 3 cortes microscópicos/órgão, equivalentes a 6 μ m, os mesmos foram corados em Hematoxilina/Eosina (H&E). A avaliação da presença de alterações microscópicas, descritas abaixo, foi feita por meio de microscopia óptica de luz (Zeiss®, Jena, Germany), no aumento de 40x e 100x, com o auxílio de um retículo de integração acoplado a ocular, em 100 campos em cada um dos cortes microscópicos obtidos de cada órgão, totalizando 300 campos microscópicos por órgão de cada animal e, portanto, 900 campos por grupo experimental. A presença das seguintes alterações microscópicas, por campo, foi considerada:

- **Baço:** alterações morfométricas em relação a área ocupada pela polpa branca, os tamanhos médios dos nódulos e folículos linfóides, e a área ocupada pela polpa vermelha.
- **Fígado:**
 - ✓ vaso hiperêmico: aumento do volume sanguíneo (hemácias) dentro do vaso, causando a dilatação do mesmo.
 - ✓ micro-hemorragia: ruptura dos capilares causando pequenos focos hemorrágicos, com extravassamento de grupamentos de hemácias no tecido.
 - ✓ alteração hidrópica: alargamento e clareamento citoplasmático, eventualmente com obliteração sinusoidal. Hepatócitos com focos únicos ou dispersos com pequenos vacúolos (áreas claras) no citoplasma (hepatócitos balonizados), fenômeno associado à entrada de água intracelularmente.
 - ✓ esteatose microvesicular: acúmulo de várias gotículas lipídicas (áreas claras) no interior do hepatócitos, próximas ao núcleo.

5 Resultados e Discussão

- ✓ esteatose macrovesicular: hepatócitos com citoplasmas ocupados por um grande vacúolo (área clara) que desloca os núcleo para a periferia celular, em um padrão de cerca de tela de arame.
- ✓ corpúsculos de Mallory-Denk: material eosinofílico amorfo acumulado próximo ao núcleo de hepatócitos balonizados.
- **Rins:**
 - ✓ micro-hemorragia: ruptura dos capilares causando pequenos focos hemorrágicos, com extravasamento de grupamentos de hemácias no tecido.
 - ✓ perda/diminuição do espaço de Bowman: causada pela hiper celularidade glomerular devida à presença de leucócitos intracapilares e à proliferação de células glomerulares intrínsecas, obliterando a luz do espaço, e os túbulos; frequentemente contém micro-hemorragias.

Para cada animal, foi obtida a média do número de campos microscópicos comprometidos (nos quais havia a presença de cada uma das alterações microscópicas citadas anteriormente), considerando os 3 campos avaliados por animal. Na sequência, obteve-se a média de campos comprometidos por grupo (n=3). Uma vez que, para cada corte, foram observados 100 campos, os valores médios, de cada grupo, foram apresentados como valores percentuais de comprometimento do órgão, com relação a cada uma das alterações microscópicas avaliadas.

C) Autenticação do estabelecimento do modelo experimental de candidose oral localizada em camundongos BALB/c imunossuprimidos após 7 dias de infecção por *C. albicans*, e verificação da duração da infecção até 14 dias

Para a autenticação e verificação da permanência da candidose oral experimental, três experimentos independentes foram realizados e os animais foram divididos nos respectivos grupos (n=15/grupo):

- ✓ **CTRL** - animais saudáveis que não receberam nenhum tipo de procedimento.
- ✓ **IMS** - animais apenas imunossuprimidos e eutanasiados após 14 dias.

5 Resultados e Discussão

- ✓ **IMS/Ca** - animais imunossuprimidos, infectados por *C. albicans* e eutanasiados após 7 dias de infecção (grupo estabelecimento da doença).
- ✓ **IMS/Ca+7d** - animais foram imunossuprimidos, infectados por *C. albicans*, receberam gavagem placebo com veículo (carboximetilcelulose 1%) diluído em água filtrada estéril e eutanasiados após 14 dias de infecção (grupo controle de tratamento e permanência da infecção).

2.12 Imunossupressão dos animais

A imunossupressão dos animais foi realizada por meio de duas injeções (dias 0 e 4) subcutâneas de prednisona (40 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) na dose de 100 mg/Kg da massa corporal. Para cada injeção, uma quantidade de 100 µL do medicamento foi colocada em uma seringa estéril de capacidade de 1 mL e injetada na porção posterior da cabeça do animal, próximo à região do pescoço.

Os animais imunossuprimidos receberam ainda cloridrato de tetraciclina (Farmácia Specifica Ltda., Bauru, SP, Brasil), fornecido na água de beber na concentração de 0,83 mg/mL, desde a primeira imunossupressão (dia 0) até o sétimo dia experimental (dia 7), para prevenir o desenvolvimento de infecções bacterianas indesejadas, durante o estabelecimento da doença, que poderiam influenciar os resultados.

Para validar a imunossupressão, os animais foram avaliados através da cinética e percentual (%) da perda de peso corporal em relação ao grupo controle (**CTRL**).

2.13 Infecção por *C. albicans* no dorso da língua dos animais

Para a indução da candidose oral, foi utilizada a metodologia descrita por Takakura et al. (2003), porém com algumas modificações. Após a primeira imunossupressão (dia 0), os animais foram sedados, via intra-muscular, com 100 µL de cloridrato de clorpromazina (Farmácias Specifica Ltda., Bauru, SP, Brazil) a 2 mg/mL (50 µL do medicamento em cada fêmur). Após a sedação, foi realizada a aplicação tópica de *C. albicans*, utilizando a suspensão previamente padronizada deste fungo (ver item 2.3). Para isto, a língua de cada animal foi delicadamente posicionada para fora da cavidade, com o auxílio de uma pinça estéril. Em seguida, mini-swabs estéreis contendo 200 µL da suspensão padronizada de *C. albicans* e

5 Resultados e Discussão

foram levemente friccionados em toda a cavidade oral dos animais, durante um minuto. Após a aplicação, os animais foram realocados em suas respectivas gaiolas e o ambiente foi climatizado a 30°C, para auxiliar na recuperação da sedação.

Foi realizado um acompanhamento regular, a cada uma hora, durante 24 h, para observar como os animais estavam respondendo após o término do processo de sedação, seguido da pesagem diária para análise da cinética e percentual (%) de perda de peso. Para a verificação do sucesso do estabelecimento da candidose oral, animais foram eutanasiados (ver item 2.9) 7 dias pós-infecção (grupo **IMS/Ca**) e para a verificação da permanência da doença, animais foram eutanasiados após 14 dias de infecção (grupo **IMS/Ca+7d**).

Para autenticar o estabelecimento (7 dias pós-infecção) e a permanência (14 dias pós-infecção) da doença, o dorso da língua dos animais foi avaliada macroscopicamente quanto à presença de placas brancas e/ou pseudomembranas, microbiologicamente a partir da quantificação de colônias (UFC/g) do macerado da língua, e microscopicamente por meio da quantificação de leveduras/hifas em cortes microscópicos corados com hematoxilina e eosina (H&E).

2.14 Avaliação macroscópica da presença de placas brancas no dorso da língua dos animais

A língua dos animais foi avaliada macroscopicamente, por meio de escores clínicos de acordo com Takakura et al. (2003). Para isso, após a eutanásia (ver item 2.9), a língua de cada animal foi coletada, com o auxílio de uma pinça e bisturi estéreis, e submetida à avaliação da extensão das placas brancas e/ou pseudomembranas formadas na superfície. Inicialmente, utilizando o programa Image J[®], a extensão total do dorso da língua foi selecionada no sentido base/ápice em comprimento, bem como em lateralidade. Assim, o valor da extensão total da área (mm²) da língua sem placas, em pixels, foi mensurado e caracterizado como 100%. Cada placa branca formada na superfície da língua foi mensurada e o valor de sua área foi dividido ao valor referente à extensão total do dorso da língua de cada animal, obtendo-se valores percentuais da extensão das placas micelias, obedecendo a seguinte fórmula:

$$(\%) = \frac{\text{valor da área (mm}^2\text{) em pixels da placa branca} \times 100 \%}{\text{valor da área (mm}^2\text{) em pixels da extensão total da língua}}$$

5 Resultados e Discussão

Na sequência, estes valores percentuais, obtidos pelos pixels, foram transformados e classificados em escores clínicos de 0 a 4, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Escore clínico, de acordo com um percentual subjetivo da área total em (mm²) apresentando alterações compatíveis com crescimento fúngico, observadas no dorso da língua de camungondos BALB/c infectados por *C. albicans*, baseado em Takakura *et al.* (2003).

Escore Clínico	Características macroscópicas do dorso da língua dos animais
0	Ausência de placas brancas
1	Placas brancas em menos de 20%
2	Placas brancas em mais de 21% e menos de 90%
3	Placas brancas em mais de 91%
4	Placas brancas grossas ou pseudomenbranas em mais de 91%

Fonte: TAKAKURA *et al.*, 2003.

2.15 Avaliação microbiológica do desenvolvimento de *C. albicans* no dorso da língua dos animais por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g)

Após avaliação macroscópica, os animais foram avaliados quanto ao crescimento fúngico (levedura/hifas) obtido no dorso da língua e no tecido conjuntivo subjacente. Para isso, a língua foi coletada cirurgicamente com uma pinça e tesoura estéreis, e seccionada no sentido base-ápice (corte longitudinal) com o auxílio de um bisturi. Na sequência, um dos fragmentos foi colocado dentro de um microtubo de 2 mL (Safe-lock – 2,0 mL, Eppendorf® do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) e o mesmo foi pesado, para obter o valor do peso do órgão coletado, necessário para incluir na fórmula usada para este ensaio microbiológico. Assim, 200 µL de PBS foram adicionados em cada microtubo e, com o auxílio de um pistilo, o fragmento da língua foi macerado.

Após maceração, cada microtubo foi completado com 800 µL de PBS (obtendo o total de 1 mL de homogenato) e homogeneizado em vórtex. Sendo assim, uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi semeada, com o auxílio de uma alça de Drigalski, na superfície de placas de Petri contendo meio Dextrose Saboraud

5 Resultados e Discussão

(Sigma Aldrich® Inc., St. Louis, USA) com cloranfenicol; as placas foram incubadas a 37°C por 72 h. Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) do gênero *Candida* foram contabilizadas. O experimento foi realizado em duplicata e os dados obtidos foram transformados logaritmicamente (\log_{10}) por grama de tecido da língua. Por fim, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm a 21°C por 10 min, o sobrenadante foi separado do tecido macerado, e as duas amostras foram armazenadas a -80°C, em criotubos, para posteriores análises.

2.16 Avaliação histopatológica do dorso da língua dos animais

O outro fragmento longitudinal das línguas foi encaminhado para processamento histotécnico (ver item 2.11). Após obtenção de 3 cortes microscópicos (por animal) equivalentes a 6 μm , os mesmos foram corados ora em Hematoxilina/Eosina (H&E) ora em PAS (ácido periódico de Schiff). Em seguida, foi realizada a avaliação das alterações microscópicas em microscopia óptica de luz (Zeiss®, Jena, Germany), no aumento de 40x por toda a extensão do dorso da língua, com o auxílio de um retículo de integração acoplado a ocular, totalizando 100 campos por corte microscópico. Por fim, uma lâmina contendo 3 cortes por animal, foram avaliados 300 campos por animal em cada grupo (n=9).

Esta análise resultou em dois escores microscópicos, que variavam de 0 a 4 ou de 0 a 3, de acordo com os seguintes critérios:

- Quantidade de leveduras/hifas: **(0)**: ausência; **(1)**: 1 a 5; **(2)**: 6 a 15; **(3)**: 16 a 50 e **(4)**: mais de 50, de acordo com a metodologia de Junqueira et al. (2005).
- Infiltrado inflamatório intraepitelial/subepitelial: de acordo com a intensidade das células inflamatórias, por meio de uma análise subjetiva: **(0)** ausência; **(1)** leve; **(2)** moderado; e **(3)** intenso.

D) Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* após 7 dias de administração diária por gavagem, em camundongos BALB/c com candidose oral localizada estabelecida experimentalmente

2.17 Delineamento Experimental

O delineamento experimental (Figura 2) desta etapa foi realizado após o

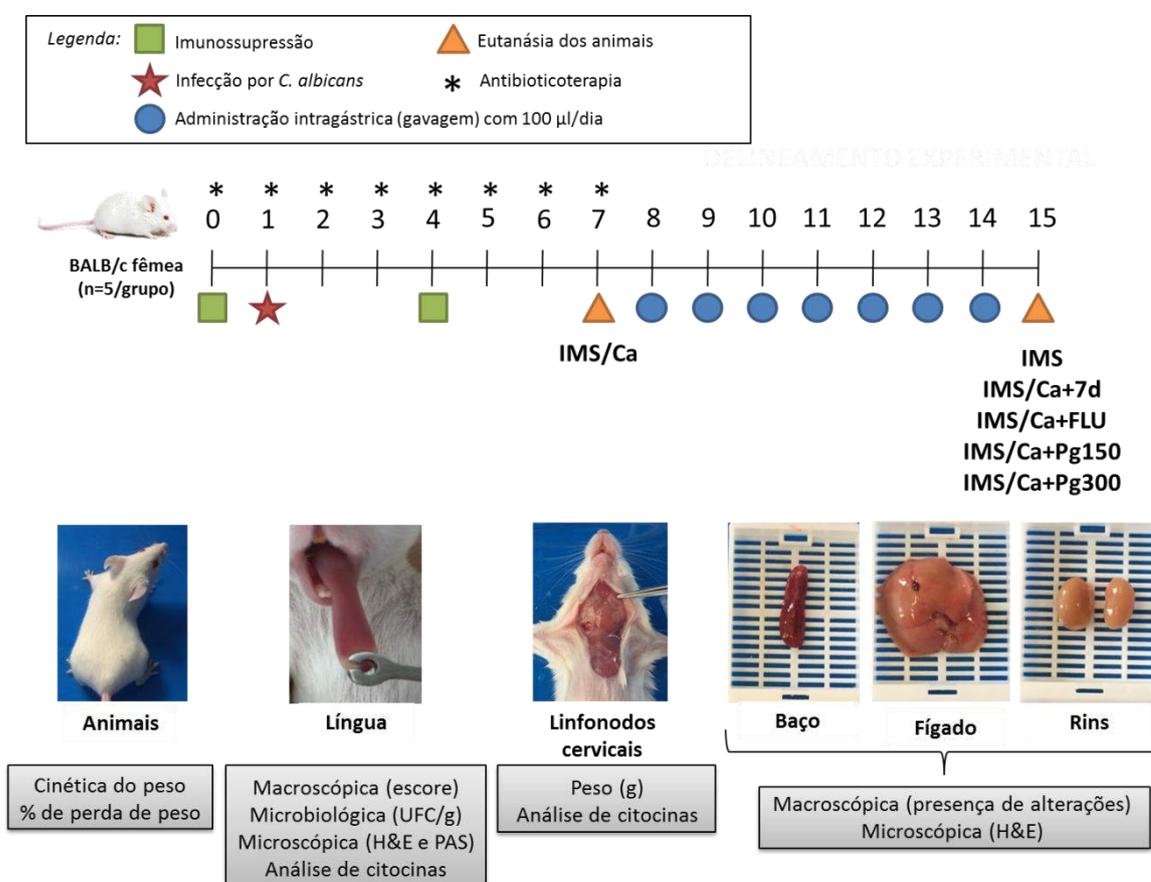
5 Resultados e Discussão

estabelecimento das concentrações do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* (ver item 2.6), e do estabelecimento e duração da infecção até 14 dias (ver itens 2.14, 2.15 e 2.16). Foram realizados três experimentos independentes nos quais os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=15 animais/grupo):

- ✓ **CTRL:** os animais não foram submetidos à nenhum tipo de procedimento experimental.
- ✓ **IMS:** os animais foram apenas imunossuprimidos (com as duas injeções de prednisolona) e eutanasiados após 14 dias.
- ✓ **IMS/Ca:** os animais foram imunossuprimidos, infectados por *C. albicans* e eutanasiados após 7 dias de infecção (grupo controle do estabelecimento da infecção).
- ✓ **IMS/Ca+7d:** os animais foram imunossuprimidos, infectados por *C. albicans*, receberam gavagem placebo com veículo (carboximetilcelulose 1%) diluído em água filtrada estéril e eutanasiados após 14 dias de infecção (grupo controle de tratamento e da permanência da infecção).
- ✓ **IMS/Ca+FLU:** os animais foram imunossuprimidos, infectados por *C. albicans* e receberam tratamento, via gavagem, com 100 mg/Kg de fluconazol.
- ✓ **IMS/Ca+Pg150:** os animais foram imunossuprimidos, infectados por *C. albicans* e receberam tratamento, via gavagem, com 150 mg/Kg do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*.
- ✓ **IMS/Ca+Pg300:** os animais foram imunossuprimidos, infectados por *C. albicans* e receberam tratamento, via gavagem, com 300 mg/Kg do extrato hidroalcoólico das cascas *P. granatum*.

5 Resultados e Discussão

Figura 2 - Delineamento experimental da avaliação antifúngica e imunomodulatória após as administrações diárias de 100 μ L de *Punica granatum* e fluconazol em camundongos BALB/c infectados por *Candida albicans*. Para a realização destes ensaios, foram totalizados 120 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (n=15 por grupo). Para obtenção do grupo CTRL, animais não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento experimental (animais saudáveis). Grupo IMS: animais foram apenas imunossuprimidos (com as duas injeções de prednisolona) e eutanasiados após 14 dias do início do experimento. Grupo IMS/Ca: animais foram imunossuprimidos, infectados por *C. albicans* e eutanasiados após 7 dias de infecção. Grupo IMS/Ca+7d: animais foram imunossuprimidos, infectados, receberam gavagem placebo com veículo (carboximetilcelulose 1%) diluído em água filtrada estéril e foram eutanasiados após 14 dias de infecção. Grupos IMS/Ca+FLU; IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300: animais foram imunossuprimidos, infectados, receberam tratamento, via gavagem, com 100 mg/Kg de fluconazol, ou com 150 mg/Kg ou 300 mg/Kg do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* (respectivamente), e foram eutanasiados após 14 dias de infecção. Abaixo, estão os parâmetros analisados e suas imagens representativas. Foram realizados três experimentos independentes.



2.18 Tratamento da candidose oral com o extrato de *P. granatum* e fluconazol

Os tratamentos com o extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* e fluconazol tiveram início após o estabelecimento da infecção (8^o dia experimental). Após a determinação das concentrações de *P. granatum* e fluconazol, o tratamento dos animais foi realizado com 100 μ L/dia do extrato de *P. granatum* (150 ou 300 mg/mL, grupos **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300** respectivamente) por ingestão intragástrica (gavagem), durante 7 dias após o estabelecimento da candidose oral (do

5 Resultados e Discussão

dia experimental 8 ao 14). No grupo **IMS/Ca+FLU**, os animais receberam fluconazol (100 mg/mL) via gavagem (100 µL/dia) na mesma frequência (ver Figura 2).

Como controles, animais imunossuprimidos e infectados por *C. albicans* foram eutanasiados 7 dias pós-infecção (grupo **IMS/Ca**) para identificar os parâmetros patológicos inerentes do estabelecimento da infecção; animais imunossuprimidos e infectados receberam, após 7 dias de infecção por *C. albicans* (grupo **IMS/Ca+7d**), sete administrações diárias do veículo (carboximetilcelulose 1%) diluído em água filtrada estéril (100 µL/dia) para mimetizar as mesmas condições realizadas nos grupos experimentais de tratamento; e animais saudáveis (**CTRL**) foram incluídos para análise comparativa dos parâmetros fisiológicos com os patológicos.

2.19 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *P. granatum* e fluconazol no tratamento da candidose oral

Para a avaliação da atividade anti-*Candida* de *P. granatum* e fluconazol, desde o início do experimento até a eutanásia (8^o e 15^o dias experimentais), a cinética do peso corporal e o percentual (%) da perda de peso dos animais foram avaliados (ver item 2.8). Pós-eutanásia, a língua de cada animal foi coletada, com o auxílio de uma pinça e bisturi estéreis, e submetida à avaliação macroscópica (ver item 2.14), microbiológica (ver item 2.15) e microscópica (ver item 2.16).

Para análise dos efeitos colaterais de *P. granatum* e fluconazol em animais infectados, baço, fígado e os rins dos animais foram removidos assepticamente, pesados, encaminhados para processamento histotécnico e avaliados do mesmo modo como foi realizado na análise toxicológica (ver item 2.11).

E) Avaliação da atividade imunomodulatória do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* após 7 dias de administração diária por gavagem, em camundongos BALB/c com candidose oral localizada estabelecida experimentalmente

2.20 Avaliação da imunomodulação do extrato de *P. granatum* e fluconazol pós-tratamento da infecção

O perfil da resposta inflamatória frente aos diferentes tipos de tratamentos (*P. granatum* e fluconazol), para a candidose oral experimental, foi investigado

5 Resultados e Discussão

sistemicamente (linfonodos cervicais) e *in situ* (língua).

Processamento do homogenato (linfonodos cervicais e língua)

Para as amostras de linfonodos cervicais, após a eutanásia, a glândula submandibular próxima aos linfonodos cervicais foi delicadamente removida com o auxílio de um bisturi estéril. Após, 2 ou 3 pares de linfonodos cervicais foram coletados em microtubos. Os mesmos foram pesados, ressuspensos em 200 μ L de PBS e macerados com um pistilo estéril. Para as amostras de língua, foram utilizados os mesmos homogenatos obtidos a partir da análise microbiológica (ver item 2.15). Para ambas as amostras, o sobrenadante foi separado do tecido por meio de centrifugação (10 min, 4°C a 10.000 rpm) antes de sua utilização neste ensaio.

Quantificação de proteínas totais das amostras

Para determinação da concentração em proteína total das amostras de linfonodos cervicais e língua, foi utilizado o método de Bradford. O método baseia-se na alteração da absorvância do corante de ligação, Coomassie Brilliant Blue G 250, em meio ácido, em que a sua coloração avermelhada se converte numa forma azulada quando se liga à proteína. O máximo de absorção para o corante varia entre os 495nm e 595nm, sendo que o aumento da absorvância é proporcional à quantidade de corante ligado e, conseqüentemente, à concentração de proteína presente na amostra.

As determinações foram feitas em placas de 96 poços em duplicata. Para traçar a curva padrão, a partir da qual foram calculadas as concentrações das amostras, por interpolação gráfica, utilizaram-se soluções de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações de 125, 250, 500, 750 e 1000 μ g/mL.

O protocolo consistiu na aplicação de 5 μ L de amostra (homogenato de linfonodos cervicais ou língua), ou solução de proteína padrão, em cada poço da microplaca. A cada um dos poços foram adicionados 250 μ L de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). A placa foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se a leitura de absorvância a um comprimento de onda de 595 nm, em leitor de microplacas (ELX 800, Biotek).

5 Resultados e Discussão

Quantificação de citocinas e quimiocinas

Na sequência, as amostras dos homogenatos dos dois tecidos (linfonodos cervicais e língua) foram submetidas à quantificação das citocinas e quimiocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-17E, IL-17F, IL-22, IL-23, MIP-1 α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 e TNF- α , utilizando os *kits* MILLIPLEX® Mouse Cat #Th17/MTH17MAG-47K e Cat #TGF β 1,2,3/TGFBMAG-64K-03, pela tecnologia Luminex® xMAP® (*Multiple Analyte Profiling*) da EMD Millipore segundo as informações do fabricante (Merck Millipore Co., MA, USA).

Sucintamente, microesferas de captura recobertas por anticorpos monoclonais específicos para cada analito são adicionados aos poços, juntamente com amostras e padrões (25 μ L de cada de amostras diluídas 1:30). Após incubação e lavagem, uma mistura de anticorpos biotinizados secundários é adicionada. Em seguida, a estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente é incubada por um período breve. Após lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as microesferas foi ressuspenso em uma solução tampão. Para a análise das citocinas TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, foi necessário o pré-tratamento das amostras através de procedimento de acidificação.

As leituras dos padrões e amostras foram realizadas pelo aparelho Luminex® 100 (Luminex Corporation, Texas, USA) com software analisador de microesferas MAGPIX (Luminex Corporation, Texas, USA). Todas as amostras e curvas-padrão foram processadas em duplicata e os resultados foram representados em pg/mL. Os limites inferiores e superiores descritos pelo controle de qualidade (QC) utilizados para a elaboração da curva-padrão do controle de cada citocina e quimiocina (*expected range*), disponibilizados pelos *kits*, estão disponíveis no Anexo B.

2.21 Análise dos resultados

As diversas variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um ou dois critérios (One-Way ou Two-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD (Honest Significant Difference), possibilitando a comparação entre os diferentes tratamentos. Caso contrário, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. A diferença foi considerada

estatisticamente significativa, em todos os ensaios, quando $p < 0.05$, através do programa estatístico computadorizado GraphPad Prima 5.0 (GraphPad®, San Diego CA, USA) e Statistica 10.0 (StatSoft®, Tulsa, OK, USA).

3 RESULTADOS

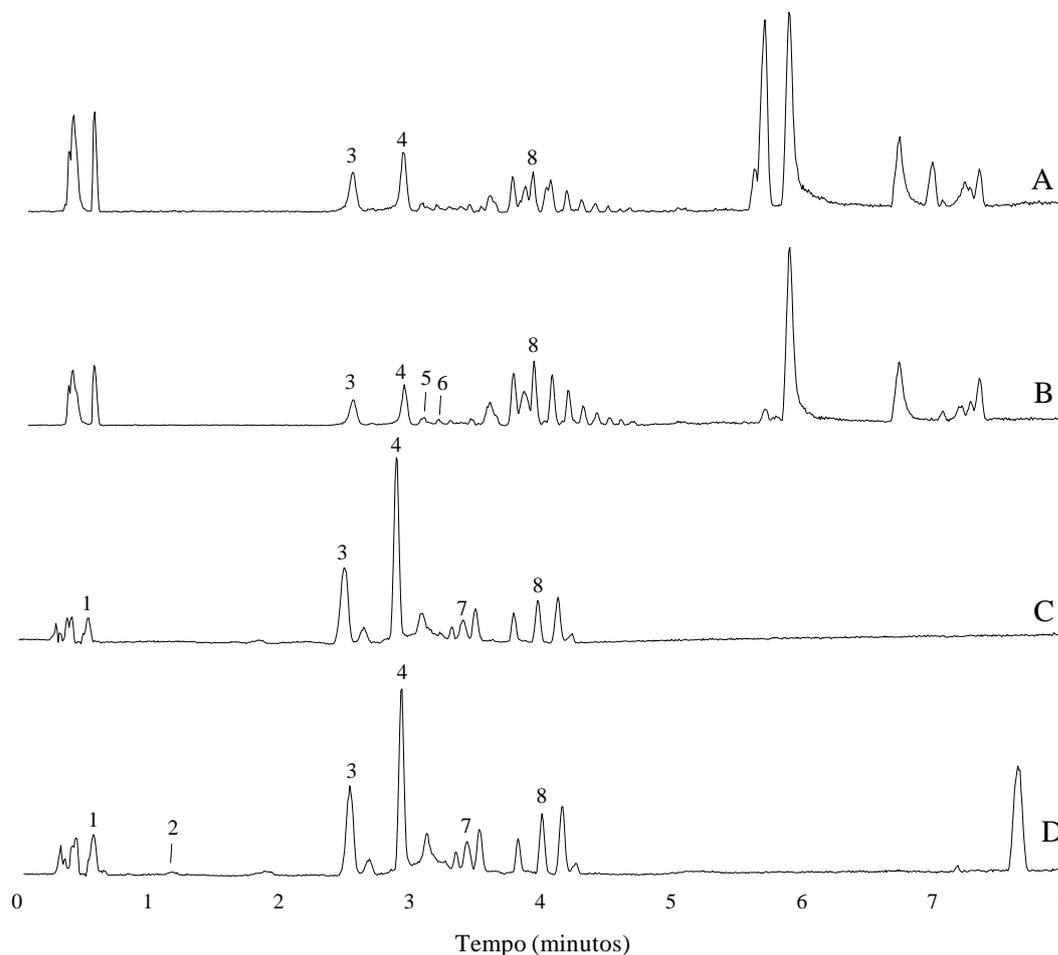
A) Análise fitoquímica e inibitória frente a *C. albicans* do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*

3.1 Separação e identificação cromatográfica dos compostos bioativos presentes em *P. granatum*.

Para caracterizar o perfil fitoquímico por meio da identificação dos compostos presentes nas cascas de *P. granatum*, o material liofilizado e o extrato hidroalcoólico foram solubilizados em uma solução de metanol:água 1:1 (v/v) e analisados por UHPLC-qTOF-MS/MS. Uma representação dos cromatogramas obtidos pode ser observada na Figura 3 e os compostos identificados na Tabela 2.

5 Resultados e Discussão

Figura 3 - Cromatogramas do pico base das amostras de *Punica granatum*. Material vegetal liofilizado com ESI em modo positivo (A) e negativo (C), e extrato hidroalcoólico liofilizado com ESI em modo positivo (B) e negativo (D). Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 2. Os espectros de massas obtidos podem ser consultados no Apêndice A.



Foram identificados oito compostos presentes na matriz vegetal de *P. granatum* (Tabela 2). Através da sensibilidade do detector acoplado, moléculas foram ionizadas gerando diferentes picos no cromatograma (Figura 3). Os taninos representam uma classe de compostos bioativos que concentram-se, em maior parte, na casca. O composto bioativo mais ionizado, ou seja, que apresentou maior altura/área de pico no extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* foi o tanino hidrolisável punicalagina.

Na separação e identificação por cromatografia, a punicalagina se apresenta com dois picos, sendo um semelhante ao outro em relação ao espectro na região de UV. Este fato indica que os compostos são isolados sob forma de anômeros (punicalaginas α e β), portando os dois picos são pertencentes a uma

5 Resultados e Discussão

única substância (CALANI, *et al.*, 2013; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2013; NUNCIO-JÁUREGUI *et al.*, 2015; GARCÍA-VILLALBA *et al.* 2015; MINGXUN WANG *et al.*, 2016).

Outros compostos polifenóis foram identificados, como punicalina, pedunculagina, granatina B, galloyl-HHDP-hexosid (isômero de punicalagina) e HHDP-hexosídeo também foram encontrados na matriz vegetal.

Tabela 2 - Características espectrais dos compostos isolados nas amostras de frutos de *P. granatum*

Composto	t_R (min)	Fórmula molecular	ESI (+)		ESI (-)			
			Íon precursor [M+Na] ⁺ ou [M+H] ⁺ (m/z)	Erro (ppm)	Íons produto (m/z)	Íon precursor [M-H] ⁻ (m/z)	Erro (ppm)	Íons produto (m/z)
1 HHDP-hexosídeo	0.554	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄						464.0627
								300.9993
								275.0199
								191.0201
2 Punicalina	1.182	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	805.0493	-0.25	603.0027	781.0530	0.77	721.0322
								601.9974
3 α-punicalagina	2.526	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	1107.0553	-0.45	765.0566 603.0042	1083.0598	1.02	575.0111
								300.9989
4 β-punicalagina	2.909	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	1107.0537	-1.89	765.0561 603.0036	1083.0601	1.29	781.0535
								600.9897
5 pedunculagina	3.084	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	959.0770	0.31	349.0898 277.0347			600.9899
								300.9993
6 pedunculagina	3.192	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	959.0758	-0.94	767.0739 153.0181			823.0588
								463.0524
7 galloyl-HHDP-hexosid	3.440	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈				633.0738	1.58	300.9993
								463.0526
8 granatina B	3.808	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	975.0706	-0.41	783.0677	951.0743	0.32	300.9991

t_R = tempo de retenção; ionização eletrospray no modo de íon positivo [ESI(+)] e negativo [ESI(-)].

5 Resultados e Discussão

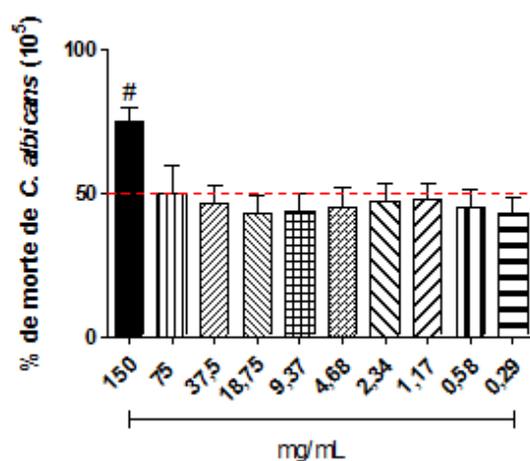
3.2 Concentração mínima inibitória (CIM) de *P. granatum* e fluconazol frente a *C. albicans*.

A partir dos ensaios realizados para a determinação da CIM do fluconazol e *P. granatum* frente a *C. albicans*, foi verificado que a maior concentração testada de fluconazol (150 mg/mL) resultou em maior percentual de inibição da carga fúngica, sendo capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* em 75,6% (morte fúngica), diferenciando estatisticamente de todas as demais concentrações testadas ($p < 0,05$), as quais apresentaram um padrão semelhante de percentual de morte fúngica, ou seja, aproximadamente 47%, a partir de 75 mg/mL, não havendo diferenças significativas entre elas (Figura 4A).

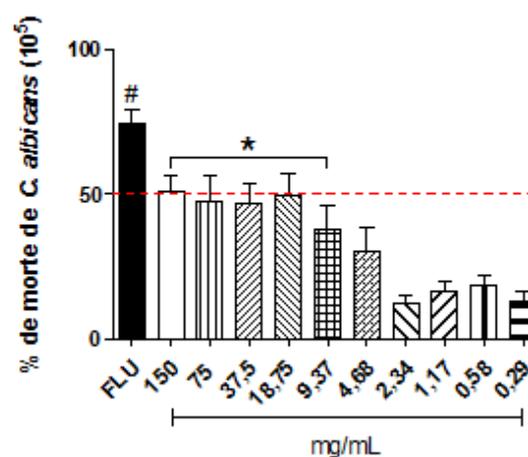
Em relação a *P. granatum*, a partir de 18,75 mg/mL, o extrato inibiu 50% da carga fúngica, diferenciando significativamente ($p < 0,05$) das concentrações de 2,34 a 0,29 mg/mL, caracterizando a CIM deste material vegetal neste trabalho (Figura 4B). Para fins comparativos, os valores correspondentes ao percentual de morte fúngica após contato com fluconazol a 150 mg/mL foram adicionados na Figura 4B.

Figura 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol (A) e *Punica granatum* (B) frente a *Candida albicans*. De acordo com o protocolo EUCAST (EUCAST, 2000), ambos os ensaios foram realizados com 10^6 células/mL de *C. albicans* (ATCC 18804) desafiadas com diluições seriadas de 150 até 0,29 mg/mL de fluconazol (A) ou *P. granatum* (B). A sigla FLU representa os valores percentuais médios de morte fúngica, após contato com 150 mg/mL de fluconazol. A linha tracejada em vermelho representa 50% de inibição do crescimento de *C. albicans*. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os dados foram transportados para percentual de morte fúngica, de acordo com os valores obtidos no controle de crescimento (inóculo + RPMI-1660). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. Em (A) # $p < 0,05$ vs 75 a 0,29 mg/mL de fluconazol. Em (B) # $p < 0,05$ vs 150 a 0,29 mg/mL de *P. granatum*; * $p < 0,05$ vs 2,34 a 0,29 mg/mL de *P. granatum*.

A) Fluconazol



B) *Punica granatum*



B) Avaliação da toxicidade do extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* e do fluconazol administrados em camundongos BALB/c saudáveis

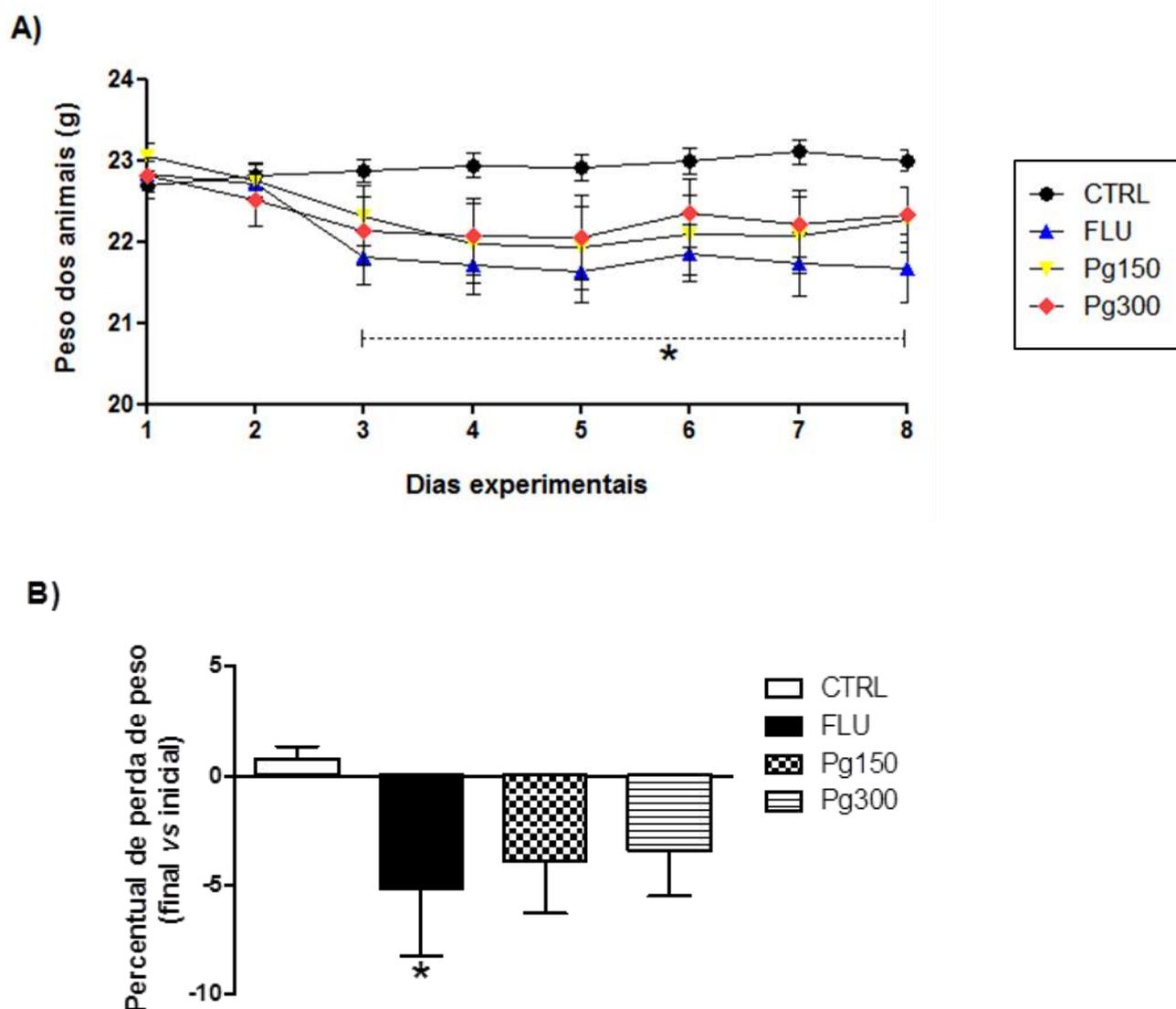
3.3 Cinética corporal e percentual (%) da perda de peso (final versus inicial)

Após a mensuração do peso de todos os animais, foi possível avaliar a cinética corporal e o percentual de perda de peso entre os diferentes grupos (**CTRL**, **Pg150**, **Pg300** e **FLU**) do início (dia 1) até o final do experimento (dia 8). Os animais que receberam as administrações diárias de fluconazol (**FLU**), após o terceiro dia experimental, apresentaram redução significativa do peso corporal ($p < 0,05$) que se manteve até o momento da eutanásia dos animais (dia 8). Esta redução não foi observada nos animais controle (**CTRL**), bem como naqueles que receberam administrações do extrato de romã, independente da concentração (**Pg150** e **Pg300**) (Figura 5A).

Corroborando os resultados da cinética corporal, na análise do percentual de perda de peso, os animais do grupo **FLU**, ao final do experimento (dia 8) perderam em média -5,14% de seu peso quando comparado ao peso inicial, diferenciando dos demais grupos avaliados; enquanto que os animais dos grupos **Pg150** e **Pg300** perderam apenas -3,8% e -3,4% de seu peso, respectivamente, não diferindo do controle. Os animais do grupo **CTRL** não perderam peso ao longo do experimento (Figura 5B).

5 Resultados e Discussão

Figura 5 - Cinética do peso corporal (A) e percentual da perda de peso (B) de camundongos BALB/c após administração diária, via gavagem, de 7 doses de *Punica granatum* (Pg150 e Pg300) ou fluconazol (FLU). Do início do experimento (dia experimental 1) até a eutanásia (dia experimental 8), os animais dos grupos CTRL, FLU, Pg150 e Pg300 foram pesados diariamente, e os valores médios resultaram em uma cinética do peso corporal, representada por diferentes linhas, de acordo com os grupos. Para avaliar o percentual da perda de peso corporal, a média do peso inicial foi considerada como 100% e, na sequência, calculou-se o percentual correspondente a média do peso final. Este percentual foi subtraído de 100 e representado por meio de valores negativos. Foram realizados 3 experimentos independentes (n=15 por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. Em (A) * $p < 0,05$ vs CTRL, Pg150 e Pg300 a partir do 3° dia experimental. Em (B), * $p < 0,05$ vs CTRL, Pg150 e Pg300



3.4 Screening hipocrático dos animais

Sobre os parâmetros comportamentais e fisiológicos, os animais foram avaliados quanto ao consumo de ração e água e o percentual (%) de defecação. Além disso, estímulos sensoriais como a resposta ao toque e ao aperto da cauda foram observados diariamente e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Em relação ao consumo de ração, os animais que foram submetidos a administração do extrato de *P. granatum* durante 7 dias, independentemente da concentração (**Pg150** ou **Pg300**), alimentaram-se mais do que os animais controle (**CTRL**), assim como mais do que os animais que receberam fluconazol (**FLU**) ($p < 0,05$). Conseqüentemente, animais tratados com romã apresentaram uma menor perda de peso ao longo do experimento (Figura 5B), com relação ao grupo **FLU**. Em concordância, o percentual de perda de peso dos animais do grupo Pg não diferiu do **CTRL**, embora os valores tenham sido negativos.

Quanto a ingestão de água pelos animais, houve consumo similar ao longo do experimento (dia 8 *versus* dia 1) do grupo **Pg150** em relação ao **CTRL**.

Considerando a atividade do sistema nervoso autônomo, monitorada através do percentual de defecação, apenas os animais tratados com *P. granatum* apresentaram percentual semelhante ao grupo **CTRL**.

Segundo os testes realizados para avaliar a atividade do sistema sensorial, ou seja resposta ao toque e resposta ao aperto da cauda, 3 dos 15 animais do grupo **FLU** e 2 do grupo **Pg300** não responderam após serem tocados com uma pinça por um intervalo de tempo de 15 segundos, após três dias das respectivas administrações. De forma concordante, 6 animais do grupo **FLU** ($p < 0,05$) e um animal do grupo **Pg300** não reagiram, com o movimento de expulsão, logo após sofrerem pressão na ponta da cauda, após o segundo dia de administração terapêutica.

5 Resultados e Discussão

Tabela 3 - Screening hipocrático dos camundongos BALB/c saudáveis. Animais receberam, por gavagem durante 7 dias, 300 e 150 mg/mL (grupos Pg300 e Pg150, respectivamente) ou 100 mg/mL de fluconazol (grupo FLU). Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (CTRL). Foram realizados 3 experimentos independentes (n=15 por grupo). O consumo diário de ração e água, bem como o percentual de defecação, foram obtidos através de valores percentuais do primeiro dia experimental (Dia 0) vs o dia da eutanásia (Dia 8). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Two-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * p<0,05 vs CTRL, • p<0,05 vs FLU e ▼ p<0,05 vs Pg300. Os resultados em relação a resposta ao toque e ao aperto da cauda foram indicados de acordo com a quantidade de animais (n) que respondiam aos respectivos estímulos.

	Consumo diário de ração (%)	Consumo diário de água (%)	Defecação (%)	Resposta ao toque (n)	Resposta ao aperto da cauda (n)
CTRL	16,7 \pm 1,150	10,6 \pm 0,351 [•]	113,3 \pm 11,55 [•]	15	15
FLU	15,3 \pm 0,321	21,3 \pm 0,602*	86,2 \pm 0,907*	12	09*
Pg150	26,6 \pm 1,528* ^{•▼}	11,9 \pm 1,00 ^{•▼}	112,2 \pm 0,90 [▼]	15	15
Pg300	37,4 \pm 0,306* [•]	18,1 \pm 0,907* [•]	105,5 \pm 7,67 [•]	13	14

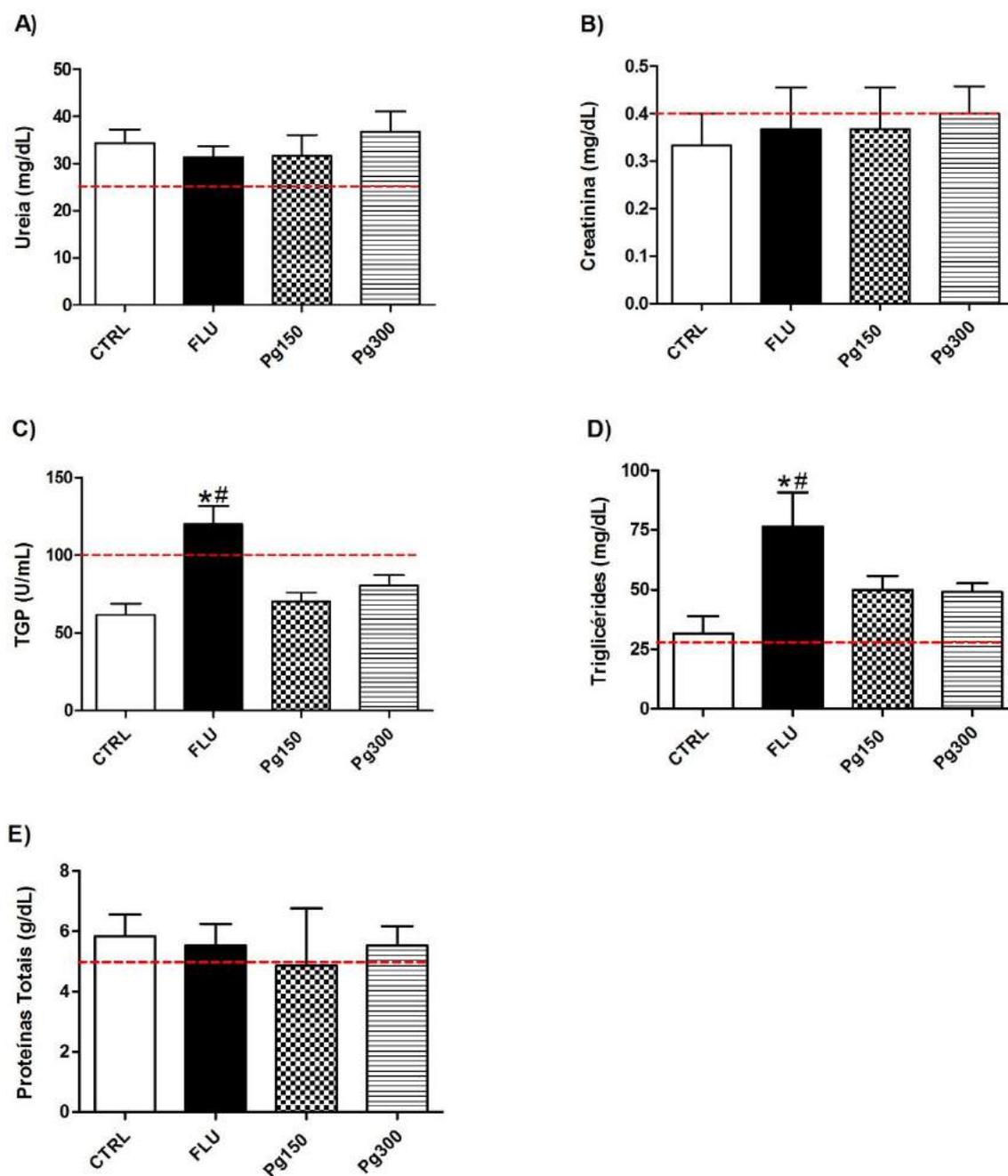
3.5 Avaliação dos marcadores bioquímicos séricos

Os níveis séricos de ureia, creatinina e proteínas totais, após 7 dias de administração, tanto de *P. granatum*, independente da concentração, como de fluconazol (**Pg150**, **Pg300** e **FLU**), mantiveram-se semelhantes aos animais do grupo **CTRL**.

Entretanto, houve aumento significativo (p<0,05) de TGP e triglicerídeos no soro dos animais do grupo **FLU** (120 U/mL e 76,3 mg/dL, respectivamente a cada marcador) tanto em relação aos valores de referência destes marcadores em camundongos da linhagem BALB/c (linha vermelha – ALMEIDA *et al.*, 2008) como em relação aos animais dos grupos **CTRL**, **Pg150** e **Pg300** (Figura 6).

5 Resultados e Discussão

Figura 6 - Análise dos marcadores bioquímicos séricos de camundongos BALB/c saudáveis. Foram analisados Ureia (A), Creatinina (B), Transaminase glutâmico pirúvica – TGP (C), Triglicérides (D) e Proteínas totais (E) no soro dos animais BALB/c saudáveis após administração diária, via gavagem, de 7 doses de *Punica granatum* (Pg150 e Pg300) ou fluconazol (FLU). A linha tracejada em vermelho representa os valores basais para a linhagem de camundongos BALB/c de acordo com Almeida et al. (2008) Foram realizados 3 experimentos independentes (n=15 por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ vs CTRL e # $p < 0,05$ vs Pg150 e Pg300.



5 Resultados e Discussão

3.5 Peso e análise de alterações histopatológicas presentes no baço, fígado e rins dos animais

Após as administrações diárias de fluconazol e *P. granatum*, o único órgão que apresentou valores percentuais de peso distintos do controle (**CTRL**) foi o fígado ($p < 0,05$). No grupo **FLU** houve ganho médio de 18,2%, enquanto que nos grupos **Pg150** e **Pg300** os valores foram semelhantes ao **CTRL** (Tabela 4).

Tabela 4 - Percentual relativo do peso dos órgãos (baço, fígado e rins) de camundongos BALB/c saudáveis. Animais receberam por gavagem, durante 7 dias, 300 e 150 mg/mL (grupos Pg300 e Pg150, respectivamente) ou 100 mg/mL de fluconazol (grupo FLU). Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (**CTRL**). Para análise do peso (em percentual) de cada órgão, a média dos valores obtidos dos grupos Pg150, Pg300 e FLU foram comparados com a média dos valores do grupo CTRL (a qual foi considerada 100%); obtendo-se, por fim, valores percentuais relativos. Foram realizados 3 experimentos independentes ($n=15$ por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Two-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ vs CTRL.

	Baço (%)	Fígado (%)	Rins (%)
CTRL	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
FLU	98,5 \pm 47,6	118,2 \pm 9,6*	95,3 \pm 32,5
Pg150	108,9 \pm 26,2	95,6 \pm 6,3	96,6 \pm 27
Pg300	89,1 \pm 23,3	99,7 \pm 7,2	103,4 \pm 17,8

Alterações macro e microscópicas, após a administração dos fármacos, foram observadas no fígado e nos rins dos animais. No baço, independentemente do grupo avaliado, não foram visualizadas alterações morfométricas, portanto este órgão manteve suas características histológicas semelhantes ao controle (**CTRL**), mesmo após a administração diária das concentrações de *P. granatum* ou de fluconazol (Apêndice B).

FÍGADO

Macroscopicamente, o fígado dos animais do grupo **FLU** apresentou-se mais pastoso, com bordas abauladas, consistência amolecida, coloração amarelada em toda a sua extensão, superfície externa lisa e brilhante, e superfície de corte

5 Resultados e Discussão

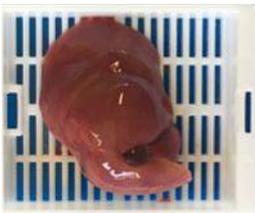
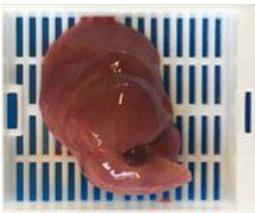
untuosa, sem marcação lobular (Apêndice C). Ainda, os fígados dos animais administrados com fluconazol apresentaram significativa frequência de todas alterações microscópicas avaliadas com relação aos demais grupos (**CTRL**, **Pg150** e **Pg300**) ($p < 0,05$). Tais alterações encontradas mais frequentemente foram esteatose microvesicular, principalmente nas zonas periportal, justasinusoidal ou centrolobular; e esteatose macrovesicular, perfazendo uma média de 93,7% e 98,3%, respectivamente, da área do órgão avaliada (Tabela 5 e Apêndice D e E). Ainda, foi possível observar a presença de alguns corpúsculos de Mallory-Denk no interior de hepatócitos balonizados (Apêndice E).

Nos grupos **Pg150** e **Pg300**, não se observaram alterações macroscópicas nos fígados (Tabela 5). Com relação às alterações microscópicas, estes órgãos apresentaram apenas focos de vasos hiperêmicos (em uma média de 8% e 12,1% da área, respectivamente), e de micro-hemorragia (em uma média de 6,9% e 11,1% da área, respectivamente).

RINS

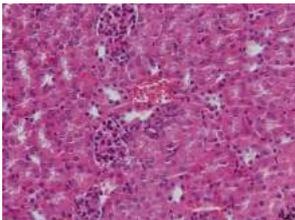
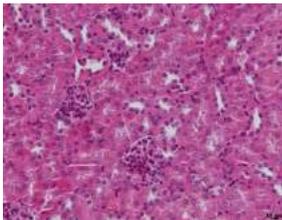
De modo semelhante ao observado na avaliação dos fígados, o fluconazol também demonstrou ser tóxico para este órgão. Macroscopicamente, os rins dos animais do grupo **FLU** apresentaram regiões periféricas enegrecidas, sugerindo a presença de áreas de necrose (Apêndice C). Também, as alterações microscópicas foram mais frequentes neste grupo, em relação aos demais, com médias de 79,4% de campos apresentando micro-hemorragias e 89,6% apresentando perda do espaço de Bowman (Tabela 6 e Apêndice F). Raramente, estas alterações foram detectadas nos rins dos animais que receberam a administração de *P. granatum* (2,1% e 1%, respectivamente, no grupo **Pg300**).

Tabela 5 - Valores percentuais referentes a frequência de alterações microscópicas observadas nos fígados de camundongos BALB/c saudáveis. Animais saudáveis receberam por gavagem, durante 7 dias, 300 e 150 mg/mL (grupos Pg300 e Pg150, respectivamente) ou 100 mg/mL de fluconazol (grupo FLU). Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (CTRL). A avaliação da presença de alterações microscópicas foi feita por meio de microscopia óptica de luz, no aumento de 40x, em 3 cortes microscópicos (100 campos/corte) de cada fígado, corados em Hematoxilina/Eosina (H&E). Acima, à esquerda, imagem macroscópica do fígado; à direita, imagens representativas das diferentes alterações microscópicas (as imagens podem ser melhor visualizadas nos Apêndice D e E). Para cada animal, foi obtida uma média percentual da frequência em 300 campos microscópicos; na sequência, obteve-se a média final do grupo (n=3 animais, totalizando 900 campos microscópicos), que representa o valor percentual de área comprometida do órgão, com relação a cada uma das alterações microscópicas. A ausência de alterações foi representada por (-----) na Tabela. Os resultados foram apresentados por meio dos valores percentuais médios da frequência de cada alteração microscópica ± desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério *post-hoc* de Tukey HSD. * p<0,05 vs CTRL.

		VALORES PERCENTUAIS				
FÍGADO		Vasos Hiperêmicos	Micro-hemorragia	Alteração Hidrópica	Esteatose Microvesicular	Esteatose Macrovesicular
CTRL		-----	-----	-----	-----	-----
FLU		49 ± 1,13*	66,3 ± 12,02*	70,2 ± 2,07*	93,7 ± 27,3*	98,3 ± 2,1*
Pg150		8 ± 1,8	6,9 ± 13,7	-----	-----	-----
Pg300		12,1 ± 0,398	11,1 ± 9,07	-----	-----	-----

5 Resultados e Discussão

Tabela 6 - Valores percentuais referentes a frequência de alterações microscópicas observadas nos rins de camundongos BALB/c saudáveis. Animais saudáveis receberam por gavagem, durante 7 dias, 300 e 150 mg/mL (grupos Pg300 e Pg150, respectivamente) ou 100 mg/mL de fluconazol (grupo FLU). Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (CTRL). A avaliação da presença de alterações microscópicas foi feita por meio de microscopia óptica de luz, no aumento de 40x, em 3 cortes microscópicos (100 campos/corte) dos rins corados em Hematoxilina/Eosina (H&E). Acima, à esquerda, imagem macroscópica dos rins; à direita, imagens representativas das diferentes alterações microscópicas (as imagens podem ser melhor visualizadas no Apêndice F). Para cada animal, foi obtida uma média percentual da frequência em 300 campos microscópicos; na sequência, obteve-se a média final do grupo (n=3 animais, totalizando 900 campos microscópicos), que representa o valor percentual de área comprometida do órgão, com relação a cada uma das alterações microscópicas. A ausência de alterações foi representada por (-----) na Tabela. Os resultados foram apresentados por meio dos valores percentuais médios da frequência de cada alteração microscópica \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ vs CTRL.

RINS	VALORES PERCENTUAIS	
	Micro-hemorragia	Perda/diminuição do espaço de Bowman
		
CTRL	-----	-----
FLU	79,4 \pm 3,67*	89,6 \pm 3,80*
Pg150	-----	-----
Pg300	2,1 \pm 0,250	1 \pm 2,34

C e D) Avaliação da atividade antimicrobiana de *P. granatum* após 7 dias de administração diária por gavagem, em camundongos BALB/c com candidose oral localizada estabelecida experimentalmente

3.6 Cinética corporal e percentual (%) da perda de peso (final versus inicial)

Após a mensuração do peso de todos os animais, foi possível avaliar a cinética e o percentual de perda de peso entre os diferentes grupos (CTRL, IMS, IMS/Ca, IMS/Ca+7d, IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300) do início (dia

5 Resultados e Discussão

0) até o final do experimento (dia 8 para **IMS/Ca** e dia 15 para os demais grupos). Considerando a cinética e a média do peso inicial (23,2 g), após a primeira imunossupressão (dia 0) seguida da infecção por *C. albicans* (dia 1), os animais (**IMS/Ca**, **IMS/Ca+7d**, **IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**) perderam peso abruptamente, o que não foi observado, entre os dias experimentais 1 e 2, nos animais apenas imunossuprimidos (**IMS**). Após o segundo dia experimental, a perda de peso foi menor, apresentando um leve ganho de peso entre os dias 3 e 4. No momento da segunda imunossupressão (dia 4), houve novamente uma perda de peso nos animais infectados (**IMS/Ca**, **IMS/Ca+7d**, **IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**) até o sétimo dia pós-infecção (Figura 7A). Assim, foi possível estabelecer que esta redução de massa corpórea deve-se ao estabelecimento do modelo experimental (dia 0 ao dia 7), sendo mais agravante nos animais infectados.

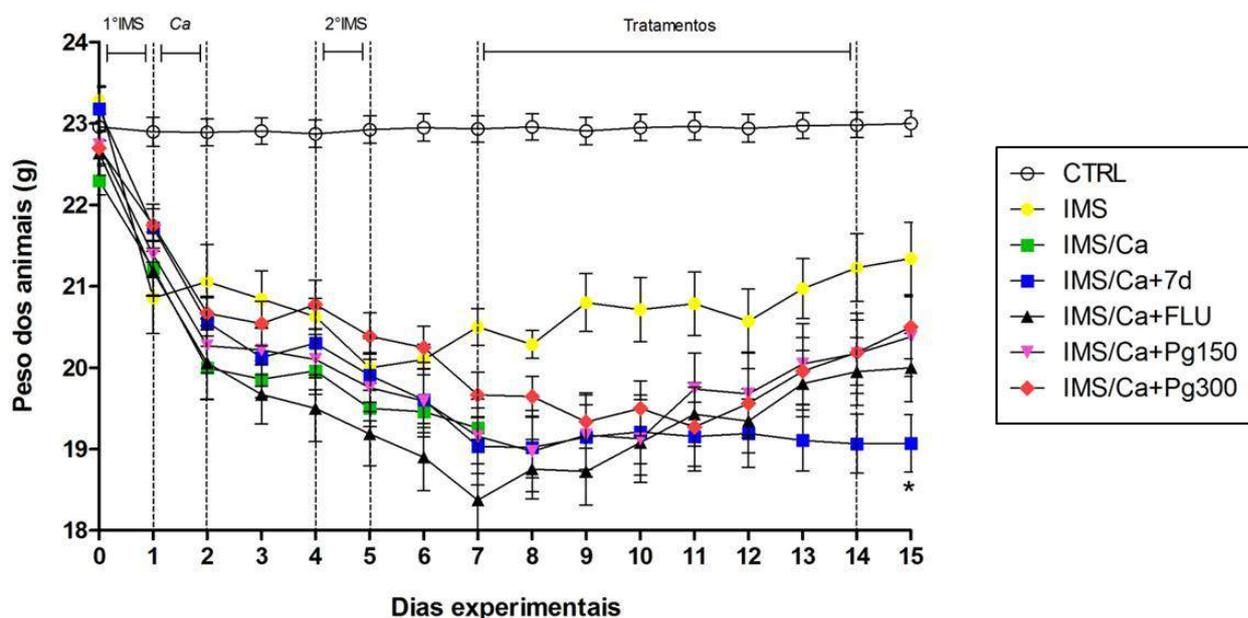
A partir do dia 7 até o final do experimento (dia 15), os animais infectados e não tratados (**IMS/Ca+7d**) não ganharam peso, mantendo-se com uma média de 19,2 g, até o final do experimento. Como esperado, os animais não infectados (**IMS**) recuperaram parte do seu peso inicial, atingindo uma média de 21,34 g. Recuperação do peso corporal também foi observada entre os animais tratados com fluconazol ou *P. granatum* tende parcialmente a se restabelecer (**IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**), porém atingindo médias inferiores ao grupo **IMS** (Figura 7A).

Considerando a análise do percentual de perda de peso inicial *versus* final, os animais do grupo **IMS** perderam menos peso ao final do experimento (-7,75%) em relação aos demais grupos submetidos ao modelo experimental (-13,68%, -21,18%, -15,66%, -11% e -11,85% respectivamente a **IMS/Ca**, **IMS/Ca+7d**, **IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**). Os animais infectados e não tratados (**IMS/Ca+7d**) mostraram o maior percentual de perda de peso (-21,18%), diferenciando estatisticamente de todos os outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 7B).

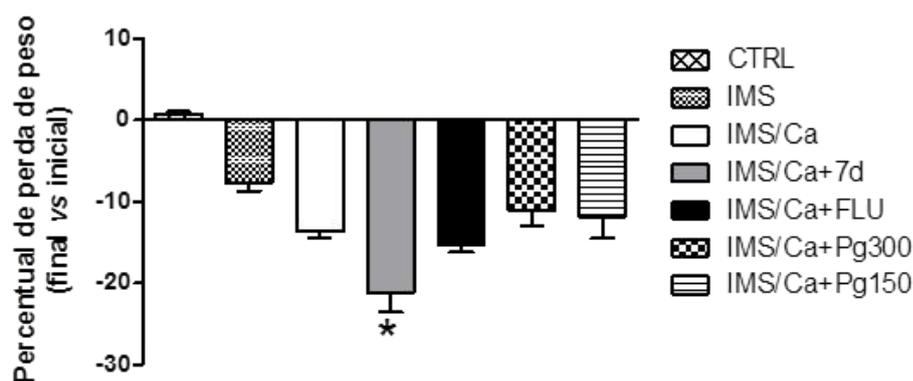
5 Resultados e Discussão

Figura 7 - Cinética do peso corporal (A) e percentual da perda de peso (B) de camundongos BALB/c pós-tratamento da infecção por *Candida albicans*. Do início do experimento (dia experimental 0) até a eutanásia (dia experimental 8 ou 15), os animais dos grupos CTRL, IMS, IMS/Ca, IMS/Ca+7d, IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300 foram pesados diariamente para a obtenção dos valores médios, resultando em uma cinética do peso corporal, representada por diferentes linhas, de acordo com os grupos. Para avaliar o percentual da perda de peso corporal, a média do peso inicial foi considerada como 100% e, na sequência, calculou-se o percentual correspondente a média do peso final. Este percentual foi subtraído de 100 e representado por meio de valores negativos. Foram realizados 3 experimentos independentes (n=15 por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critérios (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. Em (A) e (B), todos os grupos experimentais diferiram do grupo CTRL. Em (A), * $p < 0,05$ em relação 15° dia experimental vs o primeiro dia (dia 0) em IMS ou IMS/Ca ou IMS/Ca+FLU ou IMS/Ca+Pg150 ou IMS/Ca+Pg300. Em (B), * $p < 0,05$ vs IMS ou IMS/Ca ou IMS/Ca+FLU ou IMS/Ca+Pg150 ou IMS/Ca+Pg300.

A)



B)

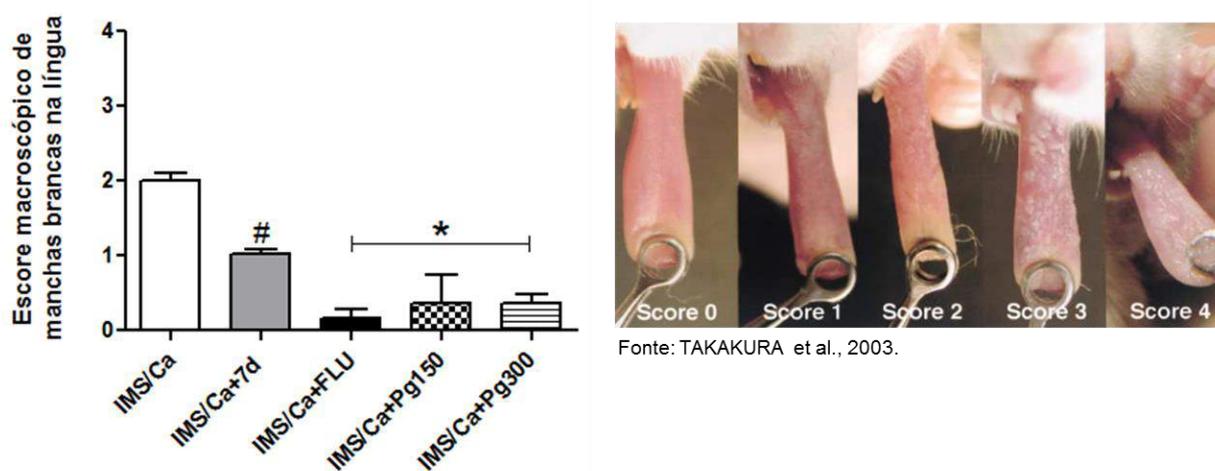


3.7 Avaliação macroscópica da presença de placas brancas no dorso da língua dos animais

Considerando a área (mm^2) da extensão total, o dorso da língua dos animais infectados e que receberam tratamento com fluconazol (**IMS/Ca+FLU**) ou *P. granatum*, independentemente da concentração (**IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**), apresentou menor percentual de áreas com placas micelias, e consequentemente menores médias de escores (0.12, 0.36 e 0.36), com relação aos controles da infecção (**IMS/Ca** – escore 2 e **IMS/Ca+7d** – escore 1; $p < 0,05$).

Vale ressaltar que as placas brancas e/ou pseudomembranas reduziram significativamente ao longo do tempo, nos animais não tratados, como pode ser observado ao se comparar os grupos **IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**. Porém, a redução dessas áreas foi significativamente maior quando os animais foram tratados com fluconazol ou *P. granatum*, independentemente da concentração testada (Figura 8).

Figura 8 - Escore clínico (macroscópico) estabelecido, considerando-se a área total com presença de placas brancas e/ou pseudomembranas no dorso da língua de animais BALB/c dos diferentes grupos (IMS/Ca, IMS/Ca+7d, IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Foi estabelecida a porcentagem da área (mm^2) por meio dos valores em pixels gerados pelo programa Image J®, após documentação fotográfica dos dorsos das línguas. Na sequência, estes valores percentuais foram classificados de acordo com os escores clínicos pré-estabelecidos de 0 a 4 de acordo com a Tabela 1. Na esquerda, a média do escore clínico para cada um dos grupos. Na direita, imagens representativas das características macroscópicas do dorso da língua dos animais, onde (0) representa a ausência de placas brancas; (1) placas brancas em menos de 20% da extensão total do dorso da língua; (2) placas brancas em mais de 20% e menos de 90%; (3) placas brancas em mais de 91%; e (4) placas brancas e/ou pseudomembranas em mais de 91%, baseado no modelo experimental de Takakura et al. (2003). Foram realizados 3 experimentos independentes ($n=15$ por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ vs IMS/Ca e IMS/Ca+7d e # $p < 0,05$ vs IMS/Ca.



Fonte: TAKAKURA et al., 2003.

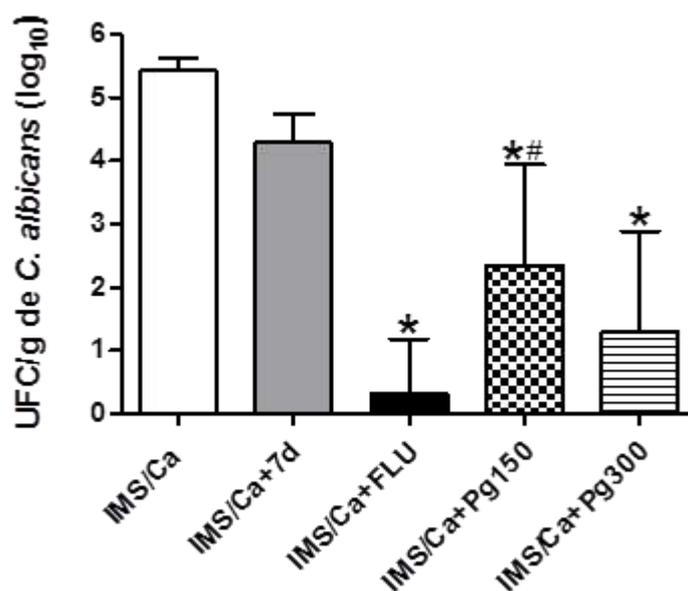
5 Resultados e Discussão

3.8 Avaliação microbiológica do desenvolvimento de *C. albicans* no dorso da língua dos animais

Nos grupos controle da infecção (**IMS/Ca**) e permanência da doença (**IMS/Ca+7d**), foram quantificados os maiores valores de UFC/g ($5,42\log_{10}$ e $4,28\log_{10}$, respectivamente), os quais diferiram estatisticamente com relação aos grupos tratados (**IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**). Ainda, foi possível observar uma ligeira redução do número de UFCs ao longo do tempo naqueles animais que não receberam tratamento (**IMS/Ca versus IMS/Ca+7d**).

Como esperado, a menor quantificação de UFCs no dorso da língua ($0,32\log_{10}$) foi obtida naqueles animais que receberam o tratamento com fluconazol (**IMS/Ca+FLU**). De modo interessante, a quantificação de UFCs em animais que receberam o tratamento com Pg300 (**IMS/Ca+Pg300**) foi semelhante ($1,30\log_{10}$) a do grupo **IMS/Ca+FLU**. Em relação ao grupo **IMS/Ca+Pg150**, foram contabilizadas mais UFCs ($2,35\log_{10}$) do que no grupo que recebeu o tratamento com fluconazol (Figura 9).

Figura 9 - Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias de *Candida albicans* por grama de tecido (UFC/g), após a maceração de fragmento de língua obtida de animais BALB/c dos diferentes grupos (IMS/Ca, IMS/Ca+7d, IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Foram realizados 3 experimentos independentes (n=15 por grupo). Os resultados foram transformados logaritmicamente (\log_{10}) e apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ vs IMS/Ca e IMS/Ca+7d e # $p < 0,05$ vs IMS/Ca+FLU.



3.9 Avaliação microscópica do dorso da língua dos animais infectados e tratados com *P. granatum* e fluconazol

De acordo com o escore referente a quantificação de leveduras/hifas de *C. albicans* no dorso da língua dos animais infectados e tratados, os grupos controle da infecção (**IMS/Ca**) e permanência da doença (**IMS/Ca+7d**) foram os que apresentaram os maiores escores (4 e 3, respectivamente), sendo possível contabilizar, em média, mais de 50 células fúngicas por campo; autenticando o modelo experimental *in vivo* de candidose oral desenvolvido por Takakura et al. (2003). Embora sem diferença estatisticamente significativa, houve uma redução no número de leveduras/hifas no dorso da língua, passados os 7 dias de infecção (**IMS/Ca versus IMS/Ca+7d**).

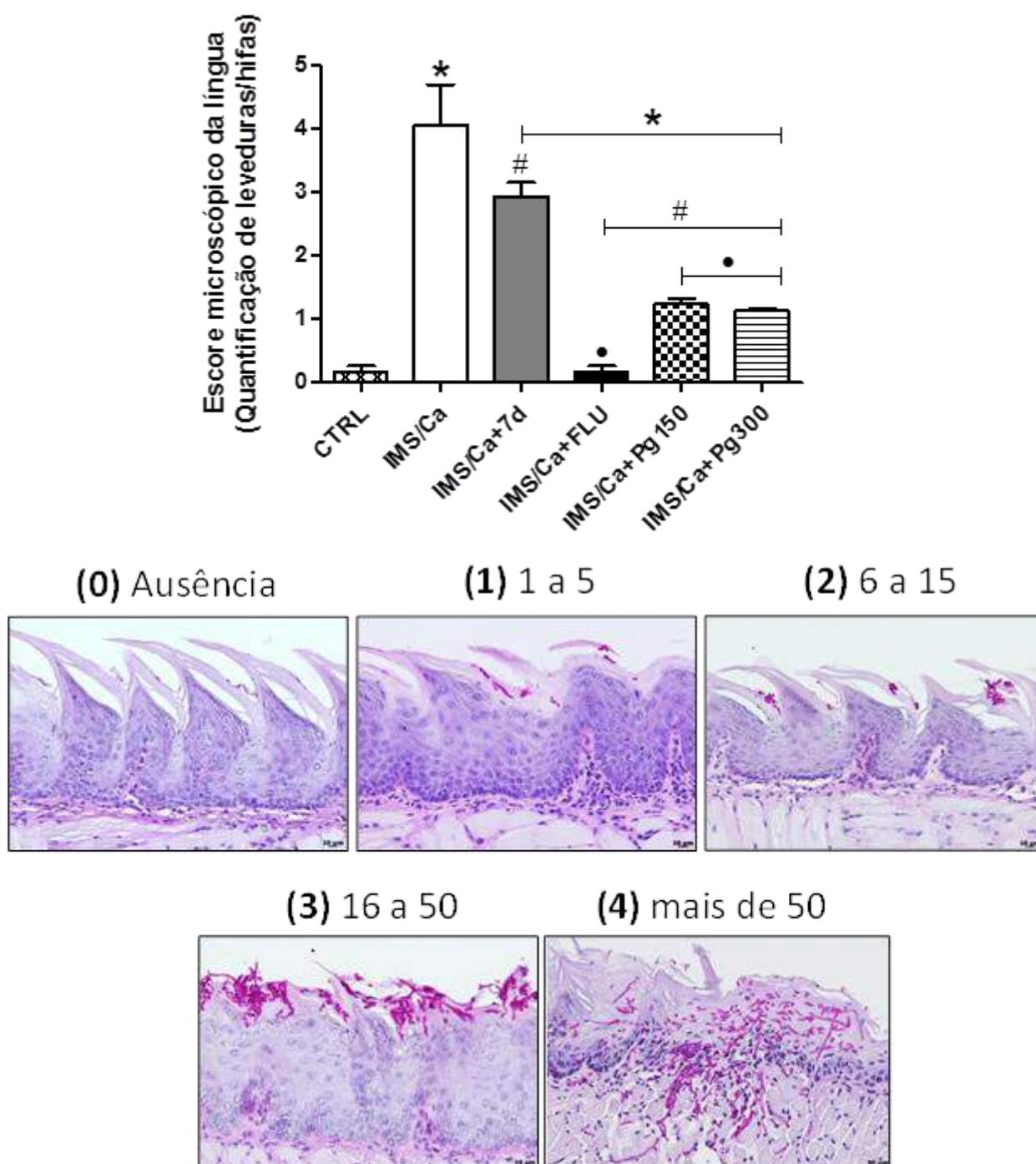
Em alguns campos dos cortes microscópicos das línguas dos animais do grupo **IMS/Ca**, alterações epiteliais como hiperplasia, desorganização da camada de células basais, desaparecimento total ou parcial da arquitetura das papilas filiformes e hiperqueratose foram encontradas. Além disso, foi observado que algumas hifas, já aderidas, invadiram a barreira epitelial e atingiram o tecido conjuntivo subjacente, sinal indicativo de patogenicidade de *C. albicans*.

Como esperado, nos animais que receberam tratamento com fluconazol (**IMS/Ca+FLU**), bem como nos animais saudáveis (**CTRL**), não havia presença de leveduras ou hifas de *C. albicans* (escore 0) na superfície das línguas.

De modo interessante e de grande relevância para este trabalho, o tratamento com *P. granatum*, independentemente da concentração (**IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**) resultou em redução dos escores de quantificação de células fúngicas no dorso da língua, em relação aos controles infectados, revelando uma média de apenas 4/5 leveduras/hifas (escore 1) por campo microscópico. Além disso, nos grupos tratados (**IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**), nenhuma alteração histopatológica foi observada como em **IMS/Ca** (Figura 10).

5 Resultados e Discussão

Figura 10 - Escore microscópico referente à quantificação de leveduras/hifas de *Candida albicans* no dorso da língua de camundongos BALB/c nos diferentes grupos (CTRL, IMS/Ca, IMS/Ca+7d, IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Abaixo, imagens representativas do escore microscópico estabelecido por Junqueira et al. (2005), ou seja, (0): nenhuma levedura/hifa; (1): 1 a 5 leveduras/hifas; (2): 6 a 15 de leveduras/hifas; (3): 16 a 50 leveduras/hifas; e (4): mais de 50 leveduras/hifas de acordo com Junqueira et al. (2005). As lâminas foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum (aumento de 40x). As imagens podem ser melhor visualizadas no Apêndice G. Foram realizados 3 experimentos independentes (n=15 por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. Símbolos iguais representam $p < 0,05$. O grupo CTRL diferiu dos demais grupos avaliados ($p < 0,05$).



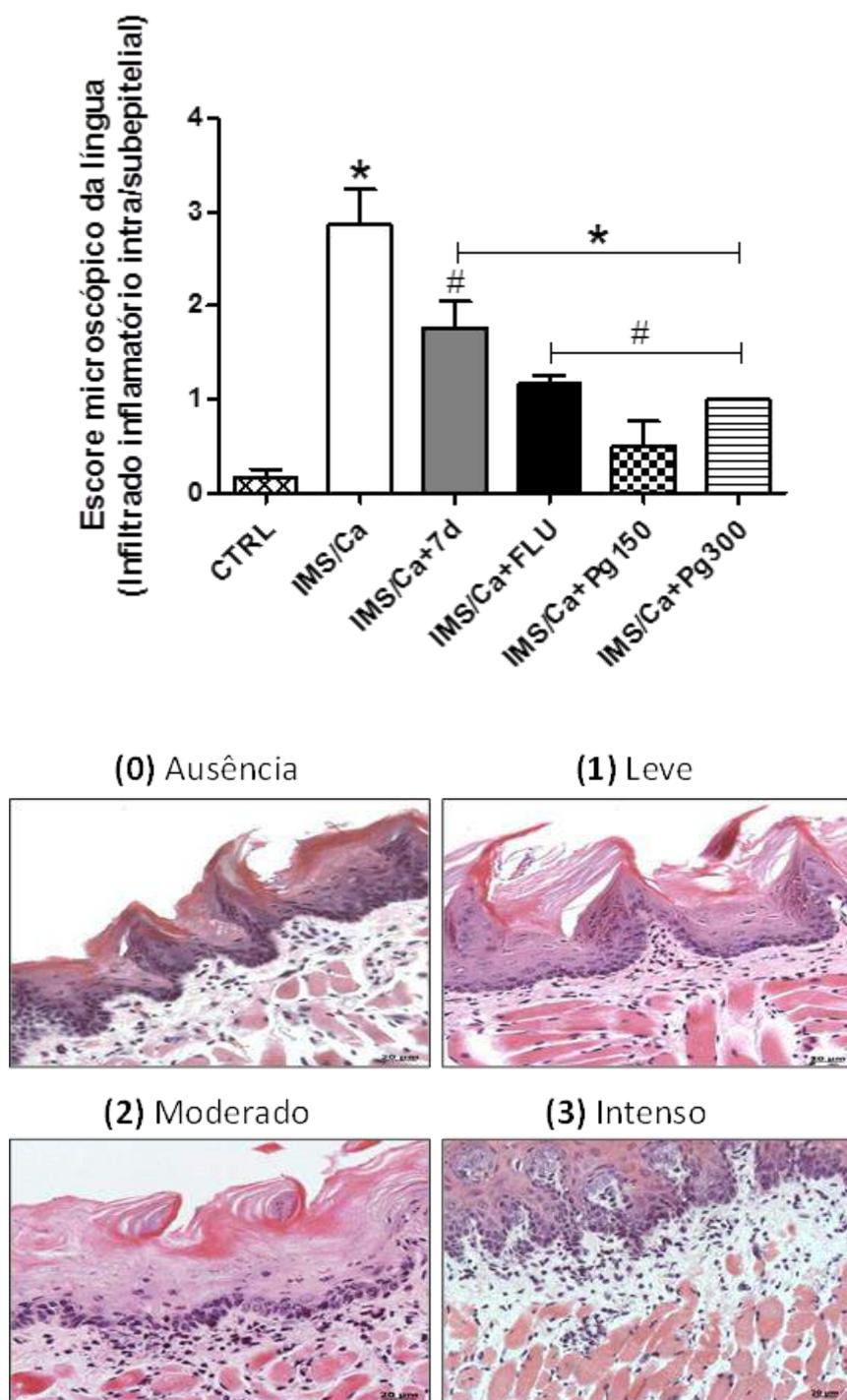
5 Resultados e Discussão

Os resultados referentes a intensidade do infiltrado inflamatório intraepitelial/subepitelial estão em concordância com aqueles obtidos a partir do escore referente a quantificação de leveduras/hifas. Como esperado, o infiltrado inflamatório intraepitelial/subepitelial estava mais evidente nos grupos que apresentaram maior número de leveduras/hifas (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**). De fato, o modelo experimental de candidose oral, utilizado no presente trabalho, resultou em um processo inflamatório caracterizado por um infiltrado predominantemente mononuclear intenso (escore 3) com localização intra e subepitelial (**IMS/Ca**), que ao longo do tempo experimental, torna-se moderado (escore 2) e apenas subepitelial (**IMS/Ca+7d**), diferentemente dos animais do grupo controle (**CTRL**), que não apresentaram resposta inflamatória decorrente da ausência de *C. albicans* nestes animais (Figura 11).

Já em relação ao tratamento da candidose oral com fluconazol (**IMS/Ca+FLU**) ou *P. granatum* (**IMS/Ca+Pg150** ou **IMS/Ca+Pg300**), o infiltrado foi considerado leve (escore 1); apenas algumas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo subjacente foram observadas. Estes dados corroboram aqueles obtidos previamente neste trabalho por meio das outras análises realizadas, sugerindo fortemente uma regressão da candidose oral induzida nos animais após o tratamento com administrações diárias, via gavagem, do extrato de *P. granatum*, de modo similar ao tratamento convencional utilizando o medicamento sintético fluconazol.

5 Resultados e Discussão

Figura 11 - Escore microscópico referente à intensidade do infiltrado inflamatório intra/subepitelial no dorso da língua de camundongos BALB/c nos diferentes grupos (CTRL, IMS/Ca, IMS/Ca+7d, IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Abaixo, imagens representativas do escore microscópico de acordo com a intensidade das células inflamatórias: (0) ausência; (1) leve; (2) moderado; e (3) intenso. As lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina (H&E) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum (aumento de 40x). As imagens podem ser melhor visualizadas no Apêndice H. Foram realizados 3 experimentos independentes (n=15 por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. Símbolos iguais representam $p < 0,05$. O grupo CTRL diferiu dos demais grupos avaliados ($p < 0,05$).



3.10 Análise das alterações histopatológicas presentes no baço, fígado e rins dos animais infectados e tratados

Durante a análise das alterações presentes no baço, foi observado que animais do grupo **IMS** apresentaram redução de 27,7% do tamanho do baço, 3 dias após as duas injeções de prednisolona, em relação ao grupo controle (**CTRL**). E não foram observadas alterações morfológicas nestes órgãos nos grupos infectados ou infectados e tratados *versus* grupo controle (dados não mostrados).

FÍGADO

Em relação ao estabelecimento da infecção (**IMS/Ca**) e sua duração (**IMS/Ca+7d**), neste modelo experimental, macroscopicamente, foi possível observar a coloração amarelada apenas em algumas regiões dos lóbulos hepáticos em **IMS/Ca**. Todas as alterações avaliadas foram observadas em ambos os grupos, embora a frequência de campos positivos para estas alterações tenha sido menor no grupo **IMS/Ca+7d** (9%, 5.2%, 12%, 12.8% e 8%, respectivamente às alterações) (Tabela 7).

De modo similar àquele encontrado na análise toxicológica de animais saudáveis (ver Tabela 5), a maior quantidade de alterações, seguida da maior frequência de campos positivos, foi encontrada no grupo infectado e tratado com fluconazol (**IMS/Ca+FLU**); diferindo, conseqüentemente, de todos os demais grupos ($p < 0,001$), incluindo os controles da infecção. No grupo **IMS/Ca+FLU**, houve a presença de esteatose macrovesicular, em 100% dos campos avaliados, de esteatose microvesicular, em 95%, e de micro-hemorragias em 71%.

Por outro lado, os menores valores percentuais de alterações microscópicas foram encontrados em animais infectados e que receberam o tratamento com as diferentes concentrações de *P. granatum* (**IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**). É importante ressaltar que os valores percentuais relacionados a presença de vasos hiperêmicos, micro-hemorragias e alteração hidrópica foram menores no grupo **IMS/Ca+Pg150** do que **IMS/Ca+Pg300**. Tais valores foram estatisticamente menores que aqueles observados no grupo **IMS/Ca+7d**, exceto a micro-hemorragia. Nos animais tratados com *P. granatum*, não foi observada esteatose micro ou macrovesicular. Estes resultados demonstram a ação protetora do extrato, ao longo do tempo, após 7 dias de infecção (Tabela 7).

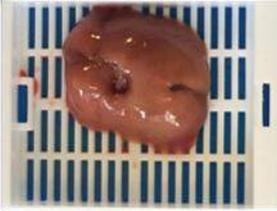
RINS

Seguindo o mesmo perfil observado na análise hepática, nos rins dos animais controles da infecção foi verificada a presença das duas alterações, embora o número de campos positivos no grupo **IMS/Ca** tenha sido maior do que no grupo **IMS/Ca+7d**, os valores percentuais de ambos os controles foram significativamente menores que no grupo **IMS/Ca+FLU** ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Regiões periféricas enegrecidas, sugerindo a presença de áreas necróticas, além de tumefação tecidual, foram características macroscópicas observadas no grupo **IMS/Ca+FLU** (Apêndice I). Ainda, os rins destes animais apresentaram a maior quantidade de alterações avaliadas (micro-hemorragia ou perda/diminuição do espaço de Bowman) seguida do maior número de campos com presença de micro-hemorragias (31,3%) e da perda/diminuição do espaço de Bowman (45%) em relação a todos os demais grupos. Em alguns casos, foi possível observar epitélio simples cúbico associado ou com uma grande área negativa ou com a presença de infiltrado inflamatório no interior do órgão, características compatíveis com cisto renal simples (GARFIELD; LESLIE, 2020) (Apêndice J). Todavia, análises mais específicas acerca desta alteração patológica devem ser realizadas para confirmação deste diagnóstico.

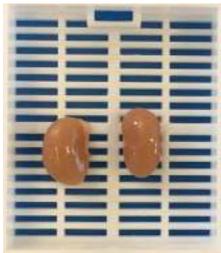
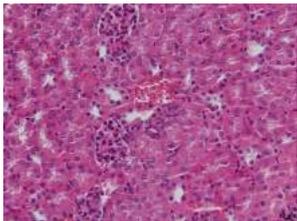
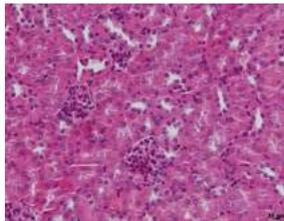
Novamente, de forma positiva e colaborativa para este estudo, nenhuma alteração foi observada nos animais infectados e tratados com as administrações diárias das suspensões de *P. granatum*, independentemente da concentração (**IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**).

Tabela 7 - Valores percentuais referentes a frequência de alterações microscópicas observadas nos fígados de camundongos BALB/c infectados e tratados. Animais foram infectados (IMS/Ca e IMS/Ca+7d), e animais foram infectados e tratados com fluconazol (IMS/Ca+FLU) ou com *P. granatum* (IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (CTRL). A avaliação da presença de alterações microscópicas foi feita por meio de microscopia óptica de luz, no aumento de 40x, em 3 cortes microscópicos (100 campos/corte) de cada fígado, corados em Hematoxilina/Eosina (H&E). Acima, à esquerda, imagem macroscópica do fígado; à direita, imagens representativas das diferentes alterações microscópicas (as imagens podem ser melhor visualizadas nos Apêndices D e E). Para cada animal, foi obtida uma média percentual da frequência em 300 campos microscópicos; na sequência, obteve-se a média final do grupo (n=3 animais, totalizando 900 campos microscópicos), que representa o valor percentual de área comprometida do órgão, com relação a cada uma das alterações microscópicas. A ausência de alterações foi representada por (-----) na Tabela. Os resultados foram apresentados por meio dos valores percentuais médios da frequência de cada alteração microscópica ± desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * p<0,05 vs CTRL, # p<0,05 vs IMS/Ca e ● p<0,05 vs IMS/Ca+7d.

FÍGADO	VALORES PERCENTUAIS				
	Vasos Hiperêmicos	Micro-hemorragia	Alteração Hidrópica	Esteatose Microvesicular	Esteatose Macrovesicular
					
CTRL	-----	-----	-----	-----	-----
IMS/Ca	13 ± 2,33*	24 ± 6,701*	22,4 ± 11,4*	27,3 ± 7,3*	18,3 ± 2,1*
IMS/Ca+7d	9 ± 0,412*	5,2 ± 3,8*	12 ± 1,7*	12,8 ± 2,35*	8 ± 0,802*
IMS/Ca+FLU	62,3 ± 1*	71 ± 19,4*	62 ± 1,4*	95 ± 1,17*	100 ± 1,56*
IMS/Ca+Pg150	2,1 ± 5,4#●	1,9 ± 4,1#	1 ± 5,67#●	-----	-----
IMS/Ca+Pg300	6,4 ± 2,1#	3 ± 8,3#	5 ± 1,90#	-----	-----

5 Resultados e Discussão

Tabela 8 - Valores percentuais referentes a frequência de alterações microscópicas observadas nos rins de camundongos BALB/c infectados e tratados. Animais foram infectados (IMS/Ca e IMS/Ca+7d), e animais foram infectados e tratados com fluconazol (IMS/Ca+FLU) ou com *P. granatum* (IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (CTRL). A avaliação da presença de alterações microscópicas foi feita por meio de microscopia óptica de luz, no aumento de 40x, em 3 cortes microscópicos (100 campos/corte) dos rins corados em Hematoxilina/Eosina (H&E). Acima, à esquerda, imagem macroscópica dos rins; à direita, imagens representativas das diferentes alterações microscópicas (as imagens podem ser melhor visualizadas no Apêndice F). Para cada animal, foi obtida uma média percentual da frequência em 300 campos microscópicos; na sequência, obteve-se a média final do grupo (n=3 animais, totalizando 900 campos microscópicos), que representa o valor percentual de área comprometida do órgão, com relação a cada uma das alterações microscópicas. A ausência de alterações foi representada por (-----) na Tabela. Os resultados foram apresentados por meio dos valores percentuais médios da frequência de cada alteração microscópica \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ vs CTRL.

RINS	VALORES PERCENTUAIS	
	Micro-hemorragia	Perda/diminuição do espaço de Bowman
		
CTRL	-----	-----
IMS/Ca	4 \pm 3,1	6 \pm 3,80
IMS/Ca+7d	1 \pm 0,682	2,3 \pm 1,32
IMS/Ca+FLU	31,3 \pm 9,2*	45 \pm 0,250*
IMS/Ca+Pg150	-----	-----
IMS/Ca+Pg300	-----	-----

E) Avaliação da atividade imunomodulatória do extrato hidroalcoólico das cacas de *P. granatum* após 7 dias de administração diária por gavagem, em camundongos BALB/c com candidose oral localizada estabelecida experimentalmente

3.11 Avaliação da imunomodulação do extrato de *P. granatum* pós-tratamento da infecção

A elaboração da resposta imune após as administrações com o extrato de *P. granatum* em animais infectados por *C. albicans* foi observada sistemicamente, no órgão linfóide mais próximo do local onde foi induzida a infecção (linfonodos cervicais) e localmente (*in situ*), na língua dos animais. Para melhor compreensão, foram realizadas releituras dos resultados deste ensaio por meio de esquemas gráficos desenvolvidos com o intuito de visualizar o perfil da resposta inflamatória através do aumento ou redução, respectivamente (supra ↑ e subregulação ↓), na produção de citocinas/quimiocinas no momento do estabelecimento da infecção por *C. albicans* (**IMS/Ca**) ou após 14 dias (**IMS/Ca+7d**) em relação aos animais saudáveis (**CTRL**), ou em relação aos diferentes tratamentos (**IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**).

LINFONODOS CERVICAIS

Antes da maceração para análise da secreção das citocinas, os linfonodos cervicais foram pesados. Estes órgãos oriundos dos grupos **IMS/Ca**, **IMS/Ca+FLU** e **IMS/Ca+Pg300** estavam mais pesados do que os linfonodos do grupo controle (**CTRL**) ($p < 0,001$), enquanto que o peso dos linfonodos dos animais do grupo **IMS/Ca+7d** e **IMS/Ca+Pg150** foram semelhantes aos do grupo **CTRL** (Figura 12).

Com relação a resposta imune sistêmica, os animais infectados e eutanasiados após 7 dias de infecção (**IMS/Ca**) apresentaram, em seus linfonodos, a aumento da produção de IL-12p70, IL-10, IL-17A, IL-22, MIP-1 α , TGF- β 1 e TGF- β 3, em relação ao controle (**CTRL** – animais não infectados). Em um espaço de tempo de mais 7 dias (grupo **IMS/Ca+7d**), apenas a IL-12p70 se mantém suprarregulada, comparativamente ao **CTRL**; demonstrando uma recuperação do estado inflamatório desses animais com o tempo, considerando os linfonodos.

Pós-infecção, comparando-se 14 com 7 dias, algumas citocinas,

5 Resultados e Discussão

suprereguladas aos 7 dias (vs **CTRL**), ou seja IL-12p70, IL-22 e MIP-1 α , tornam-se subreguladas. Ainda, a redução da produção de IL-1 β e IFN- γ foi observada apenas no período posterior da infecção, comparando-se com 7 dias pós-infecção (Figura 13), corroborando a ideia de restabelecimento dos níveis basais destas citocinas, ao longo do tempo sem uma nova aplicação fúngica no dorso da língua.

Após os tratamentos com fluconazol ou *P. granatum*, iniciados 7 dias pós-infecção e mantidos por mais 7 dias, observou-se também a supreregulação de citocinas que foram subreguladas aos 7 dias pós-infecção (**IMS/Ca vs CTRL**) (Figura 14). Além disso, o perfil de citocinas/quimiocinas supra ou subreguladas nos grupos **IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300** foi semelhante àquele observado nos animais infectados, porém não tratados, no período mais tardio da doença induzida (grupo **IMS/Ca+7d**), com exceção da citocina IL-10 (**IMS/Ca+Pg300 vs IMS/Ca+7d**) (Figura 18F).

Já que essa inversão da produção de citocinas/quimiocinas foi observada nos animais não tratados (ver Figura 13), possivelmente esse novo perfil imune sistêmico gerado nos linfonodos cervicais não é resultado dos tratamentos e sim inerente ao transcorrer do tempo no modelo experimental utilizado.

LÍNGUA

Os animais 7 dias pós-infecção (**IMS/Ca**) por *C. albicans* no dorso da língua apresentaram aumento da produção IL-1 β , IL-4, IL-17A, IL-17E, IL-17F, IFN- γ e TNF- α , em comparação ao grupo controle (**CTRL**). Esse padrão de supreregulação não foi observado 14 dias pós-infecção (**IMS/Ca+7d**), período este no qual havia apenas a supreregulação de IL-22 e TGF- β 3, sugerindo a redução do processo inflamatório local, com o tempo e sem uma nova aplicação do inóculo de *C. albicans*. Corroborando esse raciocínio, todas as citocinas/quimiocinas suprereguladas em **IMS/Ca** (vs **CTRL**) apresentaram-se subreguladas após 7 dias (**IMS/Ca+7d**), como observado, sistemicamente, nos linfonodos cervicais dos animais (Figura 15).

Na presença dos tratamentos, houve uma inversão na produção de citocinas/quimiocinas, as quais estavam suprereguladas 7 dias pós-infecção (**IMS/Ca vs CTRL**) e tornaram-se subreguladas 7 dias depois e sob tratamento (**IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300 vs IMS/Ca**). Mais uma vez, como realçado na análise dos linfonodos cervicais, essa inversão foi observada nos

5 Resultados e Discussão

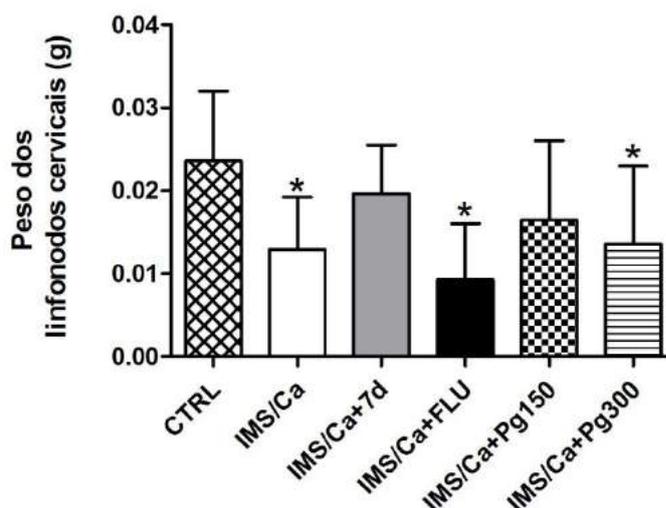
animais não tratados (ver Figura 15), descartando a influência dos tratamentos na elaboração deste perfil de resposta imune e reforçando a ideia de restabelecimento imunológico para níveis basais dessas citocinas/quimiocinas como consequência do passar do tempo, de 7 para 14 dias.

Por outro lado, os tratamentos com *P. granatum* resultaram em aumento da produção das citocinas IL-10 e TGF- β 1 (**IMS/Ca+Pg150**) e, IL-10, MIP-1 α , TGF- β 1 e TGF- β 2 (**IMS/Ca+Pg300**), comparado aos animais infectados e não tratados (**IMS/Ca**) e com os animais infectados e não tratados, no período mais tardio de observação do presente modelo experimental (**IMS/Ca+7d**), com exceção da citocina TGF- β 2 para este último grupo. Em paralelo, uma supregulação de IL-23 foi observada nos animais infectados e tratados com fluconazol (**IMS/Ca+FLU** vs **IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**) (Figura 16 e Figura 17).

Já que esse perfil de resposta imune não foi detectado nas comparações realizadas com os animais infectados e não tratados, no período mais tardio de observação do presente modelo experimental, ou seja, **IMS/Ca+7d** vs **IMS/Ca** ou, **IMS/Ca+7d** vs **CTRL**, o aumento da produção destas citocinas/quimiocinas esta relacionado diretamente aos respectivos tratamentos.

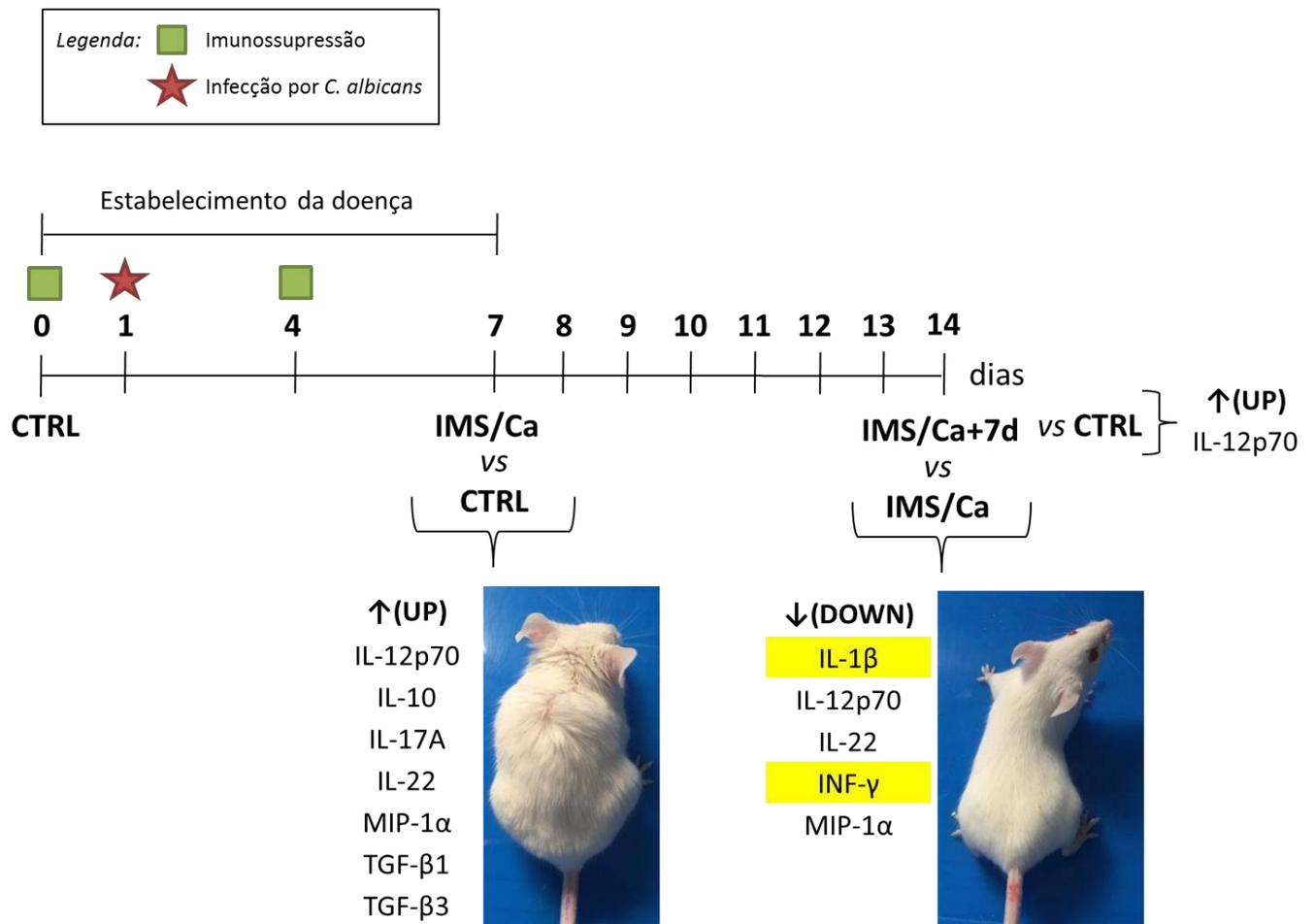
Vale ressaltar ainda que uma superexpressão de IL-10 e MIP-1 α também foi verificada ao compararmos os animais com 14 dias pós-infeção, tratados ou não (**IMS/Ca+7d** vs **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**) (Figura 17).

Figura 12 - Peso dos linfonodos cervicais de camundongos BALB/c dos diferentes grupos (CTRL, IMS/Ca, IMS/Ca+7d, IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Após eutanásia dos animais, os linfonodos cervicais (2 a 3 pares) foram coletados cirurgicamente e o peso (g) foi mensurado. Foram realizados 2 experimentos independentes (n=10 por grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ vs CTRL.



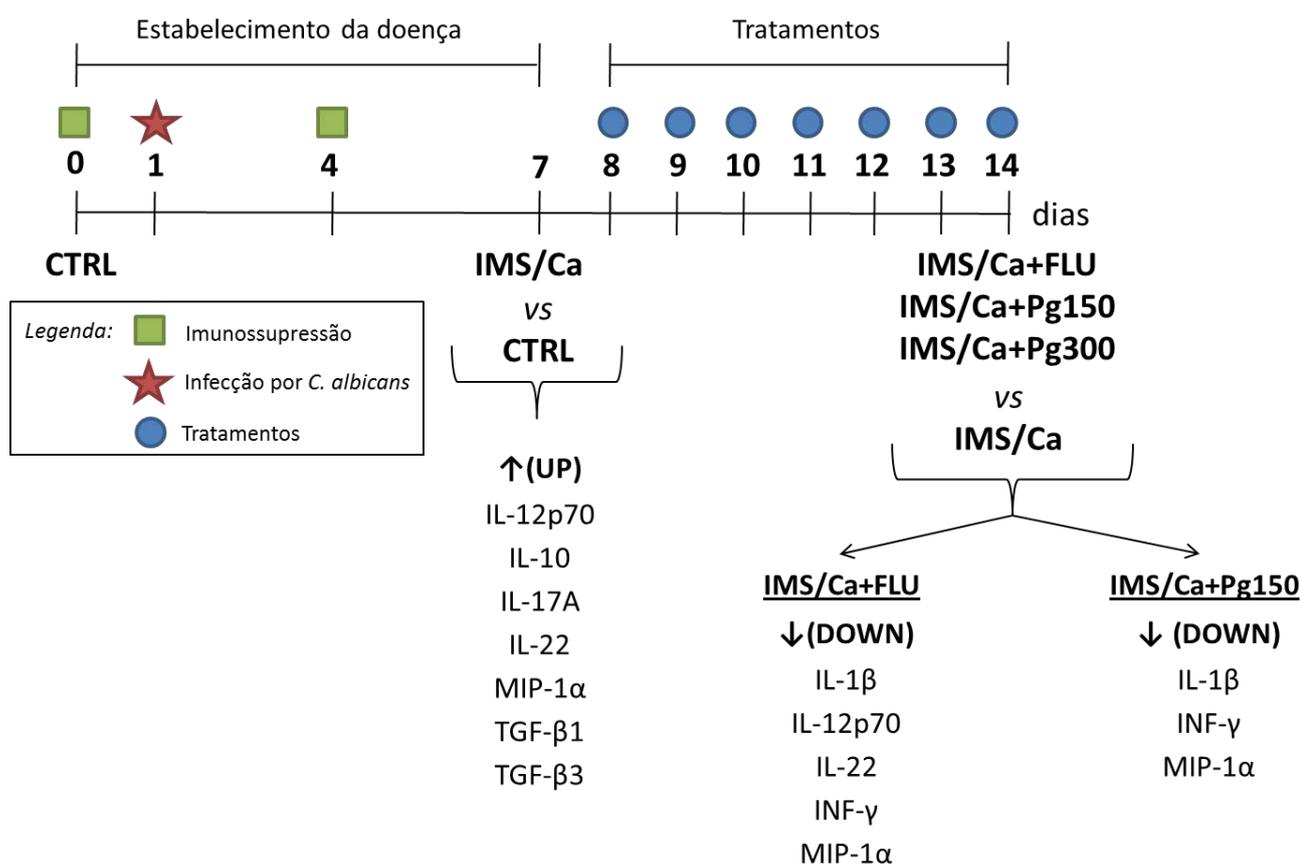
5 Resultados e Discussão

Figura 13 - Aumento ou redução das citocinas/quimiocinas produzidas nos linfonodos cervicais dos camundongos BALB/c, durante o modelo experimental de candidose oral localizada: Grupos infectados (IMS/Ca ou IMS/Ca+7d) foram comparados (*versus* - *vs*) com grupo controle (CTRL), bem como entre si. Acima, a linha cronológica demonstra, em dias, os procedimentos para a indução da doença, sendo que a mesma foi estabelecida no 7º dia após a infecção por *Candida albicans*. As setas ↑ (UP) ou ↓ (DOWN) indicam aumento ou redução, respectivamente (supra e subregulação), na produção de citocinas/quimiocinas, identificado nas diferentes comparações entre os grupos. Um número bem maior de citocinas/quimiocinas suprarreguladas (IMS/Ca vs CTRL), foi observado logo após o estabelecimento da doença (7d), do que aos 14 d (IMS/Ca+7d vs CTRL). Quando, ao se comparar as duas fases da infecção (14 e 7d), a subregulação das citocinas/quimiocinas aos 14 d se opunha à suprarregulação detectada em IMS/Ca vs CTRL, considerou-se um processo de restabelecimento à normalidade com o tempo. As citocinas/quimiocinas subreguladas aos 14 d e que não se apresentaram em níveis aumentados inicialmente (quando IMS/Ca vs CTRL) foram destacadas em amarelo. Imagens representativas do animal após 7 (IMS/Ca) e 14 dias (IMS/Ca+7d) de infecção foram incluídas à direita da lista de citocinas/quimiocinas. Foram utilizados os kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGFβ 1,2,3/TGFBMAG-64K-03. Os gráficos com as análises estatísticas referentes a cada citocina e quimiocina podem ser visualizados na Figura 18.



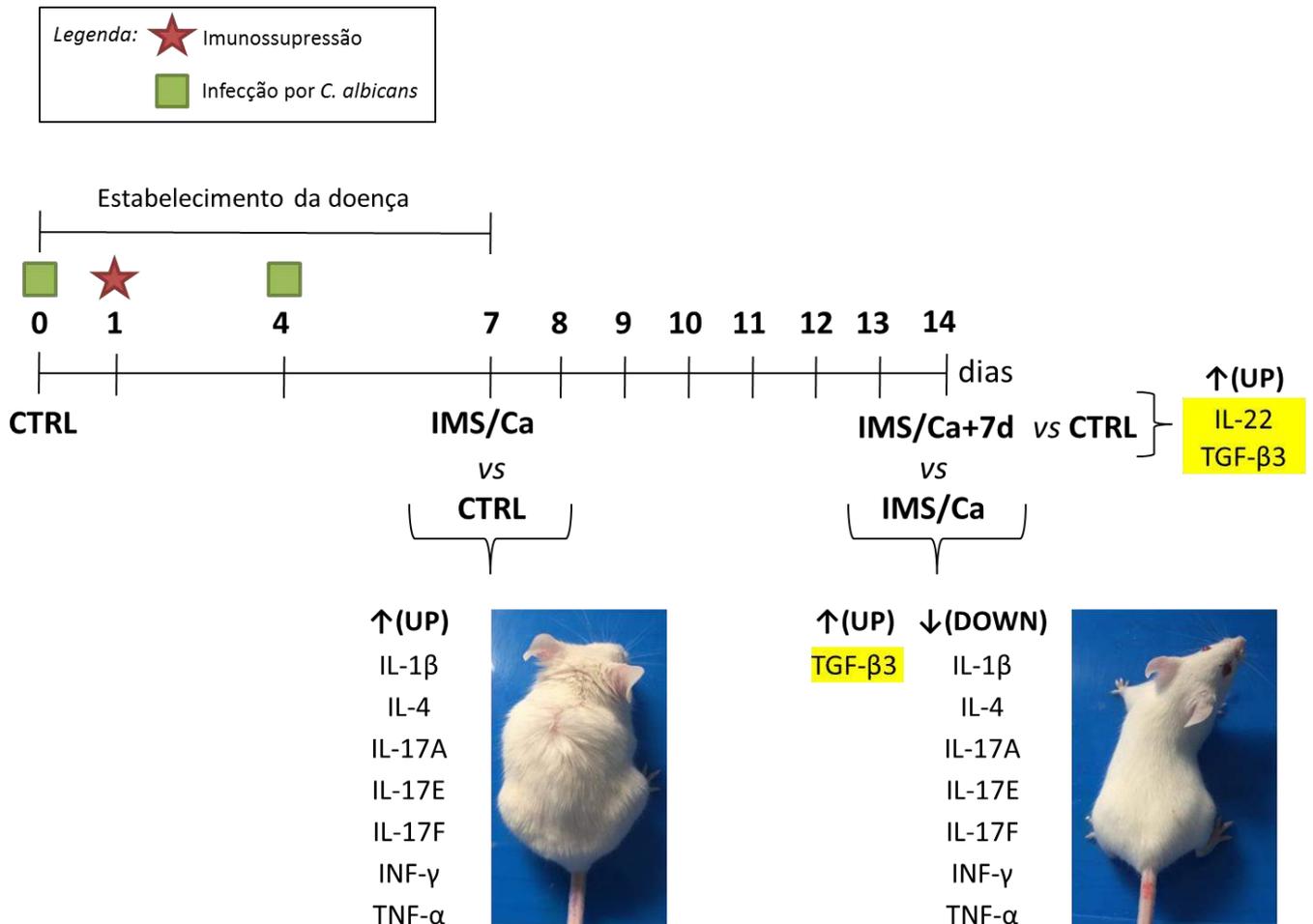
5 Resultados e Discussão

Figura 14 - Aumento ou redução das citocinas/quimiocinas produzidas nos linfonodos cervicais dos camundongos BALB/c, durante o modelo experimental de candidose oral localizada: Grupo infectado (IMS/Ca) foi comparado (versus - vs) com grupo controle (CTRL) ou com os grupos tratados (IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Acima, a linha cronológica demonstra, em dias, os procedimentos para a indução da doença, estabelecida no 7º dia após a infecção por *Candida albicans*, bem como o protocolo de tratamento por meio de fluconazol ou *Punica granatum* (dia 8 até o dia 14). As setas ↑ (UP) ou ↓ (DOWN) indicam aumento ou redução, respectivamente (supra e subregulação), na produção de citocinas/quimiocinas, identificado nas diferentes comparações entre os grupos. Quando, ao se comparar a doença tratada (14 d) com a fase inicial da infecção (7d), a subregulação das citocinas/quimiocinas aos 14 d se opunha à supregulação detectada em **IMS/Ca vs CTRL**, considerou-se um processo de restabelecimento à normalidade com o tempo. Foram utilizados os kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGFβ 1,2,3/TGFBMAG-64K-03. Os gráficos com as análises estatísticas referentes a cada citocina e quimiocina podem ser visualizados na Figura 18.



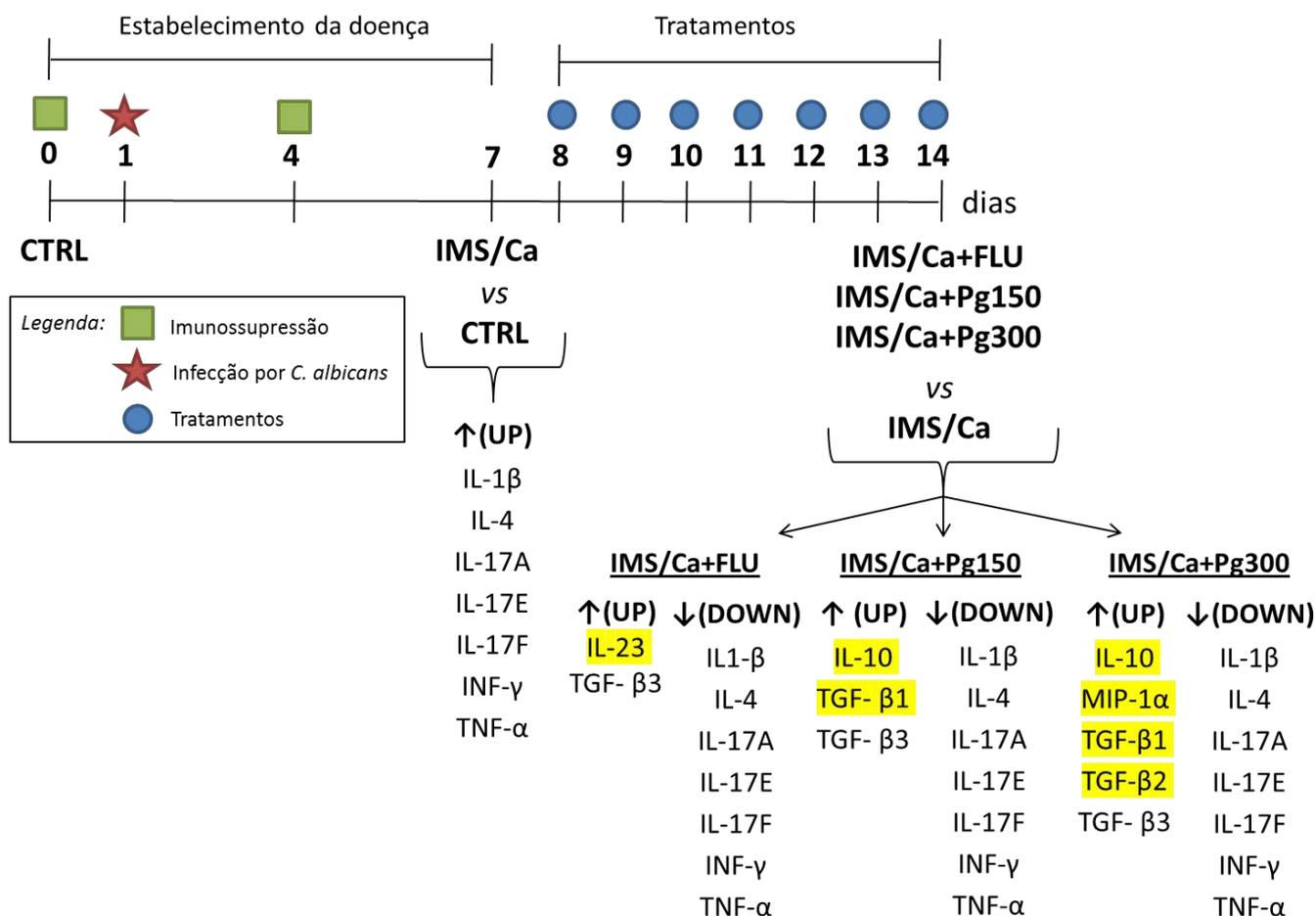
5 Resultados e Discussão

Figura 15 - Aumento ou redução das citocinas/quimiocinas produzidas na língua dos camundongos BALB/c, durante o modelo experimental de candidose oral localizada: Grupos infectados (IMS/Ca ou IMS/Ca+7d) foram comparados (versus - vs) com grupo controle (CTRL), bem como entre si. Acima, a linha cronológica demonstra, em dias, os procedimentos para a indução da doença, sendo que a mesma foi estabelecida no 7º dia após a infecção por *Candida albicans*. As setas ↑ (UP) ou ↓ (DOWN) indicam aumento ou redução, respectivamente (supra e subregulação), na produção de citocinas/quimiocinas, identificado nas diferentes comparações entre os grupos. Um número bem maior de citocinas/quimiocinas suprarreguladas (IMS/Ca vs CTRL), foi observado logo após o estabelecimento da doença (7d), do que aos 14 d (IMS/Ca+7d vs CTRL). Quando, ao se comparar as duas fases da infecção (14 e 7d), a subregulação das citocinas/quimiocinas aos 14 d se opunha à suprarregulação detectada em IMS/Ca vs CTRL, considerou-se um processo de restabelecimento à normalidade com o tempo. As citocinas/quimiocinas suprarreguladas aos 14 d e cuja produção não se mostrou alterada anteriormente (quando IMS/Ca vs CTRL) foram destacadas em amarelo. Imagens representativas do animal após 7 (IMS/Ca) e 14 dias (IMS/Ca+7d) de infecção foram incluídas à direita da lista de citocinas/quimiocinas. Foram utilizados os kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGFβ 1,2,3/TGFBMAG-64K-03. Os gráficos com as análises estatísticas referentes a cada citocina e quimiocina podem ser visualizados na Figura 19.



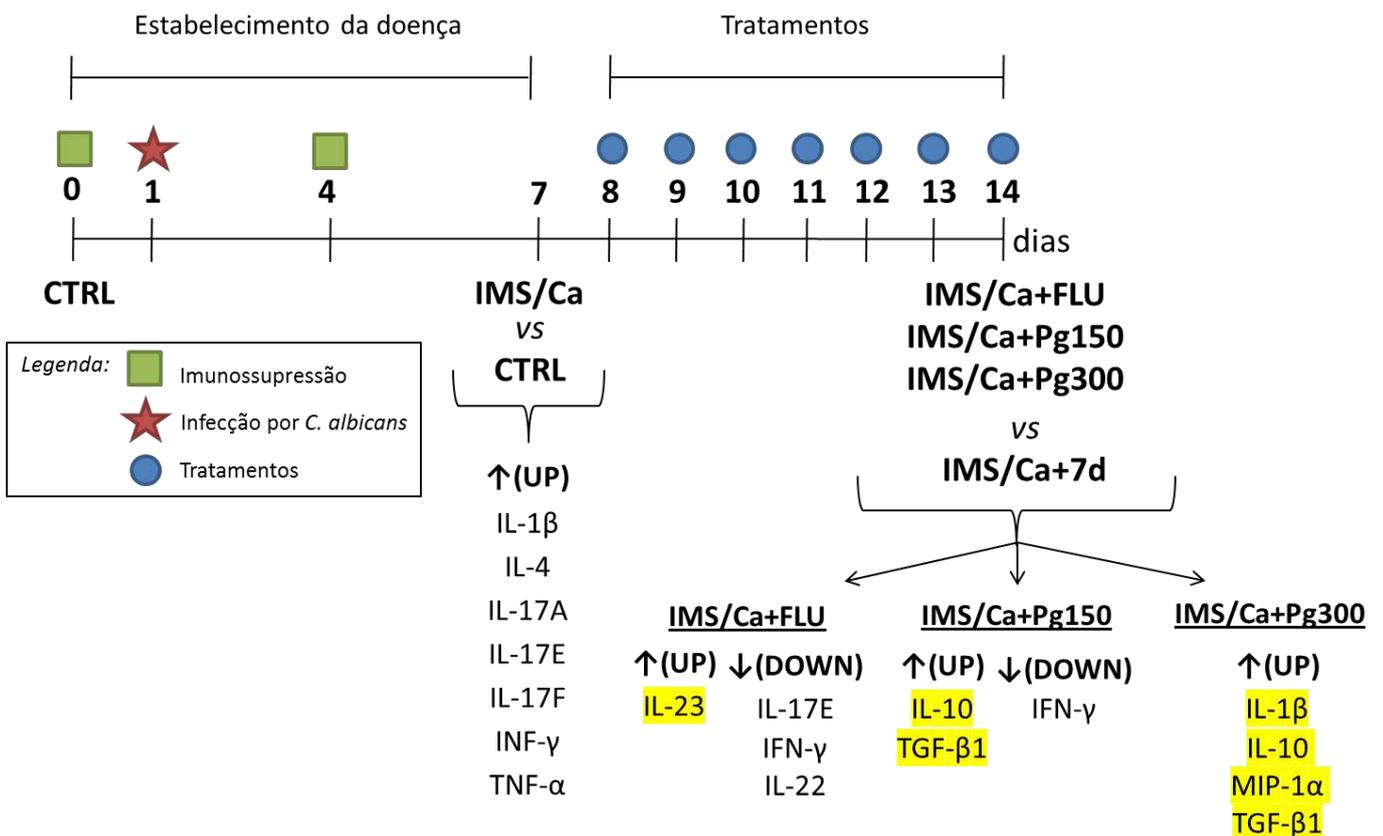
5 Resultados e Discussão

Figura 16 - Aumento ou redução das citocinas/quimiocinas produzidas na língua dos camundongos BALB/c, durante o modelo experimental de candidose oral localizada: Grupo infectado (IMS/Ca) foi comparado (*versus* - vs) com grupo controle (CTRL) ou com os grupos tratados (IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300). Acima, a linha cronológica demonstra, em dias, os procedimentos para a indução da doença, estabelecida no 7º dia após a infecção por *Candida albicans*, bem como o protocolo de tratamento por meio de fluconazol ou *Punica granatum* (dia 8 até o dia 14). As setas ↑ (UP) ou ↓ (DOWN) indicam aumento ou redução, respectivamente (supra e subregulação), na produção de citocinas/quimiocinas, identificado nas diferentes comparações entre os grupos. Quando, ao se comparar a doença tratada (14 d) com a fase inicial da infecção (7d), a subregulação das citocinas/quimiocinas aos 14 d se opunha à supregulação detectada em IMS/Ca vs CTRL, considerou-se um processo de restabelecimento à normalidade com o tempo, já que a mesma anulação já havia sido observada na Figura 15. Ainda, quando a supregulação aos 14 d foi similar àquela detectada em IMS/Ca+7d (vs CTRL), considerou-se a mesma como inerente ao modelo experimental, como observado na Figura 15. As citocinas/quimiocinas supreguladas nos animais tratados, aos 14 d, e cuja produção não se mostrou alterada anteriormente (quando IMS/Ca vs CTRL) nem foi inerente ao modelo experimental (IMS/Ca+7d vs CTRL), foram destacadas em amarelo. Foram utilizados os kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGFβ 1,2,3/TGFBMAG-64K-03. Os gráficos com as análises estatísticas referentes a cada citocina e quimiocina podem ser visualizados na Figura 19.



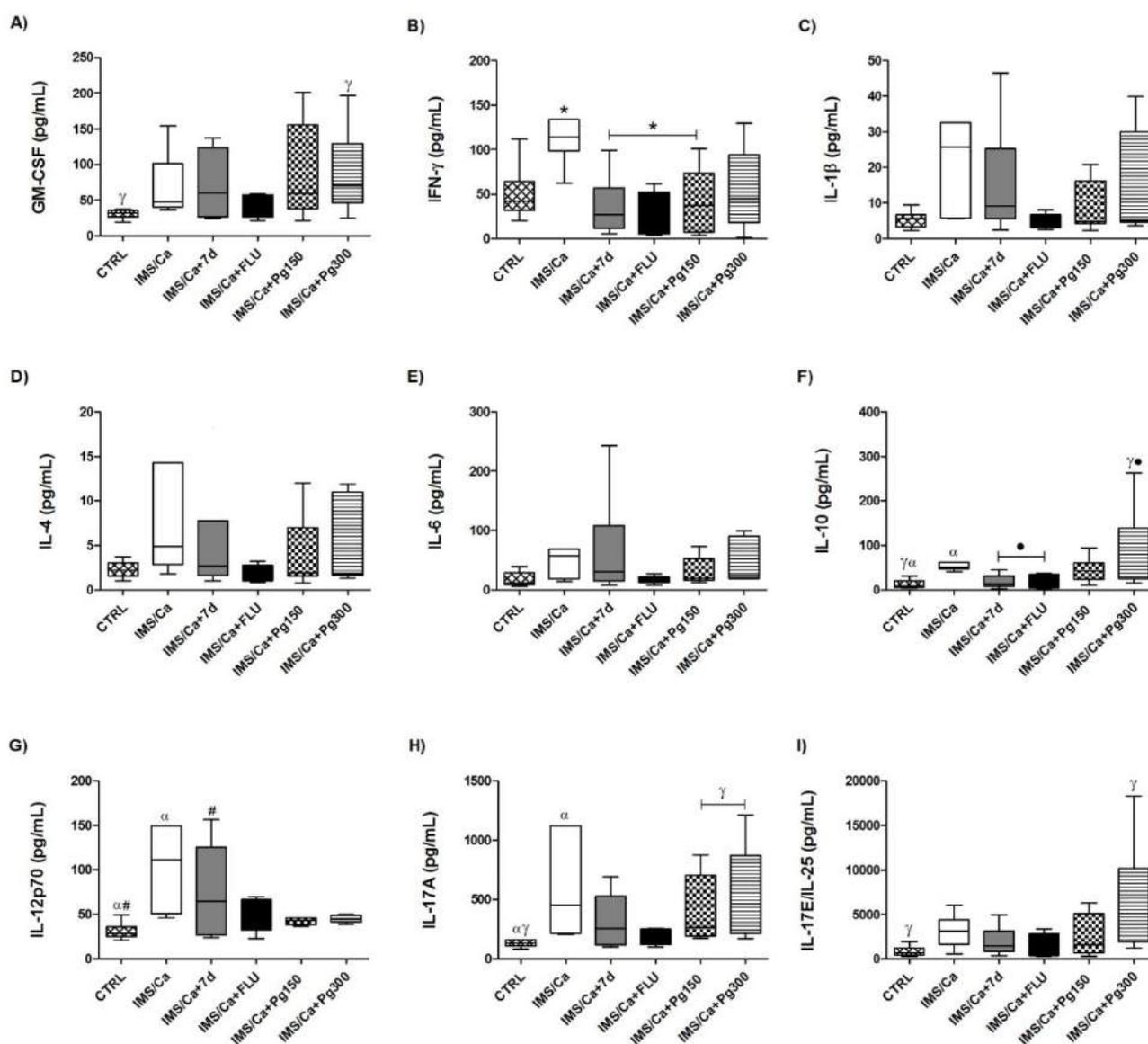
5 Resultados e Discussão

Figura 17 - Aumento ou redução das citocinas/quimiocinas produzidas na língua dos camundongos BALB/c, durante o modelo experimental de candidose oral localizada: Grupo infectado (IMS/Ca) foi comparado (*versus* - vs) com grupo controle (CTRL), e grupos tratados (IMS/Ca+FLU, IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300) foram comparados com IMS/Ca+7d. Acima, a linha cronológica demonstra, em dias, os procedimentos para a indução da doença, estabelecida no 7º dia após a infecção por *Candida albicans*, bem como o protocolo de tratamento por meio de fluconazol ou *Punica granatum* (dia 8 até o dia 14). As setas ↑ (UP) ou ↓ (DOWN) indicam aumento ou redução, respectivamente (supra e subregulação), na produção de citocinas/quimiocinas, identificado nas diferentes comparações entre os grupos. Quando, ao se comparar a doença tratada (14 d) com a fase posterior da infecção sem tratamento (14 d), a subregulação das citocinas/quimiocinas aos 14 d se opunha à supregulação detectada em IMS/Ca vs CTRL, considerou-se um processo de restabelecimento à normalidade com o tempo, já que a mesma anulação já havia sido observada na Figura 15. Ainda, quando a subregulação aos 14 d se opunha à supregulação detectada em IMS/Ca+7d vs CTRL, considerou-se a mesma como inerente ao modelo experimental aos 14 d, como observado na Figura 15. As citocinas/quimiocinas supreguladas nos animais tratados, aos 14 d, e cuja produção não se mostrou alterada nas comparações IMS/Ca vs CTRL ou IMS/Ca+7d vs CTRL, foram destacadas em amarelo. Foram utilizados os kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGFβ 1,2,3/TGFBMAG-64K-03. Os gráficos com as análises estatísticas referentes a cada citocina e quimiocina podem ser visualizados na Figura 19.

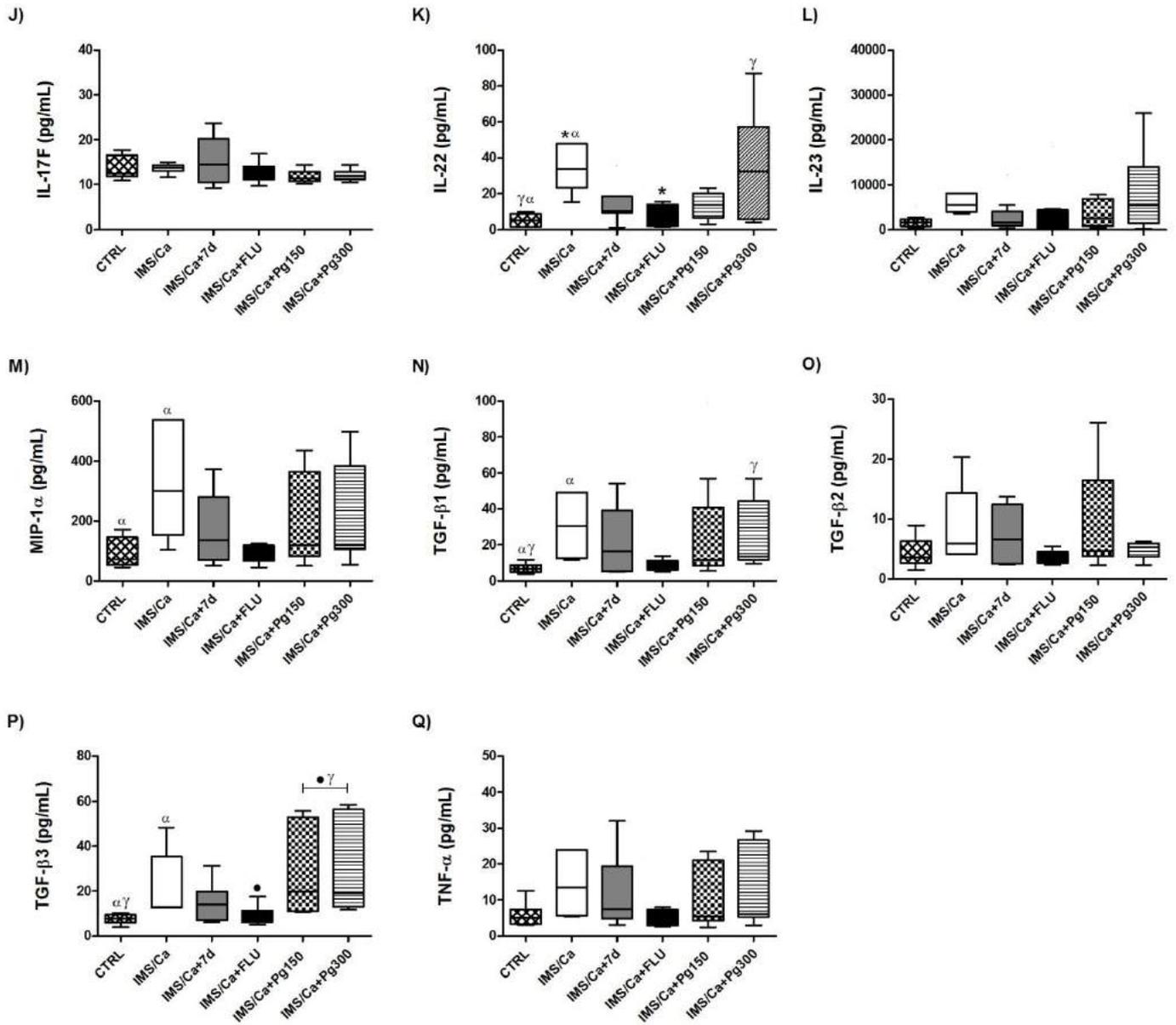


5 Resultados e Discussão

Figura 18 - Produção de citocinas e quimiocinas nos linfonodos cervicais dos camundongos BALB/c. Diferentes grupos foram comparados entre si: não infectados (CTRL) e infectados, após o estabelecimento da doença (IMS/Ca), sete dias após o estabelecimento da doença (IMS/Ca+7d), e após os tratamentos com *Punica granatum* (IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300) ou fluconazol (IMS/Ca+FLU). Foram utilizados os kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGFβ 1,2,3/TGFBMAG-64K-03. A produção de GM-CSF (A), IFN-γ (B), IL-1β (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IL-17E/IL-25 (I), IL-17F (J), IL-22 (K), IL-23 (L), MIP-1α (M), TGF-β1 (N), TGF-β2 (O), TGF-β3 (P) e TNF-α (Q) foi normalizada pela quantidade de proteínas totais presente no homogenato de linfonodos cervicais e expressa em pg/mL. Foram realizados 2 experimentos independentes (n=10/grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média ± desvio padrão (SD) e, de acordo com a normalidade, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD ou pela Análise do teste de Kruskal-Wallis. Símbolos iguais representam p<0,05.

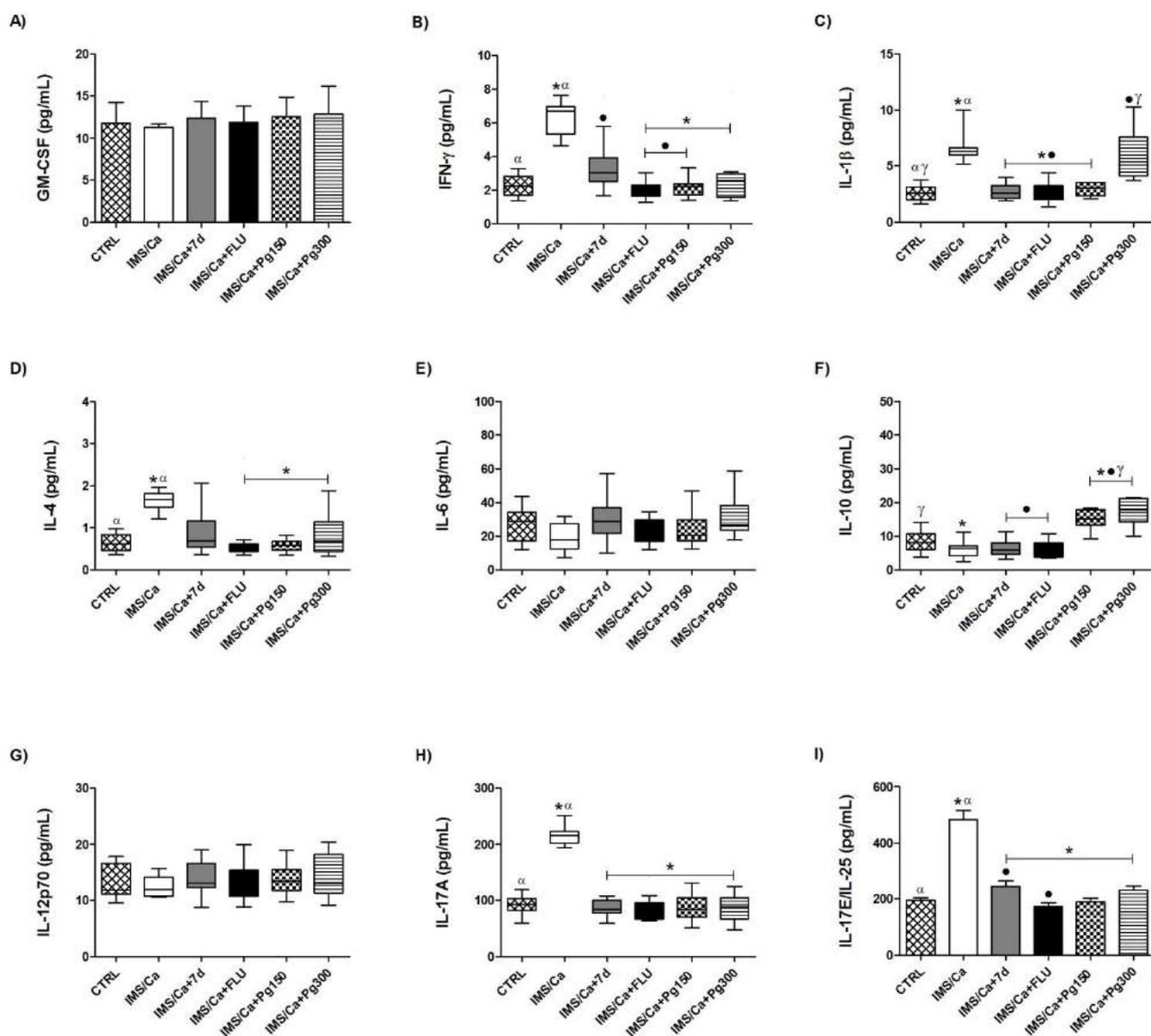


5 Resultados e Discussão

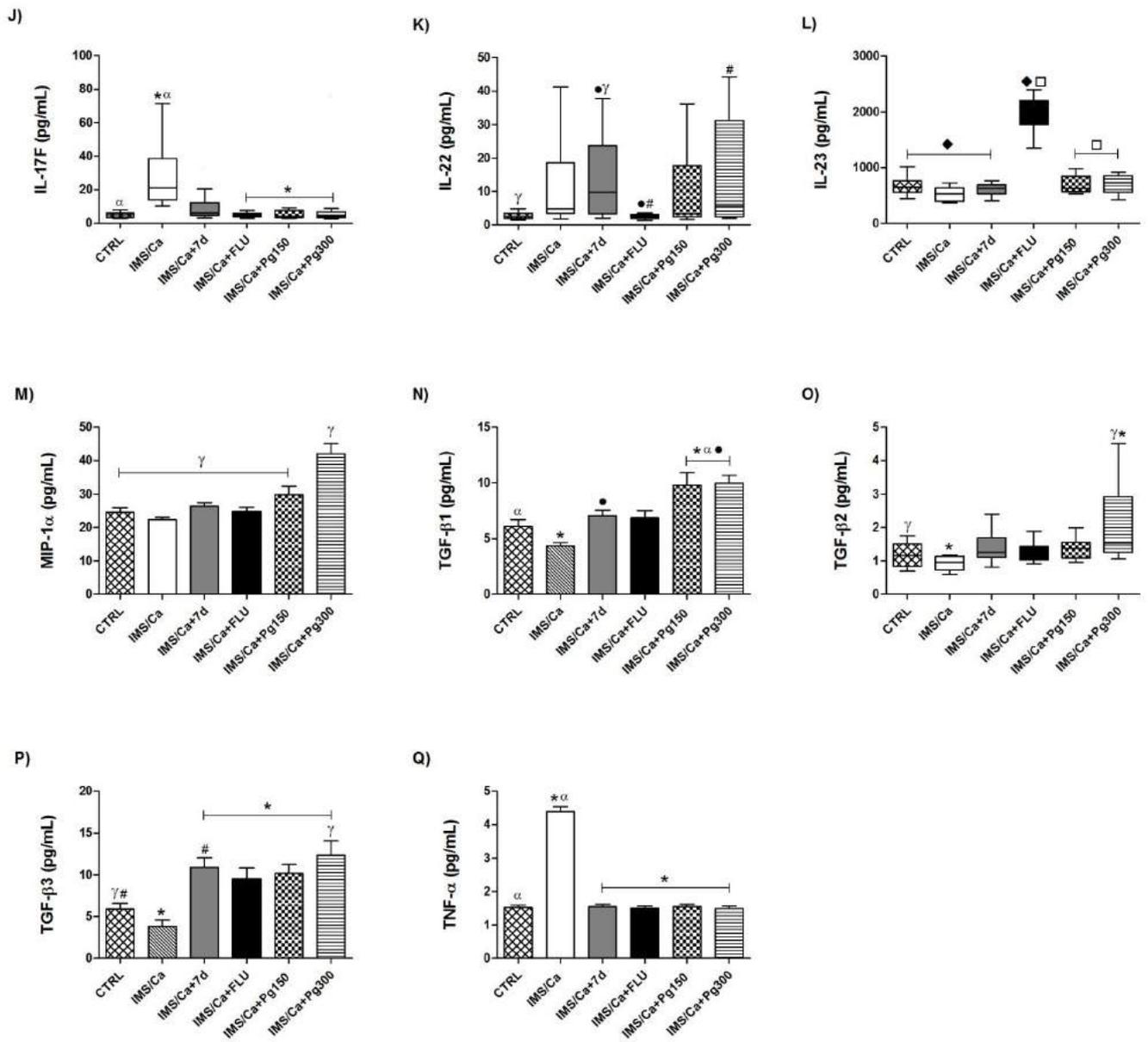


5 Resultados e Discussão

Figura 19 - Produção de citocinas e quimiocinas na língua dos camundongos BALB/c. Diferentes grupos foram comparados entre si: não infectados (CTRL) e infectados, após o estabelecimento da doença (IMS/Ca), sete dias após o estabelecimento da doença (IMS/Ca+7d), e após os tratamentos com *Punica granatum* (IMS/Ca+Pg150 e IMS/Ca+Pg300) ou fluconazol (IMS/Ca+FLU). Foram utilizados os kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGF β 1,2,3/TGFBMAG-64K-03. A produção de GM-CSF (A), IFN- γ (B), IL-1 β (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IL-17E/IL-25 (I), IL-17F (J), IL-22 (K), IL-23 (L), MIP-1 α (M), TGF- β 1 (N), TGF- β 2 (O), TGF- β 3 (P) e TNF- α (Q) foi normalizada pela quantidade de proteínas totais presente no homogenato de língua e expressa em pg/mL. Foram realizados 2 experimentos independentes (n=10/grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e, de acordo com a normalidade, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD ou pela Análise do teste de Kruskal-Wallis. Símbolos iguais representam $p < 0,05$.

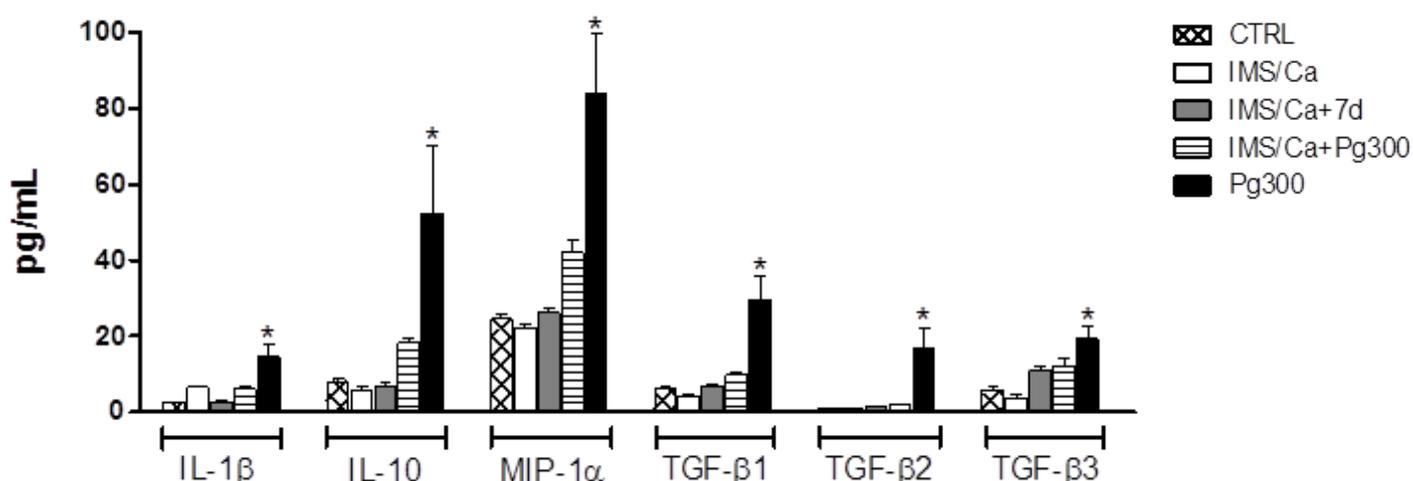


5 Resultados e Discussão



5 Resultados e Discussão

Figura 20 - Produção de IL-1 β , IL-10, MIP-1 α , TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 no homogenato de língua de camundongos BALB/c, após administrações diárias de *Punica granatum*. Diferentes grupos foram comparados entre si: animais não infectados (CTRL) e infectados, após o estabelecimento da doença (IMS/Ca), sete dias após o estabelecimento da doença (IMS/Ca+7d), e após o tratamento com 7 doses diárias do extrato de *P. granatum* a 300 mg/Kg (IMS/Ca+Pg300), além de animais saudáveis (não infectados) que receberam 7 doses diárias do extrato de *P. granatum* a 300 mg/Kg (Pg300). Foram realizados 2 experimentos independentes (n=10/grupo). Os resultados foram apresentados por meio da média \pm desvio padrão (SD) e, de acordo com a normalidade, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Two-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. * $p < 0,05$ representa Pg300 vs demais grupos, dentro do mesmo grupo de citocina/quimiocina.



4 DISCUSSÃO

Ação antimicrobiana *in vitro* de *Punica granatum* frente a *C. albicans*: possível papel da punicalagina

Em meio a rica diversidade de espécies botânicas existentes com potencial terapêutico resultando em alívio de sinais e sintomas de doenças cardiovasculares, imunossupressoras, assim como aquelas no campo da Odontologia, *P. granatum* se destaca pelas importantes atividades farmacológicas constatadas em estudos *in vivo* e *in vitro*, envolvendo ações antimicrobiana (BASSIRI-JAHROMI *et al.*, 2018), anti-inflamatória (AHARONI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2017a), anti-câncer (PANTH *et al.*, 2017) e antioxidante (ESTHER LYDIA *et al.*, 2020).

5 Resultados e Discussão

Em um estudo prévio da nossa equipe, relatamos a atividade antimicrobiana *in vitro*, contra o biofilme de *C. albicans*, de frações enriquecidas de *P. granatum* e de *Equisetum giganteum*, incorporadas em um adesivo protético para uso na superfície interna de próteses bucais totais superiores (confeccionadas com resina acrílica termopolimerizável). Nestas condições, ambos os extratos amplificaram a ação anti-*Candida* do adesivo, em até 12 horas; e a atividade antimicrobiana foi relacionada a presença de compostos bioativos como os taninos (punicalagina) e os flavonóides, respectivamente às duas matrizes vegetais (ALMEIDA *et al.*, 2018a).

No presente trabalho, a investigação *in vitro* da concentração inibitória mínima (CIM) de *P. granatum* contra *C. albicans* foi um dos objetivos, já que a proposta inicial foi autenticar a atividade anti-*Candida* de *P. granatum* através da sensibilidade da célula fúngica, sem a interferência da resposta imune do hospedeiro. Assim, na concentração de 18,75 mg/mL (o *endpoint*), o extrato de *P. granatum* foi capaz de inibir 50% da carga fúngica após 24 horas em contato com *C. albicans*. Como controle positivo de morte fúngica, foi utilizado, neste trabalho, o fluconazol, um medicamento sintético comumente utilizado para a eliminação de fungos do gênero *Candida*, já que a maioria das suas espécies é suscetível aos azólicos. Como esperado, o fluconazol foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, resultando em percentuais de morte fúngica, que variaram de 47 a 75,6%.

A efetividade de *P. granatum* contra microrganismos, por meio do estudo da CIM, tem sido demonstrada em outros trabalhos, como a inibição de *Escherichia coli* (*E. coli*) enterohemorrágica na presença de 0,5-3 mg/mL (CIM) do extrato etanólico da casca da romã. Ainda, a CIM deste fitoterápico variou entre 0,39 a 25 mg/mL considerando várias cepas de *E. coli* (PRASHANTH *et al.*, 2001; VORAVUTHIKUNCHAI *et al.*, 2004). De acordo com Menezes *et al.* (2006), o extrato hidroalcolólico de *P. granatum* diminuiu o número de UFCs de *E. coli*, bem como de espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella* e *Proteus* em 84%, comparado a clorexidina (79% de inibição) (MENEZES *et al.*, 2006). Bhadbhade *et al.* (2011) verificaram ainda que enxaguatório bucal contendo romã, com concentrações entre 0,4 a 2 mg/mL, apresentou efeito contra a placa dentomicrobiana, uma vez que inibiu os periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. (BHADBHADE *et al.*, 2011).

5 Resultados e Discussão

Embora a ação anti-*Candida* do extrato de *P. granatum* tenha sido validada no presente trabalho através da CIM, a concentração de 18,75 mg/mL é substancialmente maior, quando comparada com alguns trabalhos, nos quais a CIM foi mesurada em µg/mg (McCARRELL *et al.*, 2008; ENDO *et al.*, 2010; MADUGULA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017). Tal discrepância deve ser decorrente de diferentes metodologias de extração, período da colheita e amadurecimento da fruta, e variações do tempo e da região de cultivo, além do tipo de microrganismo estudado. Assim, diferentes perfis inibitórios são encontrados na literatura sobre o extrato das cascas de *P. granatum* (McCARRELL *et al.*, 2008; ENDO *et al.*, 2010; MADUGULA *et al.*, 2017). Como exemplo, em uma análise fitoquímica da fruta de *P. granatum* em diferentes climas (mediterrâneo e desértico), o extrato das cascas apresentou diferentes níveis de antioxidantes e compostos fenólicos totais, durante o período de maturação, o que interfere diretamente no estabelecimento do potencial farmacológico, influenciando na quantidade e na concentração do extrato capaz de inibir minimamente o microrganismo (SCHWARTZ *et al.*, 2009).

Pesquisas sobre os componentes bioativos de *P. granatum* e seus efeitos sobre a melhoria da saúde humana são de máximo interesse para a sociedade (SAEED *et al.*, 2018). Dentre os fitoconstituintes, destacam-se os alcalóides (peletierina, metilpeletierina, pseudopeletierina e isopeletierina), manita, vários fenóis, ácido elágico e ácido gálico. Além dos alcalóides, a casca do fruto da romã possui, aproximadamente, 20% de taninos como punicalina, *punicalagina* (isômeros α e β), granatinas A e B, galagildilactona, casuarinina, pedunculagina, telimagrandina I e corilagina. O principal composto bioativo responsável pela ação antimicrobiana desta fruta é a punicalagina (α e β), um tanino elágico hidrolisável (FETROW; AVILA, 2000; CATÃO *et al.*, 2006). Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias, e esses dados serviram de base para a confirmação da ação antifúngica destes compostos contra células leveduriformes do gênero *Candida* (MOREY *et al.*, 2016; DE FREITAS *et al.*, 2018).

Os possíveis modos de ação dos taninos estão relacionados com a inibição ou diminuição do metabolismo dos microrganismos, por meio da alteração de elementos essenciais para o referido metabolismo. Como exemplo, podemos citar a inibição e a complexação de enzimas dos microrganismos levando a redução da sua disponibilidade, a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, e

5 Resultados e Discussão

a complexação de polissacarídeos da membrana celular dos microrganismos (HASLAM, 1996; HASLAM, 1998). Essas interferências causadas pelos taninos geram seu efeito antimicrobiano, seja ele fungicida ou fungistático (BARANOWSKA *et al.*, 2016; OGAWA *et al.*, 2018; MAISETTA *et al.*, 2019). Adicionalmente, em processos inflamatórios e de cura de feridas, os taninos participam da formação de uma camada protetora sobre tecidos epiteliais lesionados, uma vez que complexam com proteínas e/ou polissacarídeos. Isso permite que, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorra naturalmente (SIMÕES *et al.*, 2007).

Considerando esses estudos relatados, acreditamos que a presença de α e β -punicalagina, identificada por meio de espectrometria de massas (UHPLC-qTOF-MS/MS) no extrato bruto hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*, utilizadas no presente trabalho, possa estar fortemente relacionada com esses resultados sobre a atividade anti-*Candida* de *P. granatum* obtidos a partir da avaliação da CIM.

Análise toxicológica revela tolerabilidade de camungondos BALB/c saudáveis ao extrato de *Punica granatum*

Após a autenticação da ação antimicrobiana do extrato das cascas de *P. granatum*, a avaliação toxicológica *in vivo* do extrato foi realizada previamente aos ensaios referentes à avaliação da sua eficácia como tratamento para a candidose oral experimental. Sendo assim, tal avaliação foi realizada em animais saudáveis (não infectados) que receberam administrações, por gavagem, de fluconazol (**FLU**) ou *P. granatum* (**Pg150** e **Pg300**).

Ao contrário do que se supõe, o uso popular e, até mesmo, o uso tradicional das plantas não são suficientes para validá-las como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; AGRA *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2019). Neste intuito, estudos toxicológicos são necessários e vêm desmitificando a ideia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são sempre isentos de efeitos adversos (LAPA, 1999; CRAVEIRO *et al.*, 2008; MARLIÉRE *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2008). A avaliação da toxicidade objetiva excluir novas substâncias e produtos que podem causar danos à saúde humana. Desde a antiguidade, a tolerabilidade dos animais tem sido utilizada como parâmetro para mensurar o risco toxicológico de diversos compostos e medicamentos (CRUZ, 2003; CAZARIN *et al.*, 2004). Os modelos de estudos

5 Resultados e Discussão

toxicológicos *in vivo* abordam ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica que, além da letalidade, investigam diversos níveis e parâmetros de alterações fisiomorfológicas, como o potencial tóxico em órgãos específicos, a toxicocinética e a relação dose-resposta (VALADARES, 2006).

O *screening* hipocrático, por exemplo, baseia-se em análises comportamentais sistemáticas que fornecem uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, a atividade e a coordenação do sistema motor, os reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central (SNC) e sobre o sistema nervoso autônomo do animal (MALONE; ROBBICHAUD, 1983; CUNHA *et al.*, 2019). É um ensaio bastante útil para avaliar a toxicidade aguda (dose única ou múltipla com o agente tóxico, num período de tempo aproximado de 24 h) e é comumente utilizado na triagem preliminar de plantas medicinais para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas (LUCIO *et al.*, 2000). Na toxicidade subaguda (administrações repetidas com o agente tóxico), os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais (TOFOVIC; JACKSON, 1999; RAZA *et al.*, 2002; TEO *et al.*, 2002).

Além da redução ponderal, a toxicidade sistêmica se manifesta através da redução no consumo de água e de ração, alterações comportamentais, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pêlos arrepiados (MELO, 2001). Outros sinais de toxicidade são a alteração da massa relativa dos órgãos, e as alterações histopatológicas, hematológicas e bioquímicas, sanguíneas e sorológicas (GONZALEZ; SILVA, 2003).

No presente trabalho, após análise dos parâmetros comportamentais e fisiológicos dos animais saudáveis, nenhuma alteração foi observada nas primeiras 24 h em todos os grupos (**CTRL**, **FLU**, **Pg150** e **Pg300**), ou seja, independentemente do composto utilizado (*P. granatum* ou fluconazol), nenhuma alteração toxicológica aguda foi constatada. Após 7 dias de administração, os animais que receberam as diferentes concentrações de *P. granatum* (150 ou 300 mg/mL - **Pg150** ou **Pg300**) alimentaram-se mais (em relação aos demais grupos) e, de acordo com resultados obtidos através da cinética corporal, mantiveram seu peso similar ao grupo **CTRL** e não apresentaram piloereção.

Além disso, a administração por 7 dias de *P. granatum* na concentração de 150 mg/mL (**Pg150**) não influenciou a coordenação motora, os reflexos e nem

5 Resultados e Discussão

alterou atividades relacionadas com o SNC ou com o sistema nervoso autônomo (avaliado por meio do percentual de defecação e de consumo de água), como observado para *Kaempferia galanga* L. e *Synadenium umbellatum* em outros estudos similares (KANJANAPOTHI *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2008).

Em contrapartida, os animais saudáveis, que receberam as 7 administrações diárias de fluconazol (**FLU**), perderam peso corporal, após o terceiro dia de administração e apresentaram o maior percentual de perda de peso (-5,14%) em relação aos demais grupos. Ainda, alguns desses animais não responderam ao toque e ao aperto da cauda, e todos apresentaram piloereção. Esses resultados corroboram aqueles obtidos por meio da dosagem de biomarcadores séricos: ureia e creatinina para nefrotoxicidade; e TGP e triglicérides para hepatotoxicidade. A partir da administração de fluconazol (**FLU**), os níveis séricos de TGP e de triglicérides apresentaram-se elevados (120 U/mL e 76,3 mg/dL, respectivamente), tanto em relação aos valores de referência para a linhagem de camundongos BALB/c (ALMEIDA *et al.*, 2008), como em relação aos valores obtidos no grupo controle (**CTRL**). Diferentemente, não houve alteração destes marcadores no soro dos animais que receberam *P. granatum* (**Pg150** ou **Pg300**).

O fígado é um órgão extremamente suscetível à lesão tóxica, pois recebe as toxinas absorvidas pelo trato gastrointestinal, e as enzimas hepáticas frequentemente convertem prototoxinas em metabólitos mais tóxicos. A patogênese da lesão hepática varia de acordo com a toxina. Alguns dos mecanismos da lesão celular são a liberação de radicais livres (Cl^- , H^+ , O , OH^-), alquilação, peroxidação de lipídios, inativação de enzimas, ligação ao DNA e redução na síntese protéica (SMITH, 1993; CAMPOS *et al.* 2009). O dano tecidual induzido por medicamentos pode afetar diretamente os hepatócitos, o qual se apresentará por meio do aumento sérico das transaminases oxaloacéticas e pirúvicas (TGO e TGP) ou de triglicérides (BERTOLAMI, 2005). Neste contexto, a análise desses biomarcadores fornece uma importante ferramenta para avaliar a relação entre a exposição ao composto, a dose metabolizada e o dano tecidual; parâmetros valiosos na avaliação toxicológica.

As dosagens séricas de marcadores bioquímicos permitem localizar a lesão, monitorar o tratamento e acompanhar o progresso da patologia (BRUNS *et al.*, 2001). De um modo geral, as enzimas celulares, em condições normais, encontram-se em níveis basais no soro; no entanto, tais níveis aumentam em decorrência de dano tóxico ou doença, já que nesses casos elas são liberadas de

5 Resultados e Discussão

seus tecidos de origem (FASSATI *et al.*, 2012). A TGP encontra-se, principalmente, no citoplasma do hepatócito, por outro lado cerca de 80% da TGO está no interior da mitocôndria. Isso permite categorizar o grau de uma lesão hepatocelular: leve, com predominância da forma citoplasmática, ou grave, na qual há comprometimento mitocondrial com elevação da relação TGP/TGO (SANTOS, 2003). Sendo assim, levando em consideração o aumento significativo dos níveis séricos de TGP e triglicérides, observado no presente trabalho, sugerimos que o fluconazol, administrado por 7 dias (**FLU**), possa ter gerado lesão hepatocelular grave em animais saudáveis.

Além das manifestações toxicológicas encontradas no *screening* hipocrático e os elevados níveis séricos de TGP e triglicérides, a ingestão diária deste fármaco sintético resultou em maior percentual da frequência de alterações microscópicas em fígado e rins, fortalecendo o diagnóstico de toxicidade sub-aguda nestes animais. Especificamente no fígado, foram observadas, de forma expressiva, esteatose microvesicular (93,7%), principalmente nas zonas periportal, justasinusoidal ou centrolobular, bem como esteatose macrovesicular (98,3%). Ademais, vasos hiperêmicos, micro-hemorragias, alteração hidrópica, corpúsculos de Mallory-Denk (no interior de hepatócitos balonizados), acúmulo de gordura e aumento da massa relativa tecidual foram também verificados no fígado dos animais do grupo **FLU**.

Embora efeitos hepatotóxicos relacionados a utilização de compostos triazólicos sejam raros devido a sua ótima biodisponibilidade, eles foram reportados em outros estudos *in vivo*, corroborando nossos resultados, como por exemplo por Zervus e Meunier (1993), principalmente em indivíduos HIV+ tratados por 7 dias, e por Khoza *et al.* (2017), em ratos tratados, via gavagem, por 14 e 28 dias, os quais apresentaram alteração hidrópica, inflamação e necrose em hepatócitos, além de granuloma e hiperplasia do ducto biliar (ZERVUS; MEUNIER, 1993; KHOZA *et al.*, 2017).

Em situações normais, o excesso de ácidos graxos livres é canalizado para a mitocôndria dos hepatócitos, onde ocorre a beta-oxidação; quando há ingestão diária de substâncias tóxicas, tal excesso é direcionado à lipogênese (esterificação), levando ao acúmulo de triglicérides no interior do fígado, que, pelo fato de não ter essa função, torna-se comprometido. A doença é conhecida como esteatose hepática (HOLNESS; SUGDEN, 1999; FESTI *et al.*, 2004; DUVNJAK *et*

5 Resultados e Discussão

al., 2007). Do ponto de vista anatomopatológico, a esteatose ou doença hepática gordurosa é uma condição tecidual reversível que pode ter uma ou duas formas, dependendo do tamanho das vesículas de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos: 1) esteatose microvesicular, onde a gordura é armazenada em múltiplas pequenas vesículas, com diâmetro médio de 15 μm , e o núcleo fica centralizado; e 2) esteatose macrovesicular, onde a gordura é armazenada em uma única e grande vesícula, deslocando o núcleo para a periferia (BURT *et al.*, 1998; ZAITOUN *et al.*, 2001; GRAMLICH *et al.*, 2004; OLESZCZUK *et al.*, 2007).

Diferente do fluconazol, o extrato das cascas da romã, administrado por 7 dias, não foi hepatotóxico para os animais saudáveis. De acordo com Hafiz *et al.* (2016), extratos vegetais ricos em compostos como punicalagina e punicalina exercem atividade hepatoprotetora. Além disso, a punicalagina e outros elagitaninos, devido ao tamanho molecular elevado, não são absorvidos diretamente pelo fígado. A punicalagina, como é um composto molecularmente instável, sofre hidrólise enzimática no trato gastrintestinal por várias horas após a administração. Por meio desta reação química, compostos estruturalmente relacionados a punicalagina, como punicalina, ácido galágico, ácido gálico e ácido elágico, são produzidos e metabolizados durante 6 h. O ácido elágico, por sua vez, é absorvido na primeira porção do trato gastrintestinal, sendo gradualmente metabolizado no intestino por até 12 h, desde o jejuno até as partes mais distais, originando as urolitinas A, B, C e D, as quais podem ser detectadas no sangue e na urina até 48 h após a administração de uma dose única do extrato. Já a administração direta do ácido elágico, via oral, leva a uma baixa absorção e rápida metabolização e eliminação, atingindo a concentração plasmática máxima em apenas 30 min (MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; MEDJAKOVIC, 2013; NUÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2014). Desse modo, é comum haver maior biodisponibilidade, e conseqüentemente maior hepatoproteção, na ingestão do extrato bruto de *P. granatum* quando comparada à administração isolada dos compostos, provavelmente como consequência da ação sinérgica de outros compostos presentes na matriz vegetal (MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006; JURENKA, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012).

No presente trabalho, o fluconazol também demonstrou ser nefrotóxico. Mesmo que os níveis séricos de ureia e creatinina tenham sido similares aos do grupo **CTRL**, os rins dos animais do grupo **FLU** apresentaram alterações macro e

5 Resultados e Discussão

microscópicas. Nestes órgãos, havia regiões enegrecidas, sugerindo a presença de áreas necróticas, assim como micro-hemorragias e perda do espaço de Bowman, em uma média de 79,4 e 89,6% dos campos microscópicos, respectivamente. De fato, lesão tóxica em rins leva a deposição de fibrina que, por sua vez, resulta em proliferação das células do folheto parietal da cápsula de Bowman. Como consequência, estas células aderem ao túbulo contorcido proximal e obliteram o espaço de Bowman, interferindo diretamente na filtração glomerular e, portanto, na eliminação do composto tóxico (CHIHANGA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019).

Semelhante ao que foi detectado para o fígado, não foram observadas alterações renais nos animais que receberam a administração de 150 mg/Kg de *P. granatum*. Em animais que receberam a maior concentração do extrato (300 mg/Kg), foram observadas, raramente, micro-hemorragias (2,1%) e perda do espaço de Bowman (1%).

Por meio da associação destes resultados, a administração de fluconazol (100 mg/Kg) durante 7 dias em animais saudáveis demonstrou ser hepatotóxica e nefrotóxica. Entretanto, como as alterações histológicas avaliadas neste trabalho correspondem a lesões celulares reversíveis, dependendo da persistência ou remoção do estímulo, elas podem ou não evoluir para a morte celular. Assim sendo, no nosso caso, possivelmente a interrupção das administrações de fluconazol acarretaria no retorno da normalidade do quadro hepático e nefrológico dos animais. Porém, vale ressaltar que o extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*, administrado por 7 dias, via gavagem, não produziu alterações quanto aos parâmetros fisiológicos, histológicos e laboratoriais, demonstrando não ser tóxico para camundongos BALB/c saudáveis, principalmente na concentração de 150 mg/mL. Estes achados foram considerados por nós uma constatação muito significativa e notória.

A toxicidade de *P. granatum* pode variar de acordo com a porção da fruta (cascas, sementes, suco) utilizada para a obtenção do extrato. Vidal *et al.* (2003) demonstraram efeitos tóxicos do extrato hidroalcoólico do fruto inteiro de *P. granatum* apenas quando em altas doses, com uma DL₅₀ de 731 mg/Kg (i.p.) em camundongos, sendo a piloereção o sinal mais evidente. Além da ação sinérgica entre os compostos, tal fato pode ser explicado pela diferente composição química dos extratos, uma vez que os metabólitos secundários presentes no fruto inteiro podem ser diferentes daqueles contidos apenas em sua casca (VIDAL *et al.*, 2003).

5 Resultados e Discussão

Seguindo o Guia 423, utilizado neste trabalho (OECD, 2001), quando não há morte de animais de experimentação após se testar a dose de 300 mg/Kg, em ensaio de toxicidade oral aguda de múltiplas doses, o valor da DL₅₀ pode ser considerado como sendo maior que 300 mg/Kg e menor que 2000 mg/Kg. Portanto, como não houve morte no grupo **Pg300** (dados não mostrados), o extrato utilizado neste trabalho pode ser enquadrado na Classe 4 de GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*), considerado portanto de baixa toxicidade. Isso quer dizer que sua administração oral, via gavagem, pode ser considerada segura para os animais. Essa conclusão permitiu a continuidade do nosso trabalho de pesquisa, com segurança.

A avaliação da candidose oral induzida com 7 e 14 dias pós-infecção permitiu a autenticação do modelo experimental

Diante da constatação da biocompatibilidade do extrato de *P. granatam*, a próxima etapa deste trabalho teve como objetivo padronizar o modelo experimental *in vivo* de candidose oral, seguindo aquele descrito por Takakura *et al.* (2003). Com este propósito, os grupos controle da imunossupressão (**IMS**), do estabelecimento da doença após 7 dias de infecção por *C. albicans* (**IMS/Ca**) e de sua permanência após 14 dias (**IMS/Ca+7d**), serviram de base para a autenticação do referido modelo. A autenticação foi fundamental para que as atividades antimicrobiana e imunomodulatória de *P. granatam* pudessem ser avaliadas após o tratamento dos animais com o fitoterápico (discutidas nos subitens a seguir).

Consideramos que o modelo desenvolvido por Takakura *et al.* (2003) foi bem reproduzido e validado em nosso trabalho. Para estabelecer a infecção, os camundongos foram imunossuprimidos por duas injeções subcutâneas de prednisolona, uma antes da inoculação de *C. albicans* e outra 3 dias pós-infecção. Este modelo mimetiza a manifestação clínica da candidose pseudomembranosa vista em humanos; portanto a infecção pode ser avaliada clinicamente, pela presença de lesões brancas típicas, bem como quantitativamente pela carga fúngica (contagem das UFCs) e microscopicamente através da análise do tecido infectado (TAKAKURA *et al.*, 2003).

A imunossupressão é fundamental para o desenvolvimento e o estabelecimento do modelo experimental de candidose oral, associando-se com

5 Resultados e Discussão

maiores taxas de colonização por *Candida* e com evidentes alterações histopatológicas, consideradas clássicas da doença, em língua e esôfago, em comparação com animais infectados sem prévia imunização (MEITNER *et al.*, 1990; KIRCHNER *et al.*, 2019). A incapacidade de induzir uma resposta Th17 e a secreção deficiente de IL-17 levam ao recrutamento insuficiente de neutrófilos da corrente sanguínea e falha na contenção do crescimento fúngico na mucosa oral (VAN DER MEER *et al.*, 2010). Neste contexto, o uso da prednisolona atua primariamente por meio da ligação ao receptor de glicocorticóide citosólico e causa inibição de fatores transcricionais como NF- κ B e AP-1, suprimindo assim a ativação de genes que codificam vários mediadores pró-inflamatórios, como IL-17A e IFN- γ (COUTINHO e CHAPMAN, 2011), citocinas-chave na defesa do hospedeiro contra a infecção por *Candida* na cavidade oral (KOBAYASHI-SAKAMOTO *et al.*, 2018).

Ainda que a corticoterapia seja eficiente para estabelecer o modelo experimental, esse medicamento desencadeia efeitos catabólicos nos músculos esqueléticos (SALI *et al.*, 2012; SANCHES *et al.*, 2019), reduzindo, inicialmente, o peso corporal dos animais. Ao longo do tempo, esta perda de peso é atenuada pela eliminação deste glicocorticóide sintético pela urina (MAZZARINO *et al.*, 2019). De fato, no presente trabalho, a imunossupressão com prednisolona reduziu o peso corporal dos camundongos imunossuprimidos (**IMS**), entre a primeira (dia 0) e a segunda (dia 4) injeção; entretanto, após a segunda dose (dia 4), o peso dos animais mostrou uma tendência de restabelecimento à normalidade. Vale ressaltar que quando comparado com os demais grupos, o grupo **IMS** foi o grupo que obteve o menor percentual de perda de peso ao longo do experimento (-7,75%).

A infecção oral por *C. albicans* associada à imunossupressão (**IMS/Ca**), no referido trabalho, também resultou em efeitos catabólicos nos animais, e em maior grau que aqueles observados nos animais apenas imunossuprimidos (**IMS**). Esta perda corporal se manteve por 7 dias pós-infecção, apresentando uma média de -13,68% de perda de peso. Além disso, manifestações fisiológicas como piloereção e perda da sensibilidade caudal foram observadas nestes animais infectados (**IMS/Ca**).

Em humanos, a infecção por *C. albicans* na língua, palato ou esôfago pode tornar a mastigação, sucção e deglutição dolorosas. Ainda, as infecções fúngicas orofaríngeas têm influência direta sobre o estado nutricional, pois podem causar queimação, hipersensibilidade na boca e disfagia, comprometendo a

5 Resultados e Discussão

ingestão alimentar (TAPIA *et al.*, 2003; TOUGER-DECKER, 2005; DADAR *et al.*, 2018). Uma possível justificativa da expressiva redução de peso nos animais imunossuprimidos e infectados, no presente trabalho, é a menor ingestão alimentar durante o desenvolvimento da doença (dia 0 até dia 7), por perda de apetite e/ou dor e desconforto durante a ingestão, em decorrência da placa micelial de *C. albicans* em formação no dorso da língua (dados não mostrados).

Do oitavo dia experimental até o momento da eutanásia (dia 15), os animais infectados e que receberam o veículo carboximetilcelulose 1% diluído em água filtrada (*sham*-tratados), mantiveram seu peso (**IMS/Ca+7d**); contudo este grupo foi o que apresentou o maior percentual de perda de peso (-21,18%) ao longo de todo o experimento, corroborando Bassiri-Jahromi *et al.* (2018) ao observarem que animais imunossuprimidos, infectados e eutanasiados 15 dias pós-infecção oral por *C. albicans* apresentaram, ao final do experimento, entre -15% e -25% de perda de peso corporal. Tendo em vista que a última aplicação de prednisolona foi no quarto dia experimental, naturalmente, ao longo do tempo, os efeitos da imunossupressão foram sendo atenuados, mas não impediram a permanência da infecção até 14 dias, de acordo com as análises macro e microscópicas do grupo **IMS/Ca+7d**.

Com relação à análise macroscópica no dorso da língua, os animais imunossuprimidos, infectados por *C. albicans* e eutanasiados após 7 dias de infecção (**IMS/Ca**) apresentaram placas miceliais em torno de 21 a 90% (Escore 2) da área total avaliada. Com 14 dias pós-infecção (**IMS/Ca+7d**), o escore foi reduzido para 1. A utilização do valor da extensão total da área (mm²) comprometida por placa micelial ou pseudomembrana em *pixels*, após documentação fotográfica, através do programa Image J[®], utilizado em nosso trabalho, facilitou a análise macroscópica e tornou possível a padronização e a reprodutibilidade da metodologia de Yin *et al.* (2006) e de Campos Rasteiro *et al.* (2014), que utilizaram uma lupa para a observação das placas miceliais (YIN *et al.*, 2016; DE CAMPOS RASTEIRO *et al.*, 2014).

Em concordância, os animais do grupo **IMS/Ca** demonstraram elevado grau de colonização ($5,42\log_{10}$) de *C. albicans* na língua, a qual se mostrou reduzida ($4,28\log_{10}$) ao longo do tempo (**IMS/Ca+7d**). Esses achados são semelhantes àqueles obtidos por Takakura *et al.* (2003), os quais obtiveram valores de UFC/mL de *C. albicans* em torno de 10^5 a 10^6 , recuperados após 7 dias de infecção. Os

5 Resultados e Discussão

autores relacionaram os dados microbiológicos com o grau das lesões orais e observaram alto coeficiente de correlação ($R=0.75$, $n=26$), confirmando que o número elevado de placas brancas na língua reflete diretamente o grau de colonização de *C. albicans* na cavidade oral dos animais infectados (TAKAKURA *et al.*, 2003).

Novamente, os achados microscópicos foram concordantes com os aspectos discutidos até agora. A língua dos animais do grupo **IMS/Ca** revelou a presença de infiltrado inflamatório mononuclear intenso com inúmeras leveduras/hifas na superfície epitelial, sendo que algumas invadiram o revestimento epitelial. Nesse caso, outras alterações estavam presentes simultaneamente, como hiperplasia, desorganização da camada de células basais, desaparecimento total ou parcial da arquitetura das papilas filiformes e hiperqueratose. Esses aspectos microscópicos são característicos de candidose oral, e também foram relatados por outros autores em modelos experimentais *in vivo* de candidose oral utilizando camungongos e ratos (TEICHERT *et al.*, 2002; JUNQUEIRA *et al.*, 2009; MIMA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012). Como esperado, tais alterações microscópicas apresentaram-se reduzidas ou eram ausentes entre os animais do grupo **IMS/Ca+7d**.

A análise histopatológica feita por Takakura *et al.* (2003) apresenta algumas diferenças em comparação àquela obtida no presente trabalho, como por exemplo a presença de infiltrado inflamatório severo, com numerosas hifas, invasão fúngica e destruição das camadas epiteliais, após 7 dias de infecção (TAKAKURA *et al.*, 2003). Possivelmente, isso se deve ao fato de que os autores utilizaram uma cepa proveniente de isolado clínico de pacientes com candidose cutânea; ao passo que, no presente estudo, foi utilizada uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804).

Outras metodologias também foram utilizadas para induzir candidose oral em animais. Teichert *et al.* (2002) induziram imunodeficiência severa e recuperaram cerca de 2×10^2 UFC/mL de *C. albicans* da cavidade oral. Por outro lado, Totti *et al.* (2004) realizaram quatro inoculações de *C. albicans* em suspensão em camundongos sialoadenectomizados, e verificaram que apenas dois animais, de um total de 6, apresentaram colonização fúngica até 60 dias pós-infecção, e apenas 1 até 75 dias pós-infecção. Nos animais que desenvolveram a candidose oral, a análise histopatológica revelou presença de pseudo-hifas invadindo o epitélio,

5 Resultados e Discussão

acantose e infiltrado neutrofílico intra-epitelial formando microabscessos. Embora esse método favoreça a colonização de *C. albicans* por mais tempo, os autores não mencionaram o número recuperado de UFC/mL das lesões orais, não sendo possível estabelecer uma comparação direta com nosso estudo (TEICHERT *et al.*, 2002; TOTTI *et al.*, 2004).

Vale ressaltar ainda que repetidas aplicações do fungo dificultam a execução do modelo experimental, uma vez que desencadeiam níveis de estresse e reduzem a relação custo/benefício (LOPEZ-MARTINEZ, 2010). Nesse contexto, como descrito no modelo experimental murino desenvolvido por Takakura *et al.* (2003) e observado em nossos resultados, a infecção oral por *C. albicans* foi estabelecida em 7 dias e perdurou, mesmo que em níveis inferiores, após 14 dias, com apenas uma única aplicação do inóculo.

Assim, a doença fúngica mantida por até 14 dias, como obtido no presente trabalho, permitiu a autenticação do modelo experimental de candidose oral, o qual foi considerado portanto bem-sucedido sob nossa avaliação. Acreditamos que a sedação dos animais, durante 3 horas com cloridrato de clorpromazina, tenha colaborado para tal sucesso, já que leva à hipofunção salivar e conseqüentemente facilita o desenvolvimento dos tubos germinativos e sua invasão tecidual. A hipossalivação é considerada um fator predisponente da candidose oral, visto que os constituintes salivares podem dificultar ou impedir a proliferação de *C. albicans* (SALVATORI *et al.*, 2016; VILA *et al.*, 2019).

Como observado no modelo experimental utilizado aqui, a patogenicidade dos microrganismos e seus fatores de virulência resultam em doença, nas suas mais variadas formas de alterações teciduais e manifestações clínicas. Entretanto, vale ressaltar que, além dos aspectos inerentes do agente infeccioso, a resposta do hospedeiro também é fundamental para definir os diferentes caminhos patológicos de uma doença e as possibilidades de cura (KABIR; AHMAD, 2012a; KABIR *et al.* 2012b). Na candidose oral, uma das principais respostas imunes ativadas no hospedeiro é aquela relacionada com as células específicas Th1 e Th17. Assim, avaliamos também a produção das citocinas relacionadas, após 7 e 14 dias de infecção (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**), tanto nos linfonodos cervicais (resposta sistêmica) quanto na língua (resposta localizada), com o objetivo de compreender o perfil de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que acompanha a doença experimental e, posteriormente, a doença após o tratamento.

5 Resultados e Discussão

Assim, após a infecção dos animais por *C. albicans*, a produção de citocinas nos linfonodos cervicais e, também, na língua foi inicialmente comparada com os animais saudáveis não infectados (**CTRL**), demonstrando níveis elevados de citocinas na presença da doença (supreregulação). Como esperado, um número bem maior de citocinas, nos linfonodos, apresentou-se com níveis aumentados no início da doença (**IMS/Ca vs CTRL**) do que aos 14 dias (**IMS/Ca+7d vs CTRL**). Aos 7 dias, as citocinas com níveis elevados ou suprereguladas foram IL-12p70, IL-17A, IL-22 (perfil Th17), MIP-1 α (Th1), e IL-10, TGF- β 1 e TGF- β 3 (Th2); enquanto aos 14 dias, apenas notamos aumento da produção de IL-12p70. Comparando-se 14 com 7 dias, ou seja, os grupos **IMS/Ca+7d vs IMS/Ca**, houve uma queda nos níveis das citocinas IL-12p70, IL-22 e MIP-1 α , sugerindo uma anulação da superprodução observada no início da infecção em relação ao **CTRL**; possivelmente refletindo o retorno destas citocinas aos seus níveis basais. Ainda, na comparação dos 14 com 7 dias, IL-1 β e IFN- γ estavam em níveis inferiores, nos linfonodos cervicais, na fase posterior da doença, possivelmente em função da doença induzida.

Aspectos semelhantes foram observados na língua dos animais com candidose oral experimental. Comparando-se com **CTRL**, um número bem maior de citocinas apresentou-se com níveis aumentados no início da doença (**IMS/Ca**) do que aos 14 dias (**IMS/Ca+7d**). Após 7 dias de infecção (**IMS/Ca vs CTRL**), houve aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , e de citocinas relacionadas ao perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17A, IL-17E e IL-17F); enquanto aos 14 dias (**IMS/Ca+7d vs CTRL**), apenas foi observado aumento da produção de IL-22 e TGF- β 3. Em acordo com o que foi observado no homogenato dos linfonodos cervicais, após 14 dias de infecção (**IMS/Ca+7d vs IMS/Ca**), houve redução de todas as citocinas que se apresentaram em níveis elevados no início da doença (quando **IMS/Ca vs CTRL**), sugerindo também o retorno destas citocinas aos seus níveis basais.

Esses achados estão em acordo com a resposta imune observada na candidose oral em humanos. Nas fases iniciais da doença, há ativação de uma resposta imune pró-inflamatória, que sinaliza o recrutamento inicial de células fagocíticas, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas para o local da infecção (MOYES; NAGLIK, 2011; HEBECKER *et al.*, 2014). Na sequência, a imunidade adquirida tem um papel fundamental, quando então células Th17 reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de

5 Resultados e Discussão

vários receptores de lectina do tipo C e o inflamassoma, liberando IL-1 β , IL-6, IL-23 e TGF- β , que direcionam as células Th17 para a mucosa, controlando o crescimento inicial de *Candida* e inibindo a invasão tecidual (VILA *et al.*, 2020). A importância das células T na mediação da resposta anti-*Candida* é claramente ilustrada pela alta frequência de candidose oral em indivíduos HIV+ (KLEIN *et al.*, 1984; JABRA-RIZK *et al.*, 2016).

De fato, no nosso modelo experimental, o perfil de citocinas suprarreguladas está diretamente associado a uma resposta imune predominantemente Th1/Th17 após 7 dias de infecção por *C. albicans* (IMS/Ca). As citocinas como IL-1 β , IL-17A, IL-17F e IL-22, no local da infecção, atuam recrutando macrófagos e amplificando a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas fundamentais para a defesa contra o fungo (KHADER *et al.*, 2009; CUA; TATO, 2010; GLADIATOR *et al.*, 2013; TASAKI *et al.*, 2018). Tanto a IL-17 como a IL-22 são citocinas pró-inflamatórias que induzem o recrutamento e ativação de neutrófilos, e estão relacionadas à ativação de células epiteliais. As células epiteliais, por sua vez, cooperam no controle do estado comensal de *Candida* pela produção de β -defensinas, calprotectina e histatinas, que têm uma poderosa atividade antifúngica (GOW *et al.*, 2012; TOMALKA *et al.*, 2015). Especificamente, a IL-22 contribui para a resistência antifúngica nas superfícies mucosas. Produzida por células Th1, Th17 e Th22 (CELLA *et al.*, 2009; WITTE *et al.*, 2010), esta citocina assegura a integridade do epitélio via fosforilação de STAT3, sendo associada a limitação do dano e da inflamação na mucosa oral (BONIFAZI *et al.*, 2009; DE LUCA *et al.*, 2010; EYERICH *et al.*, 2011).

TGF- β é uma citocina pleiotrófica produzida por células T (predominantemente Tregs), macrófagos e outros tipos celulares como fibroblastos, que regula diversas atividades em células efectoras, podendo ter atividade imunossupressora, anti-inflamatória ou imunoestimulante (SPACCAPELO *et al.*, 1995). Quase todas as células secretam TGF- β latente e expressam os receptores de TGF- β , tornando a restrição da ativação do TGF- β um regulador chave para a identificação de seus efeitos biológicos em estudos *in vivo* (YUE; MULDER 2001, SIEGEL *et al.*, 2003, RIFKIN 2005). Além de participar da diferenciação de células Th17 e Tregs, a principal ação desta citocina no contexto da candidose oral é a proliferação e o desenvolvimento das funções efectoras de linfócitos T e a ativação de macrófagos (BHASKARAN *et al.*, 2015; BHASKARAN *et al.*, 2018). Células Treg

5 Resultados e Discussão

CD4⁺ e CD25⁺ têm sido associadas a diversas patologias, participando do equilíbrio do sistema imune adquirido e do controle da imunidade antifúngica (MURPHY, 1989; KONKEL; CHEN, 2011).

Corroborando nossos resultados, Spaccapelo *et al.* (1995) evidenciaram um aumento na produção endógena de TGF- β após a infecção por *C. albicans* em camundongos, e demonstraram, *in vitro*, que esta citocina tem ação inibitória sobre a atividade candidíca de macrófagos ativados por IFN- γ (SPACCAPELO *et al.*, 1995).

No presente trabalho, a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias observada nos linfonodos cervicais e na língua, com o passar do tempo de indução da doença experimental, sugere uma regulação sistêmica e localizada da produção de citocinas e, portanto, uma diminuição do estado inflamatório com o tempo, indicando o restabelecimento imunológico, inerente ao modelo experimental que foi adaptado a partir de Takakura *et al.* (2003).

Em virtude dos resultados obtidos até agora, o modelo empregado neste trabalho para indução de candidose oral foi reprodutível e nos permitiu visualizar o perfil da resposta imune elaborada após 7 e 14 dias de infecção oral por *C. albicans*. De forma inovadora, no presente estudo, animais infectados com apenas uma única aplicação do inóculo e avaliados após 14 dias de infecção (**IMS/Ca+7d**) apresentaram lesões típicas de candidose oral, mesmo que reduzidas em comparação ao grupo **IMS/Ca**. Já no estudo conduzido por Totti *et al.* (2004), na maioria dos animais, a infecção não foi mantida por todo período pretendido. Nesse sentido, nosso trabalho traz uma vantagem em comparação aos outros, pois os resultados obtidos confirmam que o modelo de indução de candidose oral estabelecido é adequado para reprodução da infecção por um período de tempo mais prolongado (14 dias), o que permitiu, na sequência, a avaliação da eficácia de tratamentos sucessivos (TOTTI *et al.*, 2004).

***Punica granatum* desempenha atividade antimicrobiana e hepatoprotetora no tratamento da candidose oral experimental**

Estudos com extratos de *P. granatum* e seus compostos têm mostrado efeitos antioxidante (RICCI *et al.*, 2006), anti-inflamatório (LANSKY; NEWMAN, 2007) e hepatoprotetor (CELIK *et al.*, 2009), assim como potencial antimicrobiano no

5 Resultados e Discussão

tratamento de doenças orais (FUENTES; EXPOSITO, 1995; FENGHUN; LIU, 1997). Algumas destas importantes e colaborativas potencialidades de *P. granatum* foram observadas em nosso trabalho.

Após o estabelecimento da infecção e com a comprovação que o modelo experimental perdura após 14 dias, a atividade anti-*Candida* do extrato de *P. granatum* foi investigada em camundongos BALB/c infectados. No trabalho conduzido por Takakura *et al.* (2003), os autores avaliaram a eficácia terapêutica do fluconazol e da anfotericina B, no tratamento de candidose oral induzida em camundongos. O fluconazol foi administrado na água de beber fornecida durante todo o experimento em uma concentração de 50 µg/mL. Já a anfotericina B (suspensão oral; 100 mg/mL) foi aplicada diretamente em toda a superfície da cavidade oral, em volume de 200 µL, incluindo a língua, mucosa bucal e palato mole, com o auxílio de um *swab*. A autenticação macroscópica deste modelo experimental se deu através da visualização de placas brancas ou pseudomembranas no dorso da língua (TAKAKURA *et al.*, 2003). As placas miceliais formadas podem ser facilmente removidas via raspagem ou fricção. Dessa forma, a aplicação da anfotericina B com o *swab* diretamente na cavidade oral dos animais pode resultar na remoção mecânica das pseudomembranas, interferindo nos resultados. No caso do fluconazol, a sua adição na água de beber impede uma padronização referente à quantidade diária de fármaco ingerida, comprometendo a avaliação antimicrobiana. Considerando estas limitações no modelo descrito por Takakura *et al.* (2003), em nosso trabalho optamos pelo método de ingestão intragástrica, via gavagem, para o tratamento dos animais, assegurando a padronização da concentração diária de *P. granatum* ou fluconazol administrada, sem interferir nas placas miceliais previamente desenvolvidas no dorso da língua.

Desta forma, o nosso protocolo de tratamento foi realizado a partir do oitavo dia de infecção e, como controle de morte fúngica, os animais infectados receberam tratamento com 7 doses diárias de fluconazol (**IMS/Ca+FLU**). O fluconazol bloqueia a enzima esterol 14-, promovendo danos estruturais e funcionais à membrana plasmática das células fúngicas, causando morte celular (MAERTENS, 2004; HUBER; TERÉZHALMY, 2011). Devido a sua alta absorção sistêmica (com tempo de semi-vida no soro de aproximadamente 27 a 37 h), o fluconazol tem sido recomendado para o tratamento de candidose oral em indivíduos HIV+. Como vantagens, o fluconazol atinge concentrações elevadas no ambiente inflamado, não

5 Resultados e Discussão

necessita de um pH gástrico baixo para a sua absorção e é excretado na sua maioria, aproximadamente 80%, através dos rins (JIN *et al.*, 2009).

De fato, no presente trabalho, os resultados relacionados ao controle de morte fúngica utilizando o fluconazol a 100 mg/Kg foram satisfatórios quanto a eliminação de *C. albicans* da cavidade oral dos animais. Diferentemente dos animais infectados e não-tratados (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**) os animais do grupo **IMS/Ca+FLU** não apresentaram placas micelias, bem como não houve a presença de leveduras/hifas de *C. albicans* no dorso da língua ou no homogenato deste tecido (UFC/g). Além disso, o infiltrado inflamatório mononuclear na língua foi predominantemente leve.

A efetividade anti-fúngica do fluconazol parece ter relação com o aumento da produção das citocinas IL-23 e IL-17, como observado em homogenatos orais e vaginais de ratos, durante 14 dias pós-infecção com candidose oral e vaginal experimental, tratados diariamente. A associação de tais citocinas estimulam a imunidade adaptativa e a eliminação do patógeno das mucosas (WANG *et al.*, 2016).

Em concordância, no presente trabalho também foi detectado aumento expressivo da produção de IL-23 no homogenato da língua no grupo **IMS/Ca+FLU** em comparação aos demais grupos. Este perfil de resposta imune não foi observado sistemicamente (nos linfonodos cervicais) nos animais deste mesmo grupo, mostrando uma correlação do efeito anti-*Candida* deste fármaco sintético diretamente com a resposta imune localizada.

No entanto, de modo similar àquele encontrado na análise toxicológica dos animais saudáveis (não infectados – grupo **FLU**), características indicativas de estresse (piloereção e feridas na cauda), bem como alterações macroscópicas e microscópicas, em maior quantidade e com maior frequência, foram observadas nos fígados e rins dos animais do grupo **IMS/Ca+FLU** em comparação com os grupos controle da infecção e, especialmente, com o grupo tratado com a romã. Assim, o tratamento com fluconazol resultou em esteatose macrovesicular (em 100% dos campos avaliados), esteatose microvesicular (95%) e micro-hemorragia (71%). Além disso, tumefação tecidual, regiões periféricas enegrecidas, presença de cisto, micro-hemorragia (31,3%) e perda/diminuição do espaço de Bowman (45%) foram detectados nos rins desses animais tratados com fluconazol.

Considerando estes resultados sobre fluconazol, podemos dizer que

5 Resultados e Discussão

mesmo que sua atividade antifúngica tenha sido eficaz por meio da erradicação da infecção por *C. albicans* na cavidade oral dos animais, o tratamento com sucessivas administrações deste fármaco sintético, em nosso modelo experimental de candidose oral, demonstrou ser potencialmente hepatotóxico e nefrotóxico para camundongos BALB/c infectados. Estes achados reforçam a importância da descoberta de fitomedicamentos biocompatíveis e com potencial antimicrobiano, como é o caso de *P. granatum*.

Nossos resultados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* apresenta um importante potencial anti-*Candida*. De forma similar aos animais infectados e tratados com fluconazol, os animais tratados com *P. granatum* (**IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**) apresentaram redução da infecção por *C. albicans* e melhora dos padrões clínicos da doença induzida experimentalmente. Em resumo, após 4 dias de tratamento, o peso corporal destes animais tendeu a se restabelecer parcialmente; e, em relação aos controles da infecção (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**), apresentaram as menores médias de percentual de perda de peso (-11% e -11,85% respectivamente a **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**), o menor percentual de áreas com placas micelias no dorso da língua e as menores médias de escores clínicos. Em acordo, as características microscópicas revelaram, independentemente da concentração de *P. granatum*, ao final do tratamento com as 7 doses diárias, uma redução da quantidade de células fúngicas e de células inflamatórias no dorso da língua, além da recuperação da integridade epitelial incluindo as papilas filiformes, principalmente em comparação ao grupo **IMS/Ca**.

Novamente, em concordância com as análises anteriores, a quantificação de UFCs, a partir do homogenato da língua dos animais tratados com *P. granatum*, foi significativamente menor do que nos grupos controle da infecção (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**). Na maior concentração (**IMS/Ca+Pg300**), a quantidade de UFCs foi semelhante àquela do grupo **IMS/Ca+FLU**. A partir dessa análise microbiológica, podemos afirmar que o extrato da casca da romã apresenta alta eficácia antifúngica contra candidose oral experimental em camundongos BALB/c.

Bassiri-Jahromi *et al.* (2018) avaliaram a atividade antifúngica *in vivo* do extrato da casca da romã contra a candidose oral em ratos *Wistar* e compararam os resultados com a nistatina, um fármaco sintético utilizado em infecções orais por *Candida*. O tratamento foi iniciado utilizando 3 diferentes concentrações do extrato (125, 250 e 500 µg/mL/kg) e uma de nistatina (100.000 U/mL/kg), via gavagem

5 Resultados e Discussão

diariamente por 15 dias. Independentemente da concentração da romã, a fruta resultou em importante atividade antifúngica, comparável à nistatina, em acordo com nossos achados (BASSIRI-JAHROMI *et al.*, 2018).

No presente trabalho, além da verificação do potencial antifúngico, *P. granatum* mostrou ação hepatoprotetora nos animais infectados, ao final do tratamento, já que apresentaram redução total de esteatose micro ou macrovesicular, bem como menores valores percentuais de vasos hiperêmicos, micro-hemorragias e alteração hidrópica em comparação aos animais infectados e não tratados (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**).

Os fitoconstituintes da classe dos taninos, como punicalagina e punicalina, amplamente presentes no extrato das cascas da romã, exercem atividade antioxidante e hepatoprotetora, e atuam na redução dos níveis séricos de TGO/TGP (LIN *et al.*, 2001). Em animais infectados com *Plasmodium chabaudi*, o tratamento com 300 mg/Kg da suspensão do extrato de casca de romã, por 6 dias, resultou também em efeito hepatoprotetor, com recuperação da integridade estrutural da membrana hepatocelular, interrupção de alterações morfológicas em hepatócitos e leucócitos sinusoidais, e prevenção da apoptose em hepatócitos (HAFIZ *et al.*, 2016). Além desses achados, outros autores demonstraram que o tratamento com 300 mg/Kg de *P. granatum* por 6 dias induz a atividade antimalárica no hospedeiro, atenuando as respostas inflamatórias e o estresse oxidativo, e melhorando a resposta imune inata (MUBARAKI *et al.*, 2016).

Com relação aos rins, no presente estudo, os animais infectados e não tratados (**IMS/Ca** e **IMS/Ca+7d**) apresentaram raras alterações corticais, como por exemplo focos de micro-hemorragia e de perda/diminuição do espaço de Bowman. O tratamento com *P. granatum* resultou em ausência total de alterações renais, o que nos sugere um papel nefroprotetor, embora não tenha havido diferenças estatisticamente significativas entre os grupos não tratados (**IMS/Ca** ou **IMS/Ca+7d**) e os grupos tratados com *P. granatum* (**IMS/Ca+Pg150** ou **IMS/Ca+Pg300**).

De fato, o tratamento com os extratos da casca da romã tem revelado potencial regenerador dos tecidos renais, em ratos com urolitíase induzida *in vivo*, bem como nefroprotetor, atenuando o aumento de marcadores séricos relacionados a função renal, e reduzindo a apoptose e o estresse oxidativo das células renais, em camundongos com injúria renal induzida *in vivo* por cisplatina via intra-peritoneal (SINGH *et al.*, 2011; RATHOD *et al.*, 2012, EL-HABIBI, 2013; KARWASRA *et al.*,

2016).

***Punica granatum* apresenta papel imunomodulador no tratamento da candidose oral experimental**

Após as administrações diárias com o extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*, foi possível observar ainda que, em animais infectados por *C. albicans*, a romã modulou a resposta imune localizada (língua), já que o perfil de citocinas nos linfonodos cervicais dos animais tratados (grupos **IMS/Ca+FLU**, **IMS/Ca+Pg150** e **IMS/Ca+Pg300**) foi semelhante àquele observado nos animais infectados, porém não tratados, no período mais tardio da doença induzida (grupo **IMS/Ca+7d**), com exceção da citocina IL-10 (**IMS/Ca+Pg300 vs IMS/Ca+7d**) (**Figura 18**). Assim, os linfonodos cervicais, após os tratamentos nos animais, revelaram um perfil de citocinas que reflete uma dinâmica de produção inerente do transcorrer do tempo (com o restabelecimento à normalidade), no modelo experimental utilizado por nós, e não como consequência dos tratamentos (ver **Figuras 13 e 14**).

Por outro lado, no local da infecção (língua), houve a detecção de níveis aumentados de citocinas pró- e anti-inflamatórias fortemente relacionados com o tratamento com *P. granatum* (**Figuras 16 e 17**). Estes níveis aumentados independem ou não são inerentes ao tempo transcorrido no modelo experimental, nem tampouco com a infecção, já que não foram verificados na língua dos animais do grupo **IMS/Ca+7d** nem do grupo **IMS/Ca**, respectivamente (quando vs **CTRL**).

Assim, merecem destaque as citocinas IL-10 e TGF- β 1, assim como MIP-1 α e TGF- β 2 na comparação **IMS/Ca+Pg150/300 vs IMS/Ca**; e as citocinas IL-10, IL-1 β , MIP-1 α e TGF- β 1 na comparação **IMS/Ca+Pg150/300 vs IMS/Ca+7d**. Com a primeira comparação (ver **Figura 16**), pudemos verificar a modulação causada por *P. granatum*, após 7 dias de tratamento, iniciado em animais com candidose oral estabelecida (no dia 7). A segunda comparação (ver **Figura 17**) trouxe-nos uma comprovação adicional que *P. granatum* foi o responsável por essa modulação imune; não ocorrendo, portanto, em função do restabelecimento imunológico dos animais com o passar do tempo (até dia 14), cuja ocorrência foi previamente discutida. Além desses parâmetros, os resultados observados nos homogenatos das línguas dos animais saudáveis e que receberam administrações de 300mg/mL de *P. granatum* (grupo **Pg300**) fortalecem a participação desse extrato na indução de

5 Resultados e Discussão

níveis aumentados dessas citocinas. Os níveis de IL-10, TGF- β (1 e 2) e MIP-1 α foram maiores *in situ* nos animais do grupo **Pg300** em comparação aos grupos **IMS/Ca+Pg300**, **IMS/Ca**, **IMS/Ca+7d** ou **CTRL** (ver **Figura 20**)

Portanto, a partir destes resultados, podemos sugerir que, na candidose oral localizada, *P. granatum* foi um imunomodulador e que tal ação foi elaborada, especialmente, no local da infecção, considerando o modelo experimental *in vivo* utilizado neste trabalho. Além disso, tal imunomodulação foi mais evidente após tratamento com a maior concentração utilizada de *P. granatum*, e apresentou-se por meio da maior produção (supreregulação) de citocinas pró-inflamatórias e, principalmente, anti-inflamatórias. Deve-se ressaltar que a imunomodulação de *P. granatum* ocorreu em paralelo à sua ação anti-*Candida*, o que pode ter influenciado ou disparado o destino deste processo imunomodulatório.

De forma concordante, utilizando o modelo experimental *in vivo* de *G. mellonella*, nós já havíamos verificado que o tratamento com *P. granatum* resulta em imunomodulação, já que observamos uma redução significativa no número de hemócitos nas larvas 24 h pós-infecção por *C. albicans*, em comparação com larvas infectadas, mas que receberam a profilaxia com múltiplas doses de *P. granatum*. Esses dados indicaram que o extrato de romã contribui para o fortalecimento da resposta imune em larvas infectadas, atenuando a diminuição expressiva de hemócitos provocada pelo fungo (ALMEIDA *et al.*, 2018b).

Em seguida, os resultados do presente trabalho oportunizaram-nos a refletir sobre a vantagem da imunomodulação observada na história da doença induzida experimentalmente pelo fungo *C. albicans*, por meio deste modelo. Em resumo, no momento do estabelecimento da doença (dia 7), os níveis de citocinas anti-inflamatórias e, principalmente, pró-inflamatórias tornaram-se aumentados, tendendo para um predomínio de resposta Th1/Th17, em especial *in situ* (**IMS/Ca vs CTRL** - língua). O extrato de *P. granatum*, testado como tratamento, reduziu expressivamente a carga fúngica e também modulou a resposta imune, induzindo uma maior produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, tendendo para um predomínio de resposta Th2/Treg (**IMS/Ca+Pg150/300 vs IMS/Ca+7d** ou **IMS/Ca**). Dentre essas citocinas, a maioria não havia sido ainda identificada nas outras comparações, considerando os dados obtidos nos homogenatos da língua dos animais tratados com *P. granatum*. Essas citocinas são a IL-10, o TGF- β (1 e 2) e a MIP-1 α , sendo que ambas as concentrações de *P. granatum* resultaram em

5 Resultados e Discussão

aumento de IL-10 e TGF- β 1 na língua, e nas 2 comparações realizadas (IMS/Ca+Pg150/300 vs IMS/Ca; e IMS/Ca+Pg150/300 vs IMS/Ca+7d).

Possivelmente, a produção estimulada de IL-10 e TGF- β (1 e 2) que observamos, após o tratamento com extrato das cascas de *P. granatum* em animais infectados, reflete um importante papel anti-inflamatório e imunorregulador, que pode estar associado com regulação de células T efetoras (GAFFEN, 2008; OCHS; OUKKA; TORGERSON, 2009; VILA *et al.*, 2020), controlando a imunidade anti-fúngica (MURPHY, 1989), assim como com a prevenção da eliminação completa do fungo, permitindo o desenvolvimento de células T de memória (ROMANI; BISTONI; PUCETTI, 2002). De fato, Larrosa *et al.* (2006) demonstraram ação anti-inflamatória da punicalagina *in vitro* e associaram este potencial com a liberação de seu produto de hidrólise, o ácido elágico (LARROSA *et al.*, 2006).

Em acordo, os polifenóis de *P. granatum* têm sido associados com a indução do fenótipo M2 em macrófagos, uma vez que aumentam a expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10; resultando em atenuação da inflamação e de uma resposta imune exacerbada, protegendo os tecidos (AHARONI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2017b).

Anteriormente realçamos a maior produção de MIP-1 α , no processo de imunomodulação de *P. granatum* no modelo experimental, utilizado por nós. Esses achados corroboram outros trabalhos envolvendo extratos ricos em polifenóis (ORSOLIC; BASIC, 2005; COSTANTINI *et al.*, 2014; ATHAYDES *et al.*, 2019). Sendo uma citocina pró-inflamatória, o papel da MIP-1 α , juntamente com IL-1 β e TGF- β , pode estar relacionado com o recrutamento de monócitos e neutrófilos para o foco inflamatório, importantes células de defesa contra o fungo *C. albicans* (ORSOLIC; BASIC, 2005; ATHAYDES *et al.*, 2019).

Por fim, considerando todos os resultados obtidos neste trabalho, o extrato das cascas de *P. granatum* apresentou alto potencial antifúngico contra *C. albicans* em camundongos BALB/c com candidose oral, comparável ao fluconazol. Além disso, as administrações diárias de *P. granatum* proporcionaram ação anti-inflamatória e não causaram efeitos colaterais, diferentemente do tratamento com fluconazol. Esses achados destacam o potencial do referido extrato como uma opção profilática ou terapêutica eficaz para a candidose oral, pois é uma terapia não tóxica, segura, tolerável, hepatoprotetora e, possivelmente, anti-inflamatória. Estudos farmacológicos mais específicos são necessários, com o objetivo de

5 Resultados e Discussão

desenvolver uma formulação viável para novos estudos, envolvendo pacientes com candidose oral.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Capítulo 1

- ✓ As larvas de *G. mellonella* infectadas e tratadas profilaticamente ou terapêuticamente com *P. granatum* sobreviveram por mais tempo do que as larvas infectadas e não tratadas.
- ✓ A administração profilática com múltiplas doses do extrato de *P. granatum* permitiu que mais larvas sobrevivessem à infecção por mais tempo, além de aumentar a densidade de hemócitos na hemolinfa em comparação com as larvas não tratadas.
- ✓ A romã apresenta atividade antifúngica e imunomoduladora contra candidose sistêmica no modelo experimental invertebrado de *G. mellonella*, principalmente após profilaxia com doses múltiplas.

Capítulo 2

- ✓ Similar ao fluconazol, o tratamento via gavagem, com 7 administrações diárias de extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* (principalmente a 300 mg/Kg), apresentou alto potencial antifúngico em camundongos BALB/c com candidose oral, induzida experimentalmente após 7 dias de infecção por *C. albicans*.
- ✓ O tratamento via gavagem, com 7 administrações diárias de extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* (principalmente a 300 mg/Kg), modulou a resposta imune, possivelmente por meio de uma ação anti-inflamatória localizada, elevando principalmente a produção de IL-10 e TGF- β 1 em camundongos BALB/c com candidose oral, induzida experimentalmente após 7 dias de infecção por *C. albicans*.
- ✓ A administração diária, por 7 dias, de extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* não causou efeitos colaterais em camundongos BALB/c saudáveis (não infectados) ou infectados experimentalmente, de forma contrária ao fluconazol que se apresentou hepato e nefrotóxico.

Por fim, ambos os modelos experimentais *in vivo* de candidose sistêmica (*G. mellonella*) ou oral (camundongos BALB/c) permitiram, de maneira eficaz e

6 Conclusões

colaborativa, a avaliação da atividade antifúngica e imunomoduladora de *P. granatum*. Sendo assim, foram aceitas as hipóteses testadas, ou seja, as administrações com o extrato hidroalcoólico das cascas de *P. granatum* 1) reduziram a carga fúngica de *C. albicans* e 2) desempenharam papel imunoprotetor no tratamento da candidose sistêmica e localizada.

Adicionalmente, *P. granatum* pode constituir uma opção para a prevenção e/ou tratamento da candidose oral, pois é tolerável, hepatoprotetora, imunoprotetora e não tóxica, diferentemente do fluconazol.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Polyphenols from green tea and pomegranate for prevention of prostate cancer. **Free Radical Res**, v. 40, p. 1095–104, 2006.
- AFAQ, F.; MALIK, A.; SYED, D.; MAES, D.; MATSUI, M. S.; MUKHTAR, H. Pomegranate fruit extract modulates UV-B mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. **Photochem Photobiol**, v. 81, p. 38–45, 2005.
- AFAQ, F.; ZAID, M. A.; KHAN, N.; DREHER, M.; MUKHTAR, H. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. **Exp Dermatol**, v. 18, p. 553-61, 2009.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, e472508, 2008.
- AHARONI, S.; LATI, Y.; AVIRAM, M.; FUHRMAN B. Pomegranate juice polyphenols induce a phenotypic switch in macrophage polarization favoring a M2 anti-inflammatory state. **Biofactors**, v. 41, n. 1, p. 44-51, 2015. doi:10.1002/biof.1199.
- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **Int J Food Microbiol**, v. 134, p. 244-8, 2009.
- ALMEIDA, A. S.; et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 44, n. 6, p. 429-432, Dec. 2008.
- ALMEIDA, N. L. M.; SALDANHA, L. L.; DA SILVA, R. A.; et al. Antimicrobial activity of denture adhesive associated with *Equisetum giganteum*- and *Punica granatum*-enriched fractions against *Candida albicans* biofilms on acrylic resin surfaces. **Biofouling**, v. 34, n. 1, p. 62-73, 2018a. doi:10.1080/08927014.2017.1407408.
- ALMEIDA, N. L. M.; FIGUEIREDO-GODOI, L. M. A.; VENTURINI, J.; et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of pomegranate in the systemic candidiasis on *Galleria mellonella*. **J Clin Exp Tox**, v.2, n.2, p.8-17, 2018b. doi: 10.4066/2630-4570.014.
- AMERONGEN, A.; VEERMAN, E. Saliva: The defender of the oral cavity. **Oral Dis**, v. 8, p. 12–22, 2002.
- ANIBAL, P. C. **Potencial de ação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e**

Referências

Staphylococcus aureus. 2007. 71 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Campinas, SP, 2007.

ANIBAL, P. C. **Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de Punica granatum L. (romã) sobre Candida spp.** 2010. 122 p. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP, 2010.

ANIBAL, P. C.; PEIXOTO, I. T.; FOGLIO, M. A.; HOFLIHG, J. F. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 839-48, 2013.

ARUN, N.; SINGH, D. *Punica granatum*: a review on pharmacological and therapeutic properties. **Int J Pharmaceut Sci Res**, v. 3, n. 5, p. 1240-1245, 2012.

ASHHURST, D. E.; RICHARDS, G. Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella*. **J Morphol**, v. 114, p. 247-53, 1964.

ATHAYDES, B. R.; ALVES, G. M.; ASSIS, A. L. E. M.; et al. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. **Food Res Int**, v. 119, p. 751-760, 2019. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.057.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; GAITINI, D.; NITECKI, S.; HOFFMAN, A.; DORNFELD, L.; et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intimamedia thickness, blood pressure and LDL oxidation. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 423–33, 2004.

AVIRAM, M.; VOLKOVA, N.; COLEMAN, R.; DREHER, M.; REDDY, M. K.; FERREIRA, D.; et al. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: Studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 1148–57, 2008.

BARANOWSKA, M.; BARTOSZEK, A. Antioxidant and antimicrobial properties of bioactive phytochemicals from cranberry. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 70, p.1460-1468, 2016. Published 2016 Dec 31. doi:10.5604/17322693.1227896.

BARTLETT, J. G.; GALLANT, J. E.; PHAM, P. A. (org). **Medical Management of HIV Infection**. 2. ed. Baltimore: Knowledge Source Solutions, 1998. p. 87-105.

BASSIRI-JAHROMI, S.; POURSHAFIE, M. R.; MIRABZADE ARDAKANI E.; EHSANI A. H.; DOOSTKAM A.; KATIRAE F.; MOSTAFAVI, E. *In Vivo* Comparative Evaluation of the Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract as an Alternative Agent to Nystatin against Oral Candidiasis. **Iran J Basic Med Sci**, v. 43, n. 3, p. 296–304, 2018.

Referências

- BECK-SAGUÉ, C. M.; JARVIS, W. R. The National nosocomial fungal surveillance system. secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980- 1990. **J. Infec. Dis**, v. 167, p. 1247-1251,1993.
- BELL, C.; HAWTHORNE, S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer-a mini review. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, p. 139–144, 2008.
- BERTOLAMI, N. C., Mecanismos de Hepatotoxicidade, São Paulo, SP, Brasil, v. 85, out 2005 [OnLine] Disponível em: < www.scielo.com > acesso em 28 de fevereiro de 2008.
- BHADBHADDE, S. J.; ACHARYA, A. B.; RODRIGUES, S. V.; THAKUR, S .L. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. **Quintessence Int**, v. 42, n. 1, p. 29-36, 2011.
- BHASKARAN, N.; WEIBERG, A.; PANDIYAN P. Th17 inflammation model of oropharyngeal candidiasis in immunodeficient mice. **J Vis Exp**, v. 96, e52538, 2015. Published 2015 Feb 18. doi:10.3791/52538.
- BHASKARAN, N.; QUIGLEY, C.; PAW, C.; BUTALA, S.; SCHNEIDER, E.; PANDIYAN P. Role of Short Chain Fatty Acids in Controlling T_{regs} and Immunopathology During Mucosal Infection. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1995, 2018. Published 2018 Aug 24. doi:10.3389/fmicb.2018.01995.
- BOFF, E.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T.; SCHEID, L. A.; LORETO, E.; DAL FORNO, N. F.; AQUINO, V.; SEVERO, L. C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Reavaliação da suscetibilidade de Candida à Anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, p. 36-40, 2008.
- BONELLA, A. E. Animais em laboratórios e a lei Arouca. **Sci. Stud**, v. 7, n. 3, p. 507-514, 2009.
- BONIFAZI. P.; ZELANTE, T.; D'ANGELO, C.; et al. Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal Candida albicans. **Mucosal Immunol**, v.2, n. 4, p. 362-374, 2009. doi:10.1038/mi.2009.17.
- BRIGHENTI, V.; GROOTHUIS, S. F.; PRENCIPE, F. P.; AMIR, R.; BENVENUTI, S.; PELLATI, F. Metabolite fingerprinting of Punica granatum L.(pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v.1480, p. 20-31, 2017.
- BURGESS, D. S.; HASTINGS, R. W.; SUMMERS, K. K.; HARDIN, T. C.; RINALDI, M. G. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole and amphotericin B against Candida albicans. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 36, p. 13-18, 2000.
- BURT, A. D.; MUTTON, A.; DAY, C. P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. **Semin Diagn Pathol**, v. 15, p. 246-258, 1998.

Referências

- BRUNS, D., SAVORY, J., TITHERADGE, A. Evaluation of the IFCC-recommended procedure for serum aspartate aminotransferase as modified for use. **Dig. Dis. Sci.**, v. 28, p. 35, 2009.
- BRUNETON, J. (org). **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. 1. ed. Zaragoza, Espanha. Ed. Acribia, AS. 1991.
- BUSTAMANTE, C. I. Treatment of Candida infection: a view from the trenches. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, p. 490-495, 2005.
- CALANI, L.; et al. Ultra-HPLC–MSⁿ (Poly)phenolic profiling and chemometric analysis of juices from ancient Punica granatum L. cultivars: A nontargeted approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5600-5609, 2013.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of Candida albicans. **Trends Microbiol**, v.9, n.7, p.327-335, 2001 doi:10.1016/s0966-842x(01)02094-7.
- CALDERONE, R. A. Introduction and historical perspectives. In Candida and Candidiasis; Calderon, R.A., Ed.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2002; pp. 3–13. CAMPOS DABUS, D. F.; LIMA, D. M. M.; TRENTIN, G. S.; LÉO, T. C.; FAZOLARO, V. HEPATOTOXIDADE DOS ANTIFÚNGICOS. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 12, 2009.
- CALDERONE, R.E. Candida and Candidiasis. 2. ed. ASM Press: Washington, DC, USA, 2012. 40. Mathe, L.; Van Dijck, P. Recent insights into Candida albicans biofilm resistance. **Curr. Genet**, v. 59, p. 251–264, 2013.
- CANTÓN, E.; VIUDES A.; PERMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. **Rev Iberam Micol**, v. 18, p. 51-55, 2001.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; BRIÓ, S.; QUINDÓS, G. 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. **Rev Iberam Micol**, v. 18, p. 2-5, 2001.
- CASAROTO, A. R.; LARA, V. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. **Fitoterapia**, v. 81, p. 323-328, 2010.
- CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. O.; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico de Punica granatum linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de Staphylococcus aureus. **Rev Bras Anal Clin**, v. 38, p. 111-4, 2006.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.3, Julho-Setembro. 2004,
- CELIK, I.; TEMUR. A.; ISIK I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (Punica granatum) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 47, n. 1, p. 145-149, 2009. doi:10.1016/j.fct.2008.10.020

Referências

CHAMILOS, G.; et al. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. **J Infect Dis**, v. 193, p. 1014–1022, 2006.

CHAMILOS, G.; LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D; P. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. **Lancet Infect Dis**, v. 7, p. 42–55, 2007.

CHAMILOS, G.; NOBILE, C. J.; BRUNO, V. M.; LEWIS, R. E.; MITCHELL, A. P.; KONTOYIANNIS, D. P. *Candida albicans* Cas5, a Regulator of cell wall integrity, is required for virulence in murine and Toll mutant fly models. **J Infect Dis**, v. 200, p. 152–157, 2009.

CELLA M.; FUCHS A.; VERMI, W.; et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 722-725, 2009. doi:10.1038/nature07537

CHEN, Y.; LIN, L.; TAO, X.; SONG, Y.; CUI, J.; WAN J. The role of podocyte damage in the etiology of ischemia-reperfusion acute kidney injury and post-injury fibrosis. **BMC Nephrol**, v. 20, n. 1, p. 106, 2019. Published 2019 Mar 28. doi:10.1186/s12882-019-1298-x

CHIHANGA, T.; MA, Q.; NICHOLSON, J. D.; et al. NMR spectroscopy and electron microscopy identification of metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 314, n. 2, p. 154-166, 2018. doi:10.1152/ajprenal.00363.2017

CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO D. M. M.; NUNES R. S.; Fakhouri R, Rodrigues AS, Teixeira-Silva F 2008. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18 (Supl.), p. 739-743, 2008.

CRUZ, A. S. **Teste de Citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de draize na avaliação de produtos cosméticos**. 2003. 107p. Tese (Doutorado Produção e Controles Farmacêuticos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHIN, M. I.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diag Microbiol Inf Dis**, v. 34, p. 281-286, 1999.

COLOMBO, A. L.; DA MATTA, D.; DE ALMEIDA, L. P.; ROSAS, R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. **J Infect Dis**, v. 6, p. 118-123, 2002.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

Referências

- COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **N Engl J med**, v. 330, p. 262-72, 1994.
- CONTI, H. R.; SHEN, F.; NAYYAR N, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J Exp Med**, v. 206, n. 2, p. 299-311, 2009. doi:10.1084/jem.20081463.
- CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. **Microbes Infect**, v. 12, p. 518–527, 2010.
- CONTI, H. R.; BRUNO, V. M.; CHILDS, E. E.; DAUGHERTY, S.; HUNTER, J. P.; MENGESHA, B. G.; SAEVIG, D. L.; HENDRICKS, M.; COLEMAN, B. M.; BRANE, L.; et al. IL-17 receptor signaling in oral epithelial cells is critical for protection against oropharyngeal candidiasis. **Cell Host Microbe**, v. 20, p. 606–617, 2016.
- COSTA, M; PASSOS, X. S.; MIRANDA, A. T. B.; DE ARAUJO, R. S. C.; PAULA, C. R.; SILVA, M. R. R. Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. **Mycophatol**, v. 157: 43-47, 2004.
- COSTA, C. R.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K.; et al. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 52, n. 3, p.139-143, 2010. doi:10.1590/s0036-46652010000300005.
- COSTA, A. C.; CAMPOS RASTEIRO, V. M.; DA SILVA HASHIMOTO, E. S.; ARAUJO, C. F.; PEREIRA, C. A.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 114, n. 1, p. 67-74, Jul. 2012.
- COSTA, A. C.; PEREIRA, C. A.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 391-399, 2013. doi:10.4161/viru.25199.
- COSTATINI, S.; RUSOLO, F.; DE VITO, V.; MOCCIA, S.; et al. Potential anti-inflammatory effects of the hydrophilic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil on breast cancer cell lines. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 6, p. 8644–8660, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules19068644>.
- COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol**, v. 335, n. 1, p. 2-13, 2011. doi:10.1016/j.mce.2010.04.005.
- CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. **Nat. Rev. Immunol**, v. 10, p. 479–489, 2010.
- CUENCA-ESTRELA, M.; MELLADO, E.; GUERRA, T. M. D.; MONZÓN, A.; TUDELA, J. L. R. Susceptibility of fluconazole- resistant clinical isolates of *Candida*

Referências

- spp to echinocandin LY303366, itraconazol and amphotericin B. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, p. 475-477, 2000.
- CUNHA, Luiz C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2009, vol.19, n.2a [cited 2020-04-30], pp.403-411.
- DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; et al. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. **Microb Pathog**, v. 117, p. 128-138, 2018. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.028.
- DE CAMPOS RASTEIRO, V. M.; DA COSTA, A. C.; ARAÚJO, C. F, DE BARROS, P. P; et al. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. **BMC Complement Altern Med.**, v. 15, p. 14:489, 2014.
- DE FREITAS, A. L. D.; KAPLUM, V.; ROSSI, D. C. P.; et al. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. **J Ethnopharmacol**, v. 216, p.184-190, 2018. doi:10.1016/j.jep.2018.01.008.
- DE LUCA, A.; BOZZA, S.; ZELANTE, T.; et al. Non-hematopoietic cells contribute to protective tolerance to *Aspergillus fumigatus* via a TRIF pathway converging on IDO. **Cell Mol Immunol**, v. 7, n. 6, p. 459-470, 2010. doi:10.1038/cmi.2010.43.
- DESAI, J. V. *Candida albicans* hyphae: From growth initiation to invasion. **J. Fungi**, v. 4, p. 10, 2018.
- DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. **Adv Appl Microbiol**, v. 78, p. 25–53, 2012.
- DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MEDEIROS, A. C. D.; MALTA-JUNIOR, A. Momento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Universitária/UFPB, p. 148-153, 1997.
- DJIPA C. D, DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) alston (Myrtaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 71, n. 1-2, p. 307-13, Jul. 2000.
- DUMAN, A. D.; OZGEN, M.; DAYISOYLU, K. S.; ERBIL, N.; DURGAC, C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. **Molecules**, v. 14, p. 1808-17, 2009.
- DURAI PANDIYAN, V.; AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complement Altern Med**, v. 6, p. 1-7, 2006.

Referências

DUVNJAK, M.; LEROTIC, I.; BARSIC, N.; et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 13, p. 4539-4550, 2007.

EDGERTON, M.; KOSHLUKOVA, S.; LO, T.; CHRZAN, B.; STRAUBINGER, R.; RAJ, P. Candidacidal activity of salivary histatins. **J. Biol. Chem**, v. 272, p. 20438–20447, 1998.

EL-HABIBI, E. M. Renoprotective effects of Punica granatum (pomegranate) against adenine-induced chronic renal failure in male rats. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, p. 2059–2069, 2013.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Res Microbiol**, v. 161, n. 7, p. 534-4, 2010.

ESTHER LYDIA, D.; KHUSRO, A.; IMMANUEL, P.; et al. Photo-activated synthesis and characterization of gold nanoparticles from Punica granatum L. seed oil: An assessment on antioxidant and anticancer properties for functional yoghurt nutraceuticals. **J Photochem Photobiol B**, v. 206, e 111868, 2020. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.111868.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY (EUCAST). Testing of the European Society of Clinical, M.; Infectious, D. Eucast. Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobials agents by agar dilution. **Clin Microbial Infect**, v. 6, n. 9, p. 509-15, 2000.

EYERICH, S.; WAGENER, J.; WENZE, V.; et al. IL-22 and TNF- α represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*. **Eur J Immuno**, v. 41, n. 7, p.1894-1901, 2011. doi:10.1002/eji.201041197.

FARAH, C. S.; ELAHI, S.; PANG G.; et al. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. **Infect Immun**, v. 69, n.10, p. 6110-6118, 2001. doi:10.1128/IAI.69.10.6110-6118.2001.

FARIA, A.; CALHAU, C. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 51, p. 626–634, 2011.

FASSATI, P.; PONTI, M.; PARIS, P. Kinetic colorimetric assay of lipase in serum. **Clin. Chem**, v. 38, p. 211 - 215, 2012.

FESTI, D.; COLECCHIA, A.; SACCO, T.; BONDI, M.; RODA, E.; MARCHESINI, G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obes Rev**, v. 5, p. 27-42, 2004.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. Manual de medicina alternativa para o profissional. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2000, p. 590-592.

Referências

- FLECK, R.; HOF, H. Breakpoints for posaconazole susceptibility testing: background and discussion about the need of establishing values. **Mycoses**, v. 51, p. 1-4, 2008.
- FIDEL, P. L. J. Candida-host interactions in HIV disease implications for oropharyngeal candidiasis. **Adv. Dent. Res**, v. 23, p. 45–49, 2011.
- FIDEL, P. J. Immunity to Candida. **Oral Dis**, v. 8, p. 69–75, 2002.
- FRAZER, V. J.; JONES, M.; DUNKEL, J.; STROFER, S.; MEDOFF, G.; DUNAGAN, W. C. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. **Clin Infect Dis**, v. 15, p. 414-421, 1992.
- FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, p. 499-511, 1996.
- FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 346–351, 2006.
- FUCHS, B. B.; EBY, J.; NOBILE, C. J.; EL KHOURY, J. B.; MITCHELL, A. P.; MYLONAKIS, E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. **Microbes Infect**, v. 12, p. 488–96, 2010a.
- FUCHS, B.B.; O'BRIEN, E.; KHOURY, J.B.; MYLONAKIS, E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, p. 475-82, 2010b.
- GAFFEN, S.; HERNANDEZ-SANTOS, N.; PETERSON, A. IL-17 Signaling in host defense against *Candida albicans*. **Immunol. Res**, v. 50, p. 181–187, 2011.
- GARCIA-CUESTA, C.; SARRION PÉREZ, M. G.; BAGÁN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **J. Clin. Exp. Dent**, v. 6, p. 576–582, 2014.
- GARCÍA-VILLALBA, R.; et al. Validated method for the characterization and quantification of extractable and nonextractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits, juices, and extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 6555-6566, 2015.
- GARFIELD, K.; LESLIE, S. W. Simple Renal Cyst. In StatPearls. StatPearls Publishing, 2020.
- GEORGOPAPADAKOU, N.; WALSH, T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, p. 279-291, 1996.
- GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 4581-9, 2000.

Referências

- GHANNOUM, M. A.; HOSSAIN, M. A. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. **Expert Opinion on Invest Drugs**, v. 9, p. 1797-1813, 2000.
- GHILARD, N.; OUYANG W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells. **Semin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 383-93, 2007.
- GLADIATOR, A.; WAGLER, N.; TRAUTWEIN-WEIDNER, K.; LEIBUND-GUTLANDMANN, S. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. **J. Immunol**, v. 190, p. 521–525, 2013.
- GLAMPEDAKIS, E.; COSTE, A. T.; ARUANNO, M.; et al. Efficacy of Antifungal Monotherapies and Combinations against *Aspergillus calidoustus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 12, e01137-18, 2018. Published 2018 Nov 26. doi:10.1128/AAC.01137-18.
- GOMES, L. A. P.; FIGUEIREDO, L. M. A.; PALMA, A. L. R.; GERALDO, B. M. C.; CASTRO, K. C. I.; FUGISAKI, L. R. O.; JORGE, A. O. C.; DE OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA, J. C. *Punica granatum* L. (Pomegranate) Extract: *In Vivo* Study of Antimicrobial Activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* Model. **Sci World J**, e8626987, 2016.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; TOSELLI, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CABONI, M. F. Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC–DAD–ESI-MS. **J. Agric. Food Chem**, v. 61, p. 5328-5337, 2013.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. 2003. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, p.179-198.
- GOW, N. A.; NETEA, M. G.; MUNRO, C. A.; FERWERDA, G.; BATES, B.; MORA-MONTES, H. M.; WALKER, I.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; TSONI, V.; et al. Immune recognition of *Candida albicans* β -glucan by dectin-1. **J. Infect. Dis**, v. 196, p. 1565–1571, 2007.
- GOW, N.A.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 15, p. 406–412, 2012.
- GOW, N. A.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 10, p. 112–122, 2012.
- GRAMLICH, T.; KLEINER, D. E.; MCCOLLOUGH, A. J.; et al. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Hum Pathol**, v. 35, p. 196-199, 2004.
- GUALCO, L.; DEBBIA, E. A.; BANDETTINI, R.; PESCIETTO, L.; CAVALLERO, A.; OSSI, M. C.; SCHITO, A. M.; MARCHESE, A. Antifungal resistance in *Candida* spp isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. **International J Antimicrob Agents**, v. 29, p. 179-184, 2007.

- HAFIZ, T. A.; MUBARAKI, M. A.; AL-QURAI SHY, S.; DKHIL, M. A. The potential role of *Punica granatum* treatment on murine malaria-induced hepatic injury and oxidative stress. **Parasitology research**, v. 115, n. 4, p. 1427–1433, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4876-2>
- HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends Microbiol**, v. 19, p. 557–563, 2011.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J Nat Prod**, v. 59, p. 205–15, 1996.
- HASLAM, E. **Practical polyphenols – from structure to molecular recognition and physiological action**. Cambridge: Cambridge University, 1998. 321p.
- HAYAMA, K.; ISHIBASHI, H.; ISHIJIMA, S. A.; NIIMI, K.; TANSO, S.; ONO, Y.; MONK, B. C.; HOLMES, A. R.; HARDING, D. R.; CANNON, R. D.; ABE, S. A D-octapeptide drug efflux pump inhibitor acts synergistically with azoles in a murine oral candidiasis infection model. **FEMS Microbiol Lett**, v. 328, n. 2, p. 130-7, 2012.
- HEBECKER, B.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. **Expert. Rev. Anti-Infect. Ther**, v. 12, p. 867–879, 2014.
- HELLLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and white manifestations in the oral cavity. **Head Neck Pathol**, v. 2019, n.13, p. 25–32, 2019.
- HELMERHORST, E. J.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 14637–14642, 2001.
- HISAJJMA, T.; MARUYAMA, N.; TANABE, Y.; ISHIBASHI, H.; YAMADA, T.; MAKIMURA, K.; NISHIYAMA, Y.; FUNAKOSHI, K.; OSHIMA, H.; ABE, S. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. **Microbiol Immunol**, v. 52, n.7, p. 327-33, 2008.
- HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: Virulence factors, host defense, escape strategies and the microbiota. **J. Microbiol**, v. 53, p. 149–169, 2016.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-31, 2002.
- HOLNESS, M. J.; SUGDEN, M. C. The impact of increased dietary lipid on the regulation of glucose uptake and oxidation by insulin in brown- and a range of white-adipose-tissue depots in vivo. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 23, p. 629-638, 1999.

Referências

- HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, v. 9, p. 176–180, 2001.
- HUBER, M.; TERÉZHALMY, G. Oropharyngeal candidiasis: etiology, epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Crest Oral-B**, 2011.
- ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, p. 942-9, 2006.
- JABRA-RIZK, M. A.; KONG, E.; TSUI, C.; NGUYEN, M.; CLANCY, C.; FIDEL, P.; NOVERR, M. *Candida albicans* pathogenesis: Fitting within the host-microbe damage response framework. **Infect. Immun**, v. 84, p. 2724–2739, 2016.
- JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. **Virulence**, v.5, n. 2, p. 237-239, 2014. doi:10.4161/viru.27434.
- JIN, L.; LEUNG, W.; SAMARANAYAKE, L. Oral mucosal fungal infections. **Periodontology**, v. 49, p. 39-59, 2009.
- JUNQUEIRA, J. C.; COLOMBO, C. E. D.; MARTINS, J. S.; KOGA-ITO, C. Y.; CARVALHO, Y. R.; JORGE, A. O. C. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. **Microbiol Immunol**, v. 49, n. 3, p. 199-207, 2005.
- JUNQUEIRA, J. C.; MARTINS J. S.; FARIA R. L.; COLOMBO, C. E.; JORGE, A. O. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 6, p. 877-884, 2009. doi:10.1007/s10103-009-0673-4.
- JUNQUEIRA, J. C. Models Hosts for the Study of Oral Candidiasis. **Recent Advances on Model Hosts**, v. 710, p. 95–105, 2011. doi:10.1007/978-1-4419-56385_10.
- JUNQUEIRA, J. C. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: Recent studies and new perspectives. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 474–476, 2012.
- JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, v. 13, n. 2, p. 128-144, 2008.
- KABIR, M. A.; AHMAD, Z. *Candida* infections and their prevention. **ISRN Prev Med**, e763628, 2012a. Published 2012 Nov 4. doi:10.5402/2013/763628.
- KABIR, M. A.; HUSSIAN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. **ISRN Microbiol**, e538694, 2012b. Published 2012 Sep 29. doi:10.5402/2012/538694.
- KADOSH, D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 52, p. 27–34, 2019.

Referências

- KAMAGATA-KIYOURA, Y.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H.; NITTA, T. Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. **J Infect Chemother**, v. 10, n. 4, p. 253-5, 2004.
- KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; LERTPRASERTSUKE, N.; et al. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). **J Ethnopharmacol.**, v. 9, n. 2-3, p. 359-365, 2004. doi:10.1016/j.jep.2003.10.020.
- KARWASRA, R.; KALRA P.; GUPTA, Y. K.; SAINI, D.; KUMAR, A.; SINGH, S. Antioxidant and anti-inflammatory potential of pomegranate rind extract to ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury. **Food Funct.**, v. 7, n. 7, p. 3091-3101, 2016. doi:10.1039/c6fo00188b.
- KELLY, J.; KAVANAGH, K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a nonspecific antimicrobial response. **J Med Microb**, v. 60, p. 189–96, 2011.
- KHADER, S. A.; GAFFEN, S.L.; KOLLS, J.K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. **Mucosal Immunol**, v. 2, p. 403–411, 2009.
- KHAN, N.; AFAQ, F.; KWEON, M.; KIM, K.; MUKHTAR, H. Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. **Cancer Res**, v. 67, p. 3475–82, 2007.
- KHOZA, S.; MOYO I.; NCUBE, D. Comparative Hepatotoxicity of Fluconazole, Ketoconazole, Itraconazole, Terbinafine, and Griseofulvin in Rats. **J Toxicol**. 2017;2017:6746989. doi:10.1155/2017/6746989.
- KIRCHNER, F. R.; LITTRINGER K.; ALTMEIER, S.; et al. Persistence of *Candida albicans* in the Oral Mucosa Induces a Curbed Inflammatory Host Response That Is Independent of Immunosuppression. **Front Immunol**, v. 10, p. 330, 2019. Published 2019 Feb 27. doi:10.3389/fimmu.2019.00330.
- KLEIN, R. S.; HARRIS, C. A.; SMALL, C.B.; MOLL, B.; LESSER, M.; FRIEDLAND, G. H. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med**, v. 311, p. 354–358, 1984.
- KLEPSE, M. E.; HOFFMAN, H. L.; EVANS, E. J. Novel triazole antiungal agents. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 9, p. 539-605, 2000.
- KNOKE, M.; BERNHARDT, H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. **Mycoses**, v. 49, n. 283–287, 2006.
- KOBAYASHI-SAKAMOTO M.; TAMAI R.; ISOGAI, E.; KIYOURA, Y. Gastrointestinal colonisation and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and prednisolone. **Microb Pathog**, v.117, p.191-199, 2018. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.043.

Referências

- KOH, A. Y.; KOHLER, J. R.; et al. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, e35, 2008. doi:10.1371/journal.ppat.0040035.
- KONKEL, J. E.; CHEN, W. Balancing acts: the role of TGF- β in the mucosal immune system. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 11, p. 668–676, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.002>.
- KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G.; VONK, A. G.; et al. Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 26, n. 3-4, p. 299-307, 1999. doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01402.x.
- LABSI, M.; KHELIFI, L.; MEZIOUG, D.; SOUFLI, I.; TOUIL-BOUKOFFA C. Antihydatic and immunomodulatory effects of *Punica granatum* peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis. **Asian Pac J Trop Med.**, v. 9. n. 3, p. 211-20, Mar. 2016.
- LANSKY, E. P.; JIANG, W.; MO, H.; BRAVO, L.; FROOM, P.; YU, W.; et al. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. **Invest New Drugs**, v. 23, p. 11-20, 2005.
- LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **J Ethnopharmacol**, v. 109, n. 2, p. 177-206, 2007. doi:10.1016/j.jep.2006.09.006.
- LANSKY, E.; SHUBERT, S.; NEEMAN, I. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. Symposium International Sobre El Granado (First International Symposium on the Pomegranate), Orihuela, Spain, Oct. p. 15-17, 1998.
- LAPA, A. J. (org). Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÓES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1. ed. . Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.181-196 p.
- LARROSA, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **J Nutr Biochem**, v. 17, p. 611-25, 2006.
- LATTIF, A. B.; BANERJEE, U.; PRASAD, R.; BISWAS, A.; WIG, N.; SHARMA, N.; HAQUE, A.; GUPTA, N.; BAQUER, N. Z.; MUKHOPADHYAY, G. Susceptibility pattern and molecular type of species-specific *Candida* in oropharyngeal lesions of Indian human immunodeficiency virus-positive patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 1260-1262, 2004.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol**, v. 32, p. 1295-09, 2002.
- LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W. Diagnosis and management of oral candidosis. **Br. Dent. J**, v. 223, p. 675–681, 2017.

Referências

- LI, X. S.; REDDY, M. S.; BAEY, D.; EDGERTON, M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 28553–28561, 2003.
- LI, M.; CHEN, Q.; TANG, R.; SHEN, Y.; LIU, W. The expression of beta-defensin-2,3 and LL-37 induced by *Candida albicans* phospholipomannan in human keratinocytes. **J. Dermatol. Sci**, v. 61, p. 72–75, 2011.
- LI, Y.; ZHAO, L.; ZHANG, H.; JIA, J.; LV, L.; ZHOU, G.; CHAI, Y.; ZHANG, G. Comparative pharmacokinetics of prim-Oglucosylcimifugin and cimifugin by liquid chromatography–mass spectrometry after oral administration of *Radix Saposhnikovia* extract, cimifugin monomer solution and prim-glucosylcimifugin monomer solution to rats. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 10, p. 1234 - 1240, 2012.
- LI, Z. J.; LIU, M.; DAWUTI, G.; et al. Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. **Phytother Res**, v. 31, n. 7, p. 1039-1045, 2017. doi:10.1002/ptr.5823.
- LIN, C. C.; HSU, Y. F.; LIN, T. C.; HSU, H. Y. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. **Phytother Res.**, v. 15, n. 3, p. 206-212, 2001. doi:10.1002/ptr.816.
- LIU, M. B.; XU, S. R.; HE, Y.; DENG, G. H.; SHENG, H. F.; HUANG, X. M.; OUYANG, C. Y.; ZHOU, H. W. Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. **PLoS ONE**, v. 8, e79812, 2013.
- LO, H. L.; KOHLER, J. R.; DIDOMENICO, D.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A.; FINK, G. R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, p. 939–949, 1997.
- LOPEZ-MARTINEZ R. Candidosis, a new challenge. **Clin Dermatol**, v. 28, v. 2, p. 178–84, 2010.
- LUCIO E. M. R. A.; ROSALEN, P. L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A. R. M. Avaliação toxicológica aguda e creening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev Bras Farmacogn**, v.9, n.10, p. 23–25, 2000.
- LYNCH, D. P. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. Oral Surg. Oral Med. **Oral Pathol**, v. 78, p. 189–193, 1994.
- MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R.; AMARAL, A. C. F.; SANTOS, K. R. N.; SILVA, M. G.; KUSTER, R. M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. **J Brazilian Chem Soc**, v. 13, p. 606–10, 2002.
- MADRIGAL-CARBALLO, S.; RODRIGUEZ, G.; KRUEGER, C. G.; DREHER, M.; REED, J. D. Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 324-329, 2009.

Referências

MADUGULA P.; REDDY S.; KONERU. J.; et al. "Rhetoric to Reality"- Efficacy of *Punica Granatum* Peel Extract on Oral Candidiasis: An in vitro Study. **J Clin Diagn Res**, v.11, n. 1, p.114-117, 2017. doi:10.7860/JCDR/2017/22810.9304.

MAERTENS, J. A. History of development of azole derivatives. **Clin Microbiol Infect Dis**, v.10 (Suppl. 2), p. 1-10, 2004.

MAISETTA, G; BATONI, G.; CABONI, P.; ESIN, S.; RINALDI, A. C.; ZUCCA P. Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus*. **BMC Complement Altern Med**, v. 19, n. 1, p. 82, 2019. Published 2019 Apr 5. doi:10.1186/s12906-019-2487-7.

MALIK, A.; AFAQ, F.; SARFARAZ, S.; ADHAMI, V. M.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 14813–8, 2005.

MALIK, A.; MUKHTAR, H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. **Cell Cycle**, v. 5, p. 371-3, 2006.

MALONO, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natura products -General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol**, v. 8, p. 127-147, 1983.

MARLIÈRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q.; BRANDÃO, M. G. L.; KLEINI, C. H.; ACURCIO, F. A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18 (Supl.), p. 754-760, 2008.

MAROL S.; YUCESSOY, M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, v. 51, p. 40-49, 2007.

MASON, K. L.; ERB DOWNWARD, J. R.; MASON, K. D.; FALKOWSKI, N. R.; EATON, K. A.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B.; HUFFNAGLE, G. B. *Candida albicans* and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. **Infect. Immun**, v. 80, p. 3371–3380, 2012.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: **IOCE**, v. 2, p. 74-5, 1989.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, p. 119–128, 2013.

MAZZARINO, M.; PIANTADOSI, C.; COMUNITÀ, F.; DE LA TORRE, X.; BOTRÈ, F. Urinary excretion profile of prednisone and prednisolone after different administration routes. **Drug Test Anal**, v. 11, n. 11-12, p. 1601-1614, 2019. doi:10.1002/dta.2733.

McCARRELL, E. M.; GOULD, S. W.; FIELDER, M. D.; KELLY, A. F.; EI SANKARY, W.; NAUGHTON, D. P. Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts:

Referências

enhancement by addition of metal salts and vitamin C. **BMC Complement Altern Med**, v. 8, p. 64, 2008. Published 2008 Dec 15. doi:10.1186/1472-6882-8-64.

MEDJAKOVIC, S.; JUNGBAUER, A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. **Food & Function**, v. 4, n. 1, p. 19-39, 2013.

MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de Lantana camara (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. Porto Alegre, 2001, 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

MEITNER, S. W.; BOWEN, W. H.; HAIDARIS, C. G. Oral and esophageal *Candida albicans* infection in hyposalivatory rats. **Infect Immun.**, v. 58, n. 7, p. 2228-2236, 1990.

MENEZES, S. M.; CORDEIRO, L. N.; VIANA, G. S. Punica granatum (pomegranate) extract is active against dental plaque. **J Herb Pharmacother**, v. 6, n. 2, p.79-92, 2006.

MERTENS-TALCOT, S. U.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; RIOS, J.; HINGORANI, L.; DERENDORF, H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8956-8961, 2006.

MILLSOP, J. W.; FAZE, L. N. Oral candidiasis. **Clin. Dermatol**, v.34, p. 487-494, 2016.

MINGXUN WANG.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828-837, 2016.

MIMA, E. G.; PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N.; VERGANI, C. E.; COSTA, C. A.; KURACHI, C; BAGNATO, V. S. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. 392-401, 2010.

MIRDEHGHAN, S. H.; RAHEMI, M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit. **Sci Hort**, v. 111, p. 120-7, 2007.

MONEIM, A. E. A. Antioxidant activities of Punica granatum (pomegranate) peel extract on brain of rats. **J. Med. Plants Res**, v. 6, n. 2, p. 195-199, 2012.

MOREY, A. T.; DE SOUZA, F. C.; SANTOS, J. P.; et al. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2016. doi:10.2174/1389201017666151223123712.

Referências

- MOYES, D. L.; NAGLIK, J. R. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. **Clin. Dev. Immunol**, 2011A, 2011B, 346307.
- MUBARAKI, M. A.; HAFIZ, T. A.; DKHIL, M. A.; AL-QURAI SHY, S. Beneficial effect of *Punica granatum* peel extract on murine malaria-induced spleen injury. **BMC Complement Altern Med**, 2016;16:221. Published 2016 Jul 16. doi:10.1186/s12906-016-1207-9
- MURPHY, J. W. Immunity to fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, p. 360–367, 1989.
- MYLONAKIS, E.; MORENA, R.; EL KHOURY, J. B.; IDNURM, A.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B., et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, p. 3842–50, 2005.
- MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. **Mycopathologia**, v. 165, p. 1–3, 2008.
- NAGLIK, J. R. et al. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 283, p. 129–139, 2008.
- NAGLIK, J. R.; MOYES, D. L.; WAÄCHTLER, B.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes Infect**, v. 13, p. 963–976, 2011.
- NAGLIK, J. R.; KÖNIG, A.; HUBE, B.; GAFFEN, S. L. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 40, p. 104–112, 2017.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **J Braz Microb**, v. 31, p. 247-56, 2000.
- NASCIMENTO JÚNIOR, B. J.; SANTOS, A. M. T.; SOUZA, A. T.; SANTOS, E. O.; XAVIER, M. R.; MENDES, R. L.; AMORIM, E. L. C. Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n. 2, p. 423-432, 2016.
- NAVARRO, V.; VILLARREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J Ethnopharmacol**, v. 53, p. 143-7, 1996.
- NAZ, S.; SIDDIQI, R.; AHMAD, S.; RASOOL, S.; SAYEED, S. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. **J Food Sci**, v. 72, p. 341–5, 2007.
- NENOFF, P.; OSWALD, U.; HAUSTEIN, U. F. In vitro susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. **Mycoses**, v. 42, p. 629-639, 1999.

Referências

- NETT, J.; ANDES, D. Fungal Biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. **Microbiol. Spectr**, v. 3, 2015.
- NEURATH, A. R.; STRICK, N.; LI, Y. Y.; DEBNATH, A. K. Punica granatum (pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1056, p. 311-27, 2005.
- NINOMIYA, K.; MARUYAMA, N.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; ABE, S. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. **Biol Pharm Bull**, v. 35, n. 6, p. 861-5, 2012.
- NOVAK, N.; HABERSTOK, J.; BIEBER, T.; ALLAM, J. P. The immune privilege of the oral mucosa. **Trends Mol. Med**, v. 14, p. 191–198, 2008.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 5, p. 561-70, 2010.
- NUNCIO-JÁUREGUI, N.; NOWICKA, P.; MUNERA-PICAZO, S.; HERNÁNDEZ, F.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A.; WOJDYLO, A. Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning and ripe Spanish pomegranates. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 354-364, 2015.
- NUÑEZ-SÁNCHEZ, M. A.; GARCÍA-VILLALBA, R.; MONEDERO-SAIZ, T.; GARCÍA-TALAVERA, N. V.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M. B.; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, C.; GARCÍA-ALBERT, A. M.; RODRÍGUEZ-GIL, F. J.; RUIZ-MARÍN, M.; PASTOR-QUIRANTE, F. A.; MARTÍNEZ-DÍAZ, F.; YÁÑEZ-GASCÓN, M. J.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 6, p. 1199-1211, 2014.
- OCHS, H. D.; OUKKA, M.; TORGERSON T. R. TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v.123, n. 5, p. 977-985, 2009. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.030.
- OECD, 2001. **Guideline for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method (TG 423)**, adopted 22.03.96: revised method adopted: 17th December 2001.
- OGAWA, S.; YAZAKI, Y. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin Determination and Biological Activities. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 837, 2018. Published 2018 Apr 5. doi:10.3390/molecules23040837.
- OLESZCZUCK, A.; SPANNBAUER, M.; TANNAPFEL, A.; BLUHER M.; HENGSTLER, J.; PIETSCH, U. C.; SCHUHMACHER, A.; et al. Regenerative capacity differs between micro- and macrovesicular hepatic steatosis. **Exp Toxicol Pathol**, v. 59, p. 205-213, 2007.

Referências

OLIVEIRA, R. B.; et al. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 3, p. 485-491, Sept. 2008.

OPPENHEIM, F. G.; XU, T.; MCMILLIAN, F. M.; LEVITZ, S. M.; DIAMOND, R. D.; OFFNER, G. D.; TROXLER, R. F. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. **J. Biol. Chem**, v. 263, p. 7472–7477, 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Constituição da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) - 1946**. Disponível em: <<http://www.direitoshumanos.usp.br/index.php/OMS>>.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomed Pharmacother**, v. 59, n. 10, p. 561-570, 2005. doi:10.1016/j.biopha.2005.03.013.

PANTH, N.; MANANDHAR, B.; PAUDEL, K. R. Anticancer Activity of *Punica granatum* (Pomegranate): A Review. **Phytother Res**, v. 31, n. 4, p. 568-578, 2017. doi:10.1002/ptr.5784.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; DISMUKES, W. E.; WALSH, T. J.; EDWARDS, J. E. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 161-189, 2004.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K. J.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E. J.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis**, v. 48, p. 503–535, 2009.

PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; ARAÚJO, C. R.; et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 145-151, 2007. doi:10.1007/s11046-007-0094-5.

PATIL, S.; RAO, R.S.; MAJUMDAR, B.; ANIL, S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. **Front. Microbiol**, v. 6, p. 1391, 2015.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; SCHNITZLER, N.; Jentsch S, et al. Analyses of phagocytosis, evoked oxidative burst, and killing of black yeasts by human neutrophils: a tool for estimating their pathogenicity?. **Med Mycol**, v. 41, n.1, p. 7-14, 2003. doi:10.1080/mmy.41.1.7.14.

PEREIRA, E. M.; GOMES, R. T.; FREIRE, N. R.; AGUIAR, E. G., BRANDÃO, Md., SANTOS, V. R. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta Med**, v. 77, n.4, p. 401-4, Mar. 2011.

Referências

- PETERS, B.; OVCHINNIKOVA, E.; SCHLECHT, L.; HOYER, L.; BUSSCHER, H.; VAN DER MEI, H.; KROM, B.; JABRA-RIZK, M.; SHIRTLIFF, M. Staphylococcus aureus adherence to Candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology**, v. 158, p. 2975–2986, 2012.
- PETERS, E. S., Jr.; EISENBERG, E. Oral candidiasis: The clinical diagnostic spectrum. **J. Conn. State Dent. Assoc**, v. 66, p. 34–37, 1990.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, p. 133-163. 2007.
- PHAN, Q. T.; MYERS, C. L.; FU, F.; SHEPPARD, D. C.; YEAMAN, M. R.; WELCH, W. H.; IBRAHIM, A. S.; EDWARDS, J. E., Jr.; FILLER, S. G. Als3 Is a Candida albicans invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biol**, v. 5, p. 64, 2007.
- PHONGPAICHIT, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; WATTANAPIROMSAKUL, C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. **Mycoses**, v. 48, p. 333-8, 2005.
- PIERCE, C. G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Candidiasis drug discovery and development: New approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. **Expert Opin. Drug Discov**, v. 8, p. 1117–1126, 2013.
- PIROFSKI, L. A.; CASADEVALL, A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. **J. Exp. Med**, v. 206, p. 269–273, 2009.
- PRASHANTH, D.; ASHA, M. K.; AMIT, A. Antibacterial activity of Punica granatum. **Fitoterapia**, v. 72, n. 2, p. 171-173, 2001. doi:10.1016/s0367-326x(00)00270-7.
- PUEL, A.; CYPOWYJ, S.; BUSTAMANTE, J.; WRIGHT, J. F.; LIU, L.; LIM, H. K.; MIGAUD, M.; ISRAEL, L.; CHRABIEH, M.; AUDRY, M. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. **Science**, v. 332, p. 65–68, 2011.
- QNAIS, E. Y.; ELOKDA, A. S.; ABU GHALY, Y. Y.; ABDULLA, F. A. Antidiarrheal Activity of the Aqueous extract of *Punica granatum*. (Pomegranate) peels. **Pharm Biol**, v. 45, v. 9, p. 715-720, 2007. <http://dx.doi.org/10.1080/13880200701575304>.
- RAHMAN, D.; MISTRY, M.; THAVARAJ, S.; CHALLACOMBE, S. J.; NAGLIK, J. R. Murine model of concurrent oral and vaginal Candida albicans colonization to study epithelial host-pathogen interactions. **Microbes Infect**, v. 9, n. 5, p. 615-22, 2007.
- RAMIREZ-AMADOR, V.; SILVERMAN, S., Jr.; MAYER, P.; TYLER, M.; QUIVEY, J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**, v. 84, p. 149–153, 1997.

Referências

- RATCLIFFE, N. A. Invertebrate immunity- a primer for the non-specialist. **Immunol Lett**, v. 10, p. 253-70, 1985.
- RATHOD, N. R.; BISWAS, D.; CHITME, H. R.; RATNA, S.; MUCHAND, I. S.; CHANDRA, R. Anti-urolithiatic effects of *Punica granatum* in male rats. **J Ethnopharmacol**, v. 140, n. 2, p. 234-238, 2012. doi:10.1016/j.jep.2012.01.003.
- RAZA, M.; AL-SHABANAH A. O.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Sci Pharm**, v. 70, p.135-145, 2002.
- REDDY, M. K.; GUPTA, S. K.; JACOB, M. R.; KHAN, S. I.; FERREIRA, D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. **Planta Med**, v. 73, n. 5, p. 461-467, 2007. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-967167>.
- REDDING, S. W.; ZELLARS, R. C.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; CACERES, M. A.; FOTHERGRILL, A. G.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; BAILEY, C. W.; RINALD, I. M. G.; PATERSON, T. F. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. **J. Clin. Microbiol**, v. 37, p. 3896–3900, 1999.
- REGULIN, A.; KEMPKEN, F. Fungal genotype determines survival of *Drosophila melanogaster* when competing with *Aspergillus nidulans*. **PLoS One**, v. 13, n. 1, e0190543, 2018. Published 2018 Jan 2. doi:10.1371/journal.pone.0190543.
- RENNERT, G.; PITILIK, S.; FINKELSTEIN, R.; KITZES-COHEN, R. Epidemiology of candidemia - A nationwide survey in Israel. **Infection**, v. 20, p. 26-29, 2000.
- REX, J. H.; BENETT, J. E.; SUGAR, A. M.; PAPPAS, P. G.; VAN DER HORST, C. M.; EDWARDS, J.; WASHBURN, R. G.; SCHELD, W. M.; KARCHMER, A. W.; DINE, A. P.; LEVENSTEIN, M. J.; WEBB, C. D. For the Candidemia Study Group and the National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. **N Engl J Med**, v. 331, n. 20, p. 1325-1330, 1994.
- RICCI, D.; GIAMPER, L.; BUCCHINI, A.; FRATERNALE, D. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 310-312, 2006. doi:10.1016/j.fitote.2006.01.008.
- RIFKIN, D. B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. **J Biol Chem**, v. 280, n. 9, p. 7409-7412, 2005. doi:10.1074/jbc.R400029200.
- ROMANI, L.; BISTONI F.; PUC CETTI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 508-514, 2002. doi:10.1016/s0966-842x(02)02460-5.

Referências

- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2004. doi:10.1038/nri1255
- ROSS, R. G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits—a preliminary study. **J Ethnopharmacol**, v. 78, n. 1, p. 85-87, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00287-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00287-2).
- SABALLS, P.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; et al. La candidemia en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Estudio retrospectivo de nueve casos. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, p. 2-5, 2000.
- SAEED, M.; NAVEED, M.; BLIBI, J.; et al. The Promising Pharmacological Effects and Therapeutic/Medicinal Applications of Punica Granatum L. (Pomegranate) as a Functional Food in Humans and Animals. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 12, n. 1, p. 24-38, 2018. doi:10.2174/1872213X12666180221154713.
- SALI, A.; GUERRON, A. D.; GORDISH-DRESSMAN, H.; SPURNEY, C. F.; IANTORNO, M.; HOFFMAN, E. P.; et al. Glucocorticoid-treated mice are an inappropriate positive control for long-term preclinical studies in the mdx mouse. **PLoS One**, 7:e34204, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034204>.
- SALVATORI, O.; PURI, S.; TATI, S.; EDGERTON, M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. **J. Dent. Res**, v. 95, p. 365–371, 2016.
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. **Arthritis Res**, v. 4, p. 127–132, 2002.
- SAMARANAYAKE, Y. U.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, p. 398–429, 2001.
- SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 379–385, 2002.
- SANCHES, M. D.; MIMURA, L. A. N.; OLIVEIRA, L. R. C.; et al. Differential behavior of Non-*albicans* *Candida* Species in the Central Nervous System of Immunocompetent and Immunosuppressed Mice. **Front Microbiol**, v. 9, p. 2968, 2019. Published 2019 Jan 8. doi:10.3389/fmicb.2018.02968.
- SANTOS, A. M. **Provas de função e lesão hepática**. FM-UnB: Monitoria de Clínica Médica – 1. ed, 2003.
- SARDI, J. C.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, v.62, p.10-24, 2013.
- SAUNUS, J. M.; KAZOULLIS, A.; FARAH, C. S. Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections. **Front Biosci**, v. 13, p. 5345-5358, 2008. Published 2008 May 1. doi:10.2741/3085.

Referências

- SCHALLER, M.; BOELD, U.; OBERBAUER, S.; HAMM, G., HUBE, B.; KORTING, H. C. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. **Microbiology**, v.150, n.9, p. 2807-2813, 2004. doi:10.1099/mic.0.27169-0
- SCHUBERT, S. Y.; LANSKY, E. P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. **J Ethnopharmacol**, v. 66, n. 1, p. 11-7, 1999.
- SCHWARTZ, E.; TZULKER, R.; GLAZER I.; et al. Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. **J Agric Food Chem**, v. 5, n. 19, p. 9197-9209, 2009. doi:10.1021/jf901466c.
- SCULLY, C.; GIOVANNI, L. Oral Candidosis. European Association of Oral Medicine. Available online: http://www.eaom.eu/pdf/content/oral_candidosis.pdf (accessed on 5 November 2019).
- SEERAM, N. P.; LEE, R.; HEBER, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clin Chim Acta**, v. 348, n. 1-2, p. 63-8, 2004.
- SEERAM, N. P.; et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 16, n. 6, p. 360-367, 2005.
- SEERAM, N. P.; ZHANG, Y.; REED, J. D.; KRUEGER, C. G.; VAYA, J. Pomegranate phytochemicals. In N. P. Seeram, R. Schulman, & D. Heber (Eds.), *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*. New York: Taylor and Francis GROUP. 2006, pp. 3–29.
- SEGAL, E.; FRENKEL, M. Experimental in vivo models of candidiasis. **J. Fungi**, v. 4, p. 21, 2018.
- SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 569-582, 2005 doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05397.x.
- SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 163-172, 2018. doi:10.1080/21505594.2017.1370174.
- SIEGEL, P. M.; SHU, W.; MASSAGUÉ J. Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression. **J Biol Chem**, v. 278, n. 37, p. 35444-35450, 2003. doi:10.1074/jbc.M301413200.
- SILVA, E. H.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; AULER, M. E.; SZESZS, W.; PAULA, C. R. Candiduria in a public hospital of São Paulo: Characteristics of the yeast isolates. **Rev Inst Med Trop**, v. 49, p. 349- 353, 2007.

Referências

- SILVERMAN, R. J.; NOBBS, A. H.; VICKERMAN, M. M.; BARBOUR, M. E.; JENKINSON, H. F. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* AspB adhesin promotes development of mixed-species communities. **Infect. Immun**, v. 78, p. 4644–4652, 2010.
- SILVEIRA, P. F, BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 618-626, 2008.
- SIMÓES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A, PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. (org). 6. ed. Editora da UFSC/ Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis, 2007. 577-84 p.
- SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 81–86, 2002.
- SINGH, A.; VERMA, R.; MURAR, A.; AGRAWAL, A. Oral candidiasis: An overview. **J. Oral Maxillofac. Pathol**, v.18, S81–S85, 2014.
- SINGKUM, P.; SUWANMANEE, S.; PUMESAT, P.; LUPLERTLOP, N. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 66, n. 1, p. 31-55, 2019. doi:10.1556/030.66.2019.001.
- SMITH, B. P. (org) **Tratado de medicina interna de grandes animais**, 1. ed., v. 1. Editora Manole, São Paulo, 1993. 854 p.
- SOLL, D. R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, p. 332-370, 2000.
- SOLIS, N. V.; FILLER, S. G. Mouse model of oropharyngeal candidiasis. **Nat Protoc**, v. 7, n. 4, p. 637-42, Mar 8, 2012.
- SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutat Res**, v. 579, p. 200–13, 2005.
- SOTA, M. EZPELETA, C.; CISTERNA, R. 1999. Description of 165 of fungemia: a multicenter study. **Rev Iberoam Micol**, v.16, p. 30-35, 1999.
- SOUTHERN, P.; HORBUL, J.; MAHER, D.; DAVIS, D. A. C. *albicans* colonization of human mucosal surfaces. **PLoS ONE**, v. 3, e2067, 2008.
- SPACCAPELO, R.; ROMANI L, TONNETTI, L.; et al. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1349-1360, 1995.
- SULTAN, A. S.; KONG, E. F.; RIZK, A. M.; JABRA-RIZK, M. A. The oral microbiome: A lesson in co-existence. **PLoS Pathog**, v. 14, p. e1006719, 2018.

Referências

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cell. Microbiol**, v. 4, p. 461–469, 2002.

SWIDERGALL, M.; FILLER, S.G. Oropharyngeal candidiasis: Fungal invasion and epithelial cell responses. **PLoS Pathog**, v. 13, p. e1006056, 2017.

TAGUCHI, Y.; TAKIZAWA, T.; ISHIBASHI, H.; SAGAWA, T.; ARAI, R.; INOUE, S.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. Therapeutic effects on murine oral candidiasis by oral administration of cassia (*Cinnamomum cassia*) preparation. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 51, n. 1, p. 13-21, 2020.

TAKAKURA, N.; SATO, Y.; ISHIBASHI, H.; OSHIMA, H.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H., et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. **Microbiol Immunol**, v. 47, p. 321-6, 2003.

TAKAKURA N.; WAKABAYASHI, H.; ISHIBASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TERAGUCHI, S.; TAMURA, Y.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. **J Med Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 495-500, Jun 2004.

TAPIA, C.; GONZÁLEZ, P.; PEREIRA, A.; PÉREZ, J.; NORIEGA, L. M.; PALAVECINO, E. Susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* recuperadas de pacientes con SIDA y candidiasis orofaríngea y esofágica. Experiencia con Etest [Antifungal susceptibility for *Candida albicans* isolated from AIDS patients with oropharyngeal and esophageal candidiasis: experience with Etest]. **Rev Med Chil**, v. 131, n. 5, p. 515-519, 2003.

TASAKI, S.; CHO, T.; NAGAO, J.I .; et al. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. **FEMS Yeast Res**, v. 18, n. 3, foy018, 2018. doi:10.1093/femsyr/foy018.

TAYLOR, B. N.; FICHTENBAUM, C; SAAVEDRA, M.; SLAVINSKI, J.; SWOBODA, R.; WOZZNIAK, K.; ARRIBAS, A.; POWDERLY, W.; FIDEL, P. L. Jr . In vivo virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human Immunodeficiency Virus. **J Infect Di**, v. 182, p. 955-959, 2000.

TEICHERT, M. C.; JONES, J. W.; USACHEVA, M. N.; BIEL, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, n. 2, p. 155-60, Feb 2002.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBEBMAN A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 641-4, Nov. 2003.

Referências

- TOFIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 33, p. 360-366, 1999.
- TOMALKA, J.; AZODI, E.; NARRA H. P.; et al. β -Defensin 1 plays a role in acute mucosal defense against *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 194, n. 4, p. 1788-1795, 2015. doi:10.4049/jimmunol.1203239.
- TOTTI, M. A. G.; SANTOS, E. B.; ALMEIDA, O. P.; JORGE, A. O. C. Implantation and permanency of *Candida albicans* in the oral cavity of normal sialodenectomized mice after a single inoculation of yeast. **Braz J Oral Sci**, v. 1, p. 133–6, 2002.
- TOTTI, M. A.; DOS SANTOS, E. B.; DE ALMEIDA, O. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE A. O. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. **Braz Oral Res**, v. 18, n. 3, p.202-7, Jul-Sep 2004.
- TOUGER-DECKER, R. Nutrition & oral health. Dietary supplements and Oral Health: should the dentist ask?. **Quintessence Int.**, v. 36, n. 4, p. 287-292, 2005.
- TOUILLAUD, M. S.; THIÉBAUT, A. C. M.; FOURNIER, A.; NIRAVONG, M.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; CLAVEL-CHAPELON, F. Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, p. 475–86, 2007.
- TSUI, C.; KONG, E.; JABRA-RIZK, M. Pathogenesis of *Candida albicans* Biofilm. **Pathog. Dis**, v. 74, efw018, 2016.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Cien Farm**, v. 42, p. 189-306, 2006.
- URBAN, C. F.; LOURIDO, S.; ZYCHLINSKY, A. How do microbes evade neutrophil killing?. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 11, p. 1687-1696, 2006a. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00792.x.
- URBAN, C. F.; REICHARD, U.; BRINKMANN, V.; et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cell Microbiol**, v. 8, n.4, p. 668-676, 2006b doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x.
- VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.
- VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev Iberoamer Micol**, v. 14, p. 44-49, 1997.
- VAN DER MEER, J. W.; VAN DER VEERDONK, F. L.; JOOSTEN, L. A.; KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G. Severe *Candida* spp. infections: New insights into natural immunity. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 36, p. 58–62, 2010.

Referências

- VASCONCELOS, L. C. S.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; HIGINO, J. S. Use of *Punica granatum* Linn as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, v. 46, p. 192-6, 2003.
- VASCONCELOS, L. C.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C.; PEREIRA, M. S.; HIGINO, J. S.; PEIXOTO, M. H. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. **Braz Dent J**, v. 17, p. 223-7, 2006.
- VERMA, A. H.; RICHARDSON, J. P.; ZHOU, C.; COLEMAN, B. M.; MOYES, D. L.; HO, J.; HUPPLER, A. R.; RAMANI, K.; MCGEACHY, M. J.; MUFAZALOV, I. A.; et al. Oral epithelial cells orchestrate innate type 17 responses to *Candida albicans* through the virulence factor candidalysin. **Sci. Immunol**, v. 2, eaam8834, 2017.
- VIDAL, A.; FALLARERO, A.; PENÃ, B. R.; et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **J Ethnopharmacol.**, v. 89, n. 2-3, p. 295-300, 2003. doi:10.1016/j.jep.2003.09.001.
- VILA, T.; RIZKI, A. M.; SULTAN, A. S.; JABRA-RIZK, M. A. The power of saliva: Antimicrobial and beyond. **PLoS Pathog**. 2019. No prelo.
- VILA, T.; SULTAN, A. S.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; JABRA-RIZK, M. A. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. **J. Fungi**, v. 6, n.1, p.15, Jan 2020.
- VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Ethnopharmacol**, v. 94, v. 1, p. 49-54, 2004. doi:10.1016/j.jep.2004.03.036.
- WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; VIDAL BONIFACIO, B.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: Contributions to pathogenesis. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 52, p. 1-6, 2019. doi:10.1016/j.mib.2019.04.001.
- WANG, R. F.; XIE, W. D.; ZHANG, Z.; XING, D. M.; DING, Y.; WANG, W.; et al. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). **J Nat Prod**, v. 67, n. 12, p. 2096-2098, 2004. doi:10.1021/np0498051.
- WANG, Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 307-308, 2015. doi:10.1080/21505594.2014.1000752.
- WANG, L.; WANG, C.; MEI, H.; et al. Combination of Estrogen and Immunosuppressive Agents to Establish a Mouse Model of Candidiasis with Concurrent Oral and Vaginal Mucosal Infection. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 29-39, 2016. doi:10.1007/s11046-015-9947-5.
- WEINSTEIN, R. A.; HAYDEN, M. K. (org). **Multiply drug-resistant pathogens: epidemiology and control**. In: Bennett JV, Brachman. 4. ed. Hospital Infections, Pennsylvania: Lippincott-Raven, 1998. 215-236 p.

Referências

- WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **J. Oral Microbiol**, v. 3, 2011. Published 2011 Jan 28. doi:10.3402/jom.v3i0.5771.
- WILLIAMS, D. W.; JORDAN, R. P.; WEI, X. Q.; ALVES, C. T.; WISE, M. P.; WILSON, M. J.; LEWIS, M. A. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **J. Oral Microbiol**, v. 5, 2013. Published 2013 Oct 21. doi:10.3402/jom.v5i0.22434.
- WITTE, E.; WITTEi, K.; WARSZAWSKA, K.; SABAT, R.; WOLK, K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, v. 5, p. 365-379, 2010. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.08.002.
- WU, G.; LIU, Y.; DING, Y.; YI, Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue Cell**, v. 48, n. 4, p. 297-304, Aug 2016.
- WURSTER, S.; BAND, A.; BEYDA, N. D.; et al. *Drosophila melanogaster* as a model to study virulence and azole treatment of the emerging pathogen *Candida auris*. **J Antimicrob Chemother**, v. 74, n. 7, p. 1904-1910, 2019. doi:10.1093/jac/dkz100.
- XU, J.; ZHAO, Y.; AISA, H. A. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. **Pharm Biol**, v. 55, n. 1, p. 2095-2101, 2017a. doi:10.1080/13880209.2017.1357737.
- XU, X.; GUO, Y.; ZHAO, J.; et al. Punicalagin, a PTP1B inhibitor, induces M2c phenotype polarization via up-regulation of HO-1 in murine macrophages. **Free Radic Biol Med**, v. 110, p. 408-420, 2017b. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.014.
- YAN, L.; YIN, P.; MA, C.; LIU, Y. Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18923-18935, 2014.
- YIN, C.; DANG, H. N.; GAZOR, F.; HUANG, G. T. Mouse salivary glands and human beta-defensin-2 as a study model for antimicrobial gene therapy: technical considerations. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, n. 4, p. 352-360, 2006. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.08.003.
- YUE, J.; MULDER, K. M. Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. **Pharmacol Ther.**, v. 91, n. 1, p. 1-34, 2001. doi:10.1016/s0163-7258(01)00143-7.
- ZAITOUN, A. M.; AL MARDINI, H.; AWARD, S.; UKABAM, S.; MAKADISI, S.; RECORD, C. O. Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. **J Clin Pathol**, v. 54, p. 461-465, 2001.
- ZERVOS, M.; MEUNIER, F. Fluconazole (Diflucan): a review. **Int J Antimicrob Agents**, v. 3, n. 3, p. 147-170, 1993. doi:10.1016/0924-8579(93)90009-t.

Referências

ZENG, X.; XIONG, C.; WANG, Z.; JIANG, L.; HOU, X.; SHEN, J.; ZHOU, M.; CHEN, Q. Genotypic profiles and virulence attributes of *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus. **APMIS**, v. 116, p. 284-291, 2008.

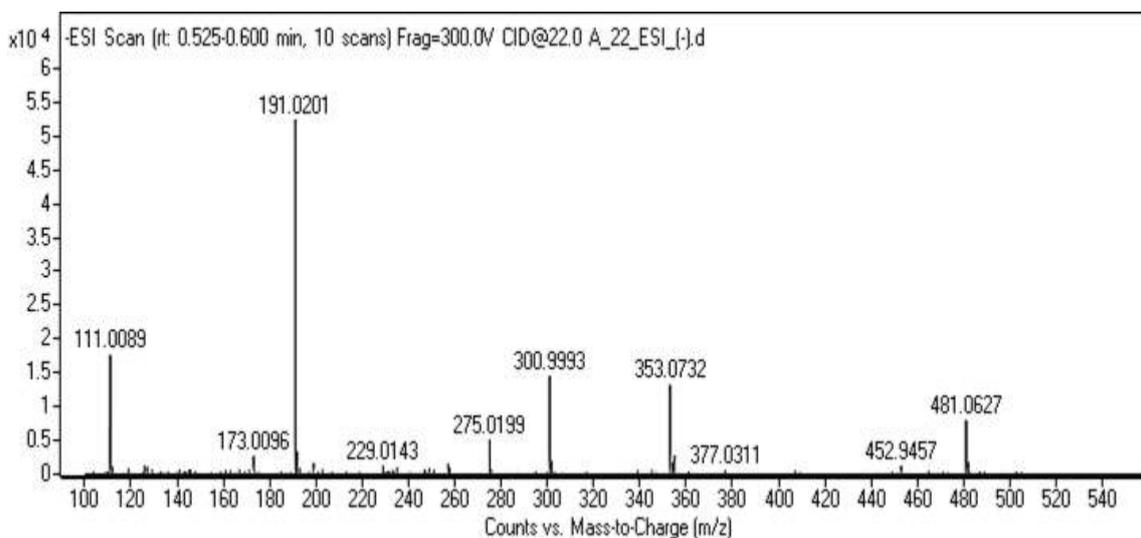
ZHANG, Y.; WANG, D.; LEE, R. P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial pomegranate extracts: implications for standardization and quality control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7395-7400, 2009.

Apêndices

Apêndices

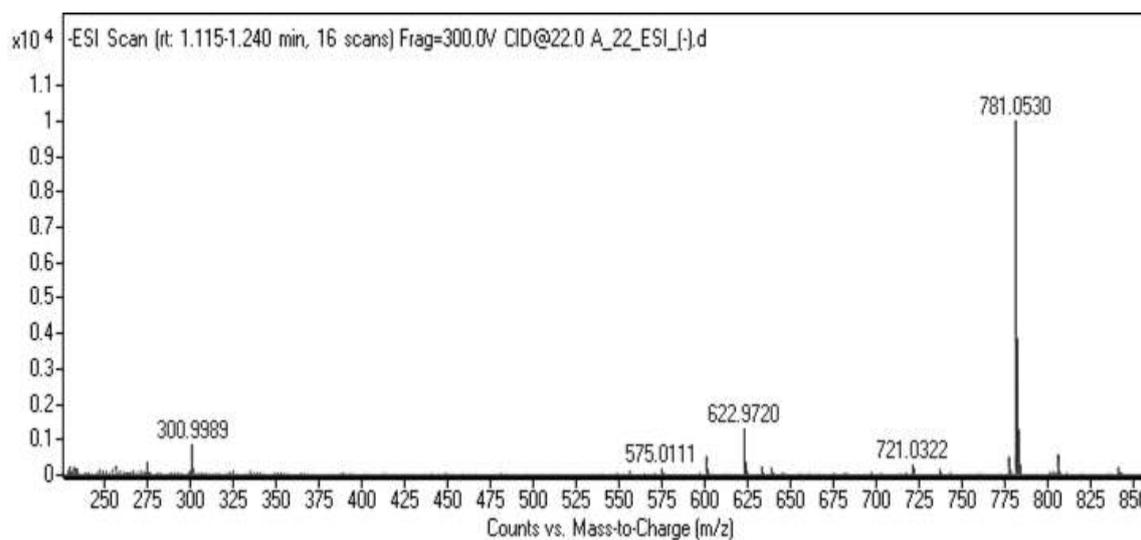
APÊNDICE A - Espectro de massas dos compostos identificados. Os espectros estão listados em ordem do tempo de retenção.

HHDP-hexoside

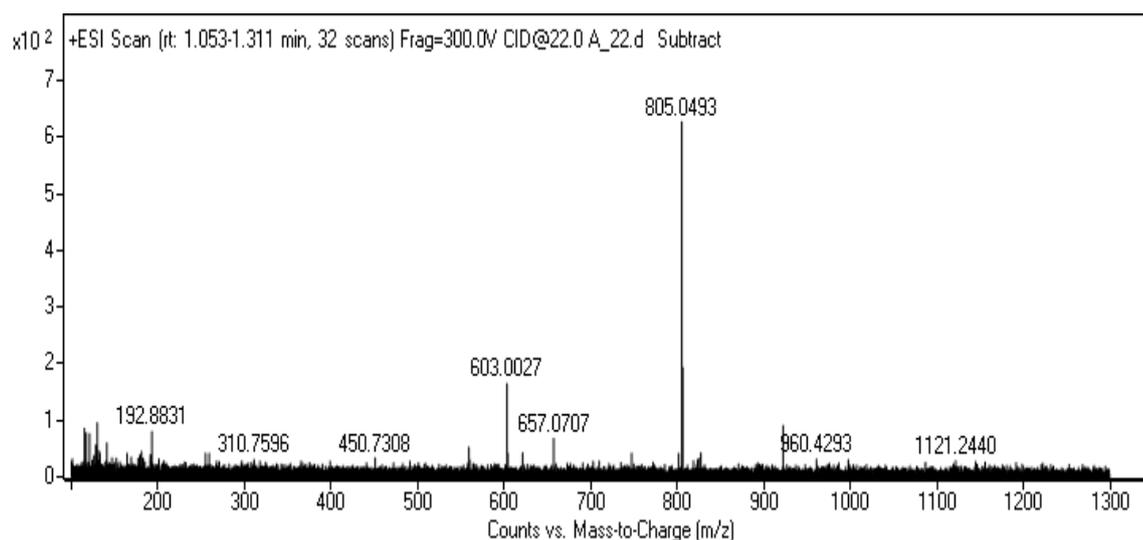


Espectro ESI em modo negativo.

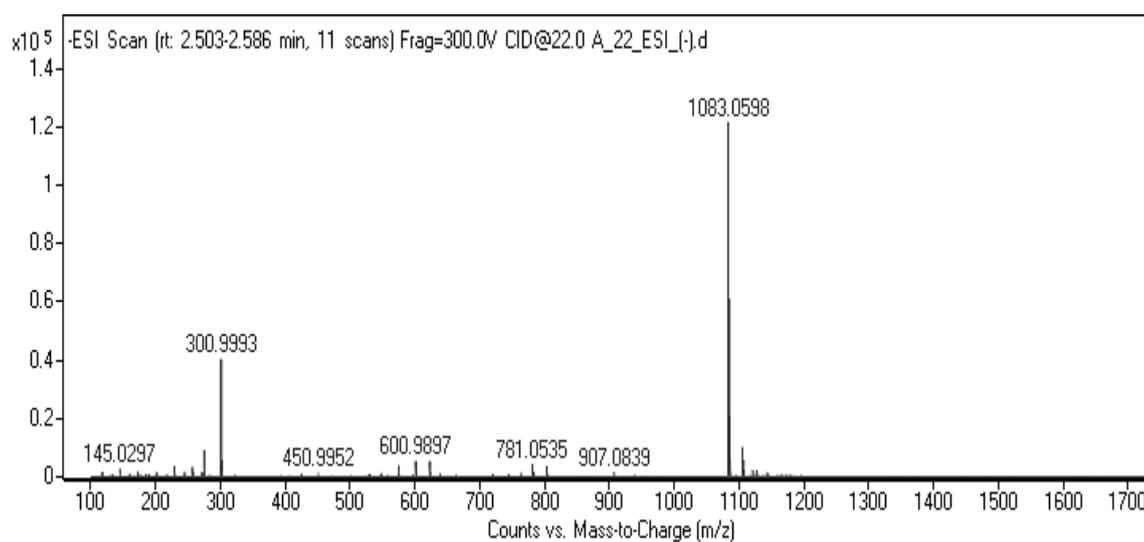
Punicalin



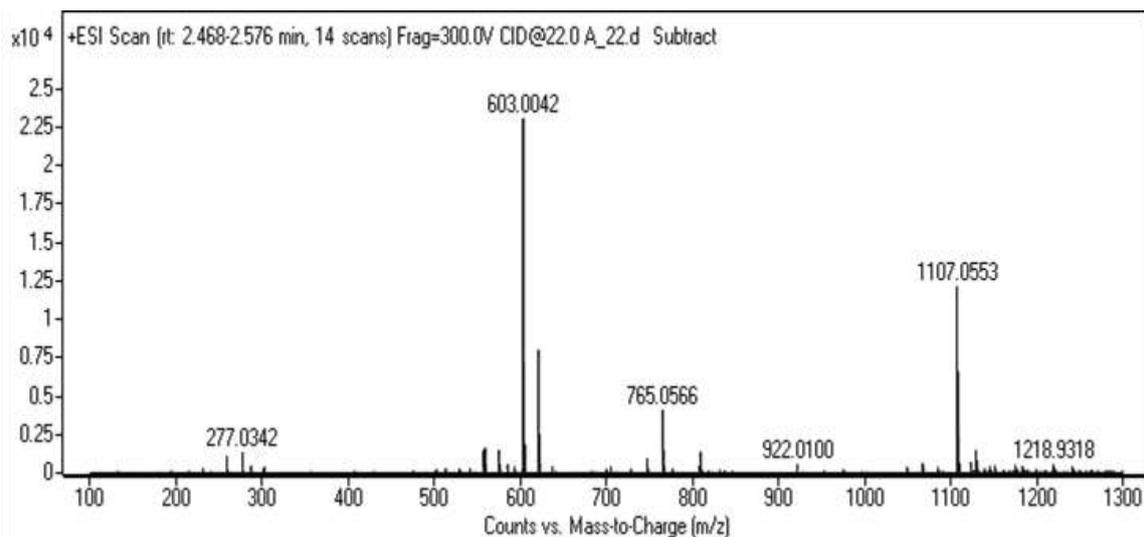
Espectro ESI em modo negativo.

Apêndices

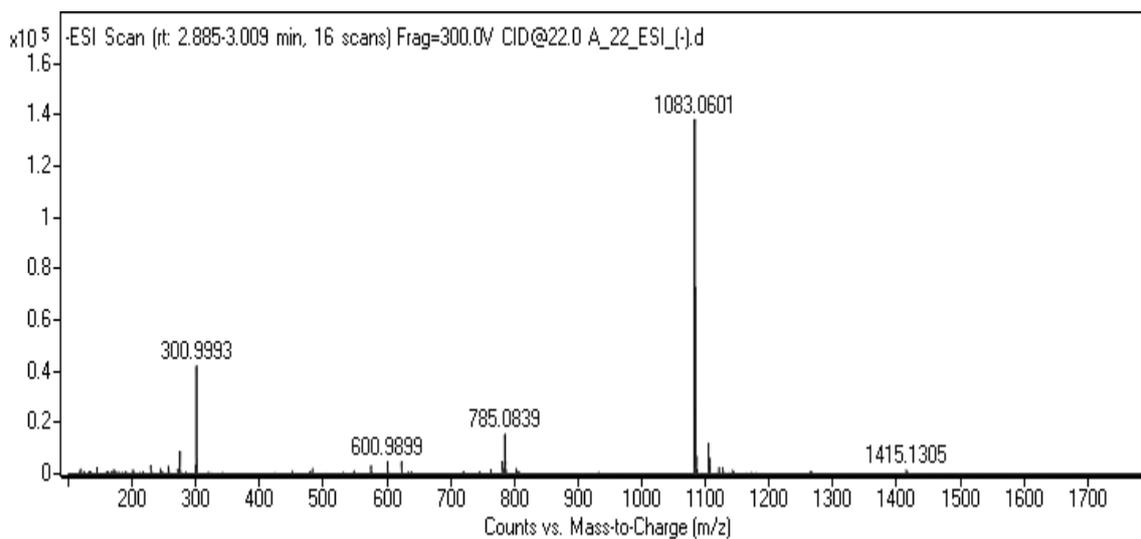
Espectro ESI em modo positivo.

Punicalagin (2.526 min)

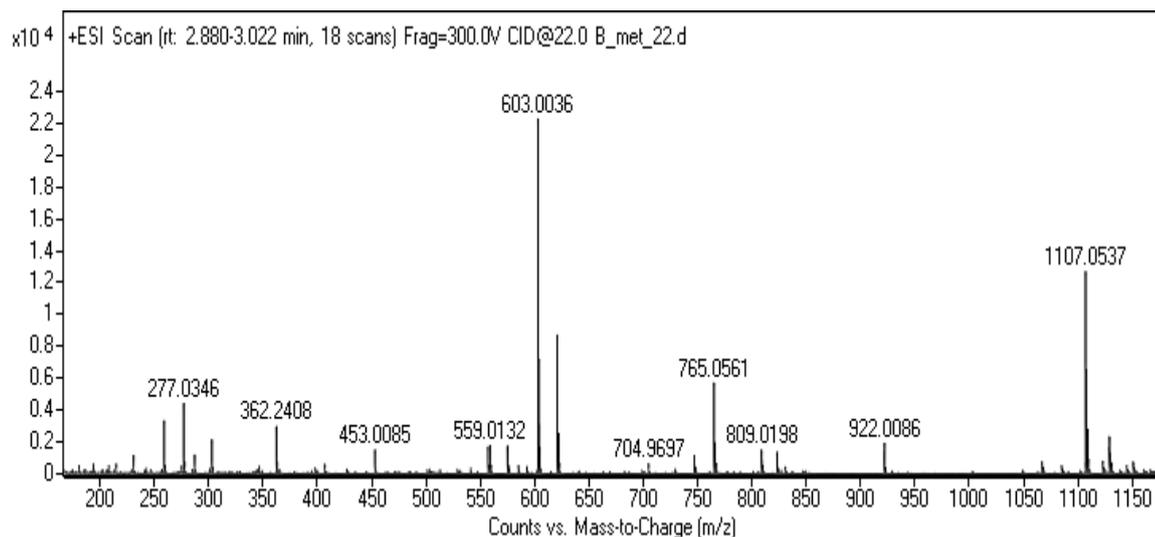
Espectro ESI em modo negativo.

Apêndices

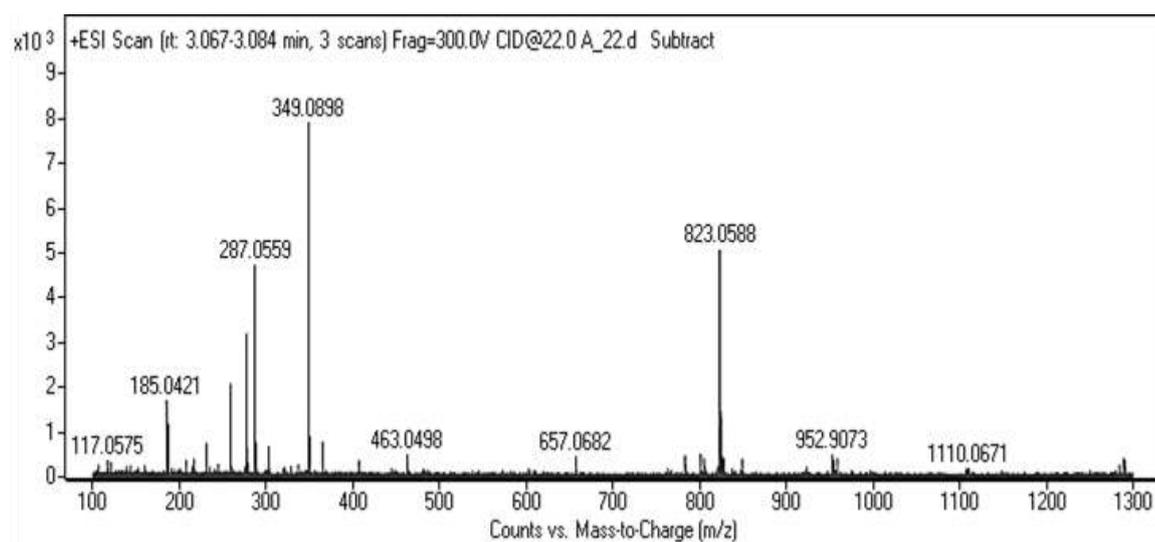
Espectro ESI em modo positivo.

Punicalagin (2.909 min)

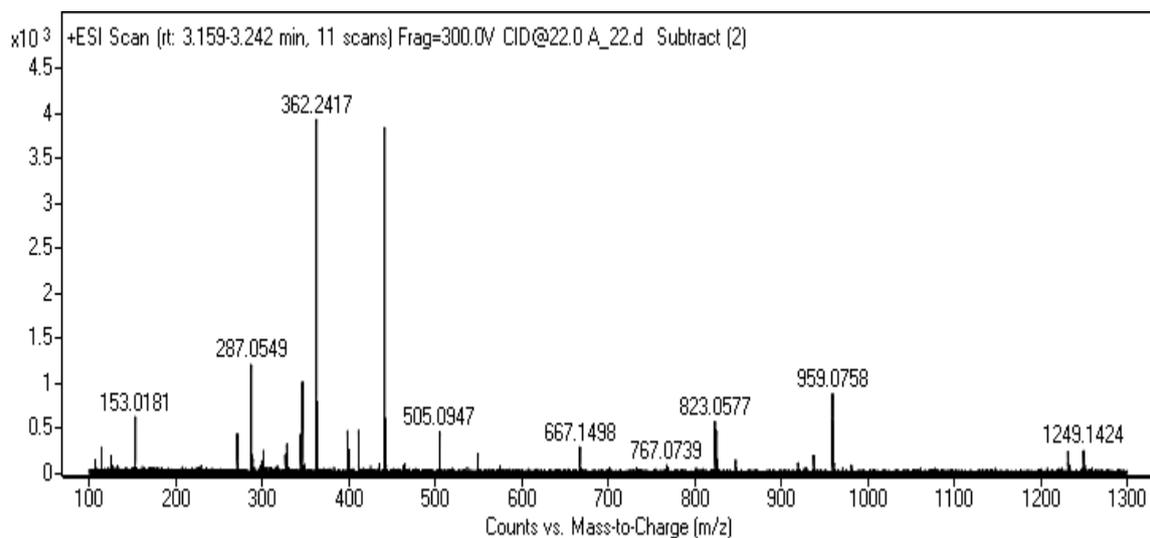
Espectro ESI em modo negativo.

Apêndices

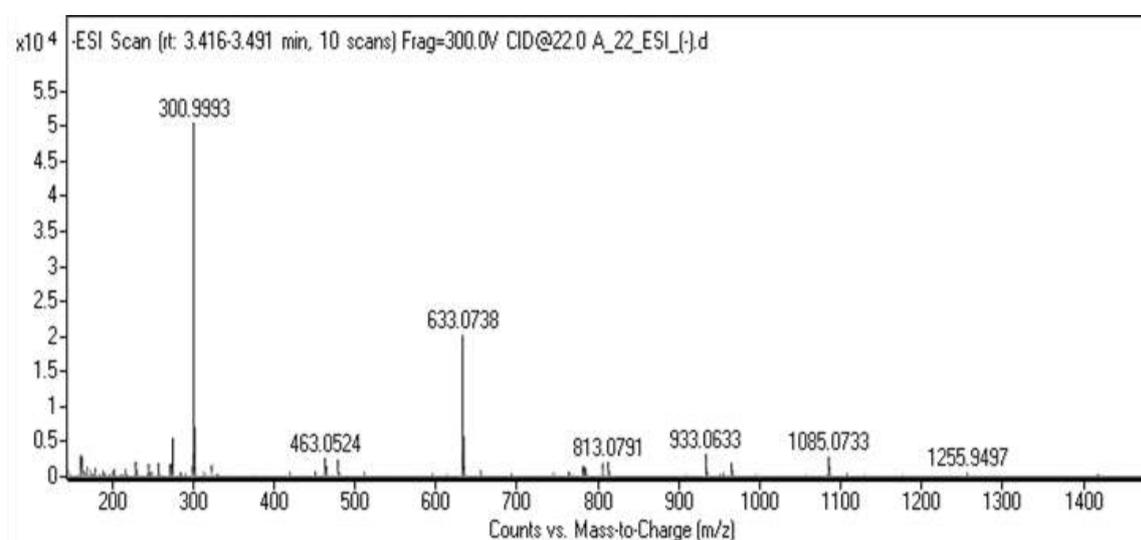
Espectro ESI em modo positivo.

Pedunculagin (3.084 min)

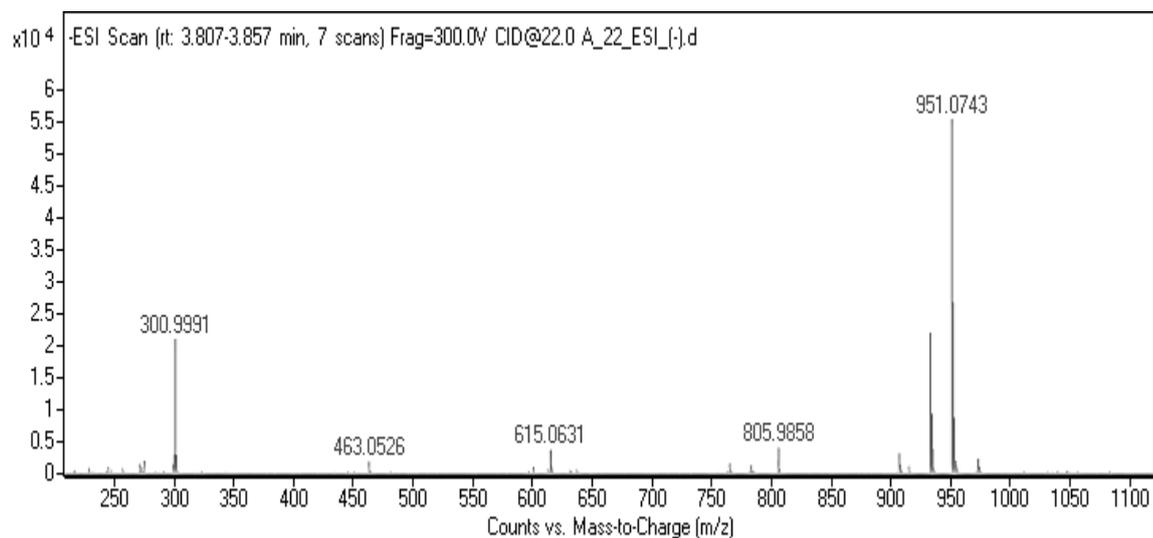
Espectro ESI em modo positivo.

Apêndices**Pedunculagin (3.192 min)**

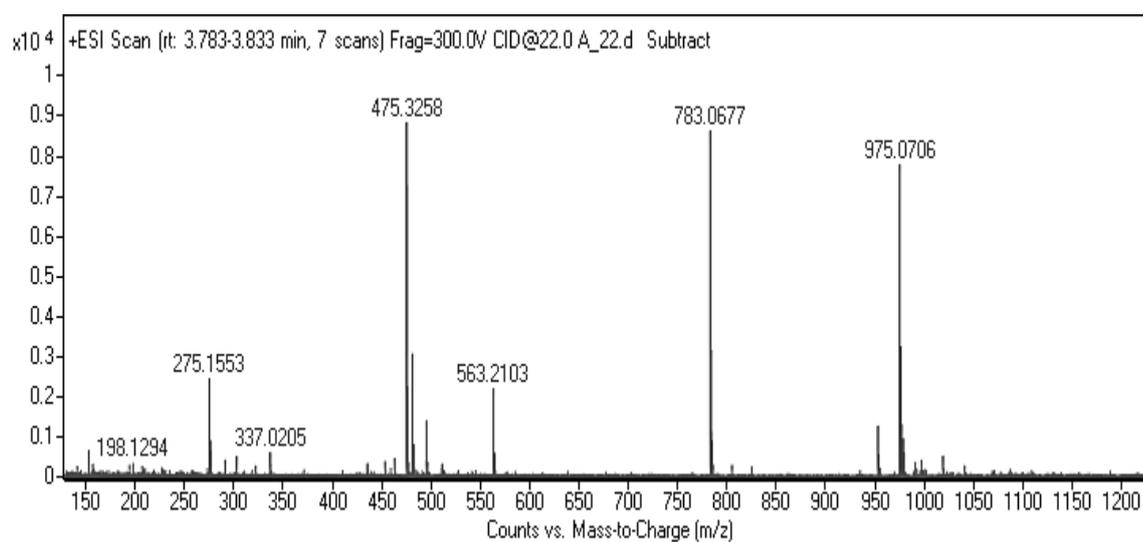
Espectro ESI em modo positivo.

Galloyl-HHDP-hexoside

Espectro ESI em modo negativo.

Apêndices**Granatin B**

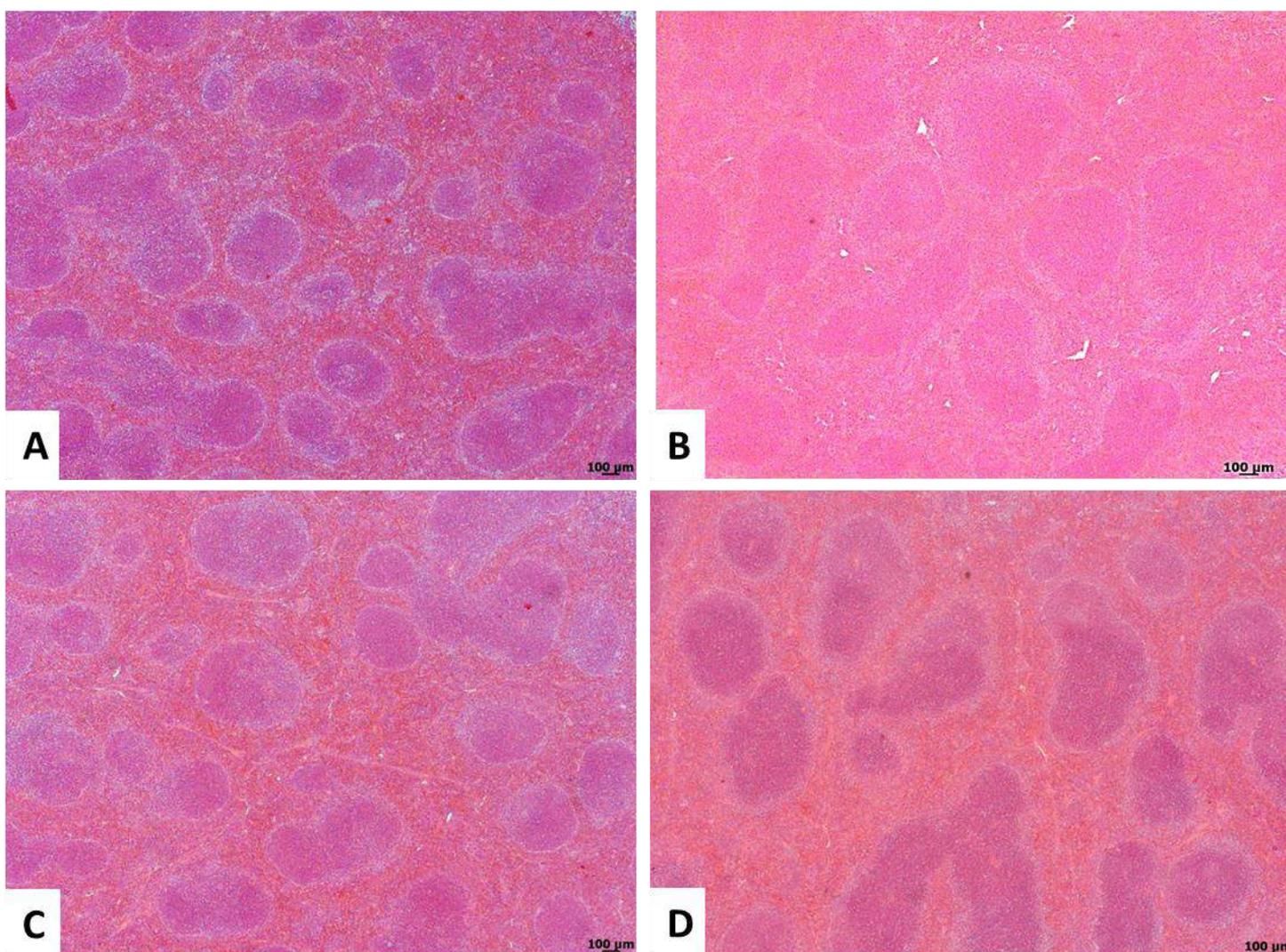
Espectro ESI em modo negativo.



Espectro ESI em modo positivo.

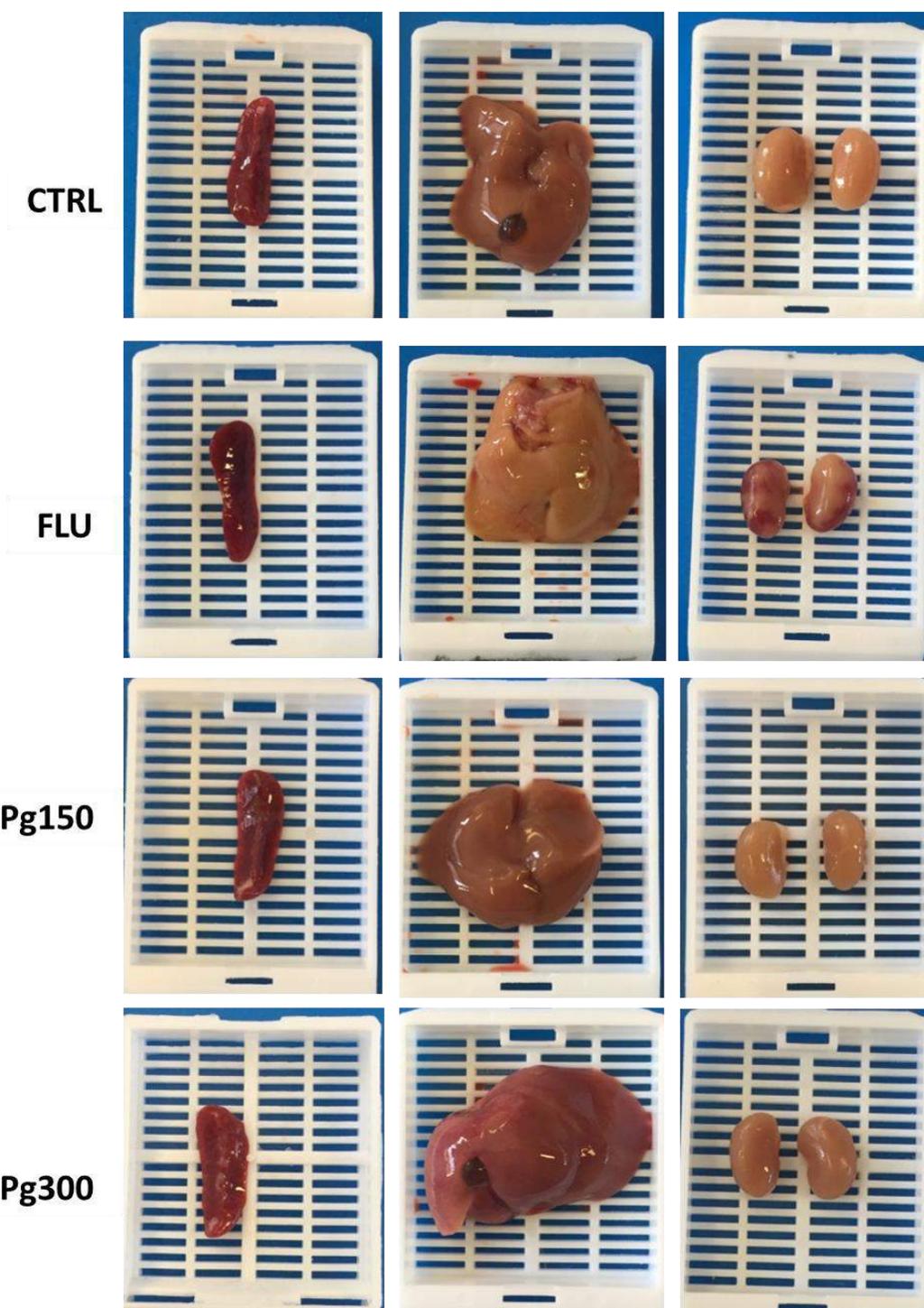
Apêndices

APÊNDICE B - **Imagens microscópicas do baço: análise toxicológica de camundongos BALB/c saudáveis (não infectados)**. Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (**CTRL**) (**A**). Animais receberam por gavagem, durante 7 dias, 100 mg/mL de fluconazol (**FLU**) (**B**), ou 150 mg/mL de *P. granatum* (**Pg150**) (**C**), ou 300 mg/mL (**Pg300**) (**D**). Não houve alterações morfológicas nas áreas ocupadas pela polpa branca ou pela polpa vermelha, assim como nos tamanhos médios dos nódulos e folículos linfóides em nenhum dos grupos, os quais mantiveram suas características microscópicas similar àquelas do grupo CTRL. As lâminas microscópicas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum no aumento de 4x.



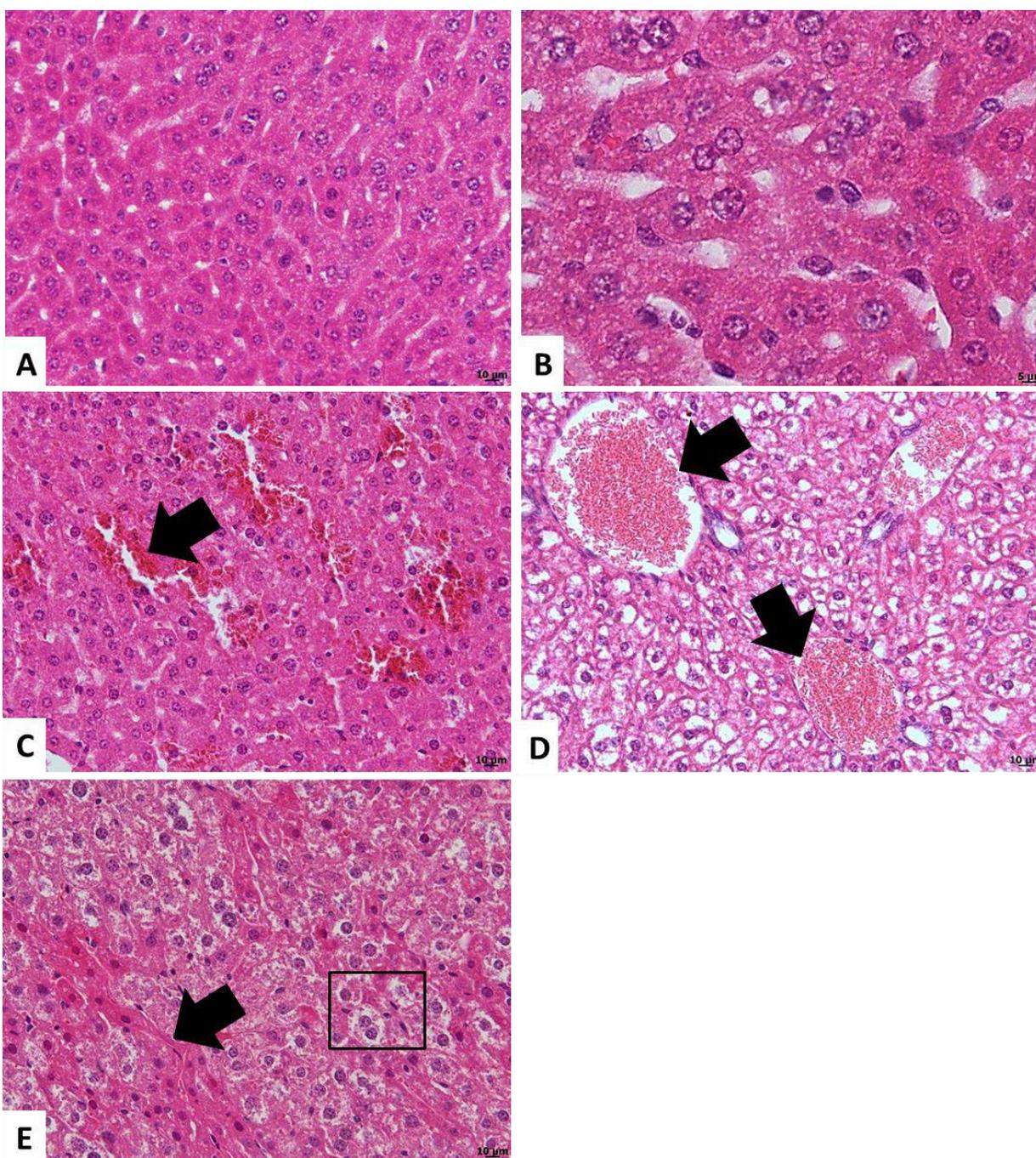
Apêndices

APÊNDICE C - **Imagens macroscópicas do baço, fígado e rins de camundongos BALB/c saudáveis (não infectados)**. Animais saudáveis, que não receberam as administrações dos fármacos, compõem o grupo controle (**CTRL**). Animais receberam por gavagem, durante 7 dias, 100 mg/mL de fluconazol (**FLU**), ou 150 mg/mL do extrato de *P. granatum* (**Pg150**), ou 300 mg/mL (**Pg300**). No grupo **FLU**, note regiões enegrecidas no córtex renal e coloração amarelada com a superfície externa lisa e brilhante no fígado destes animais em relação aos mesmos órgãos dos demais grupos.



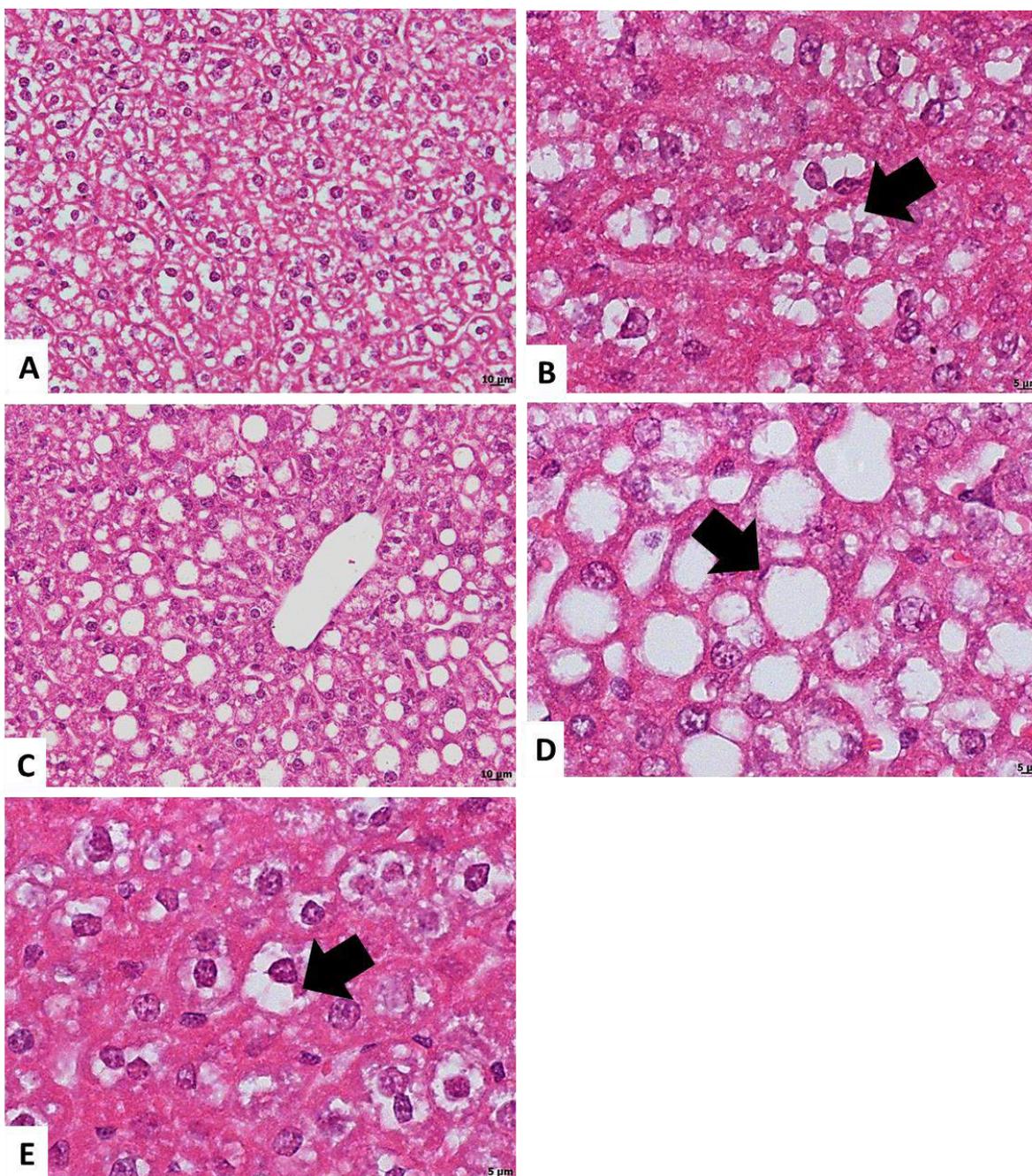
Apêndices

APÊNDICE D - **Imagens microscópicas do fígado de camundongos BALB/c saudáveis (não infectados) que receberam por gavagem, durante 7 dias, 100 mg/mL de fluconazol (grupo FLU).** Fígado com padrões de normalidade (**A e B**). Em **B**, note o conteúdo interno dos hepatócitos. Áreas ocupadas por hemácias, por meio da ruptura dos sinusóides causando micro-hemorragias (ponta de seta) (**C**). Vasos congestos (hiperêmicos) (ponta de seta) e hepatócitos hidrópicos, com citoplasma claro e núcleo central (**D**). Hepatócitos hidrópicos (área quadrangular) entremeados por septos fibrosos (ponta de seta) (**E**). As lâminas microscópicas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum nos aumentos de 40x e 100x.



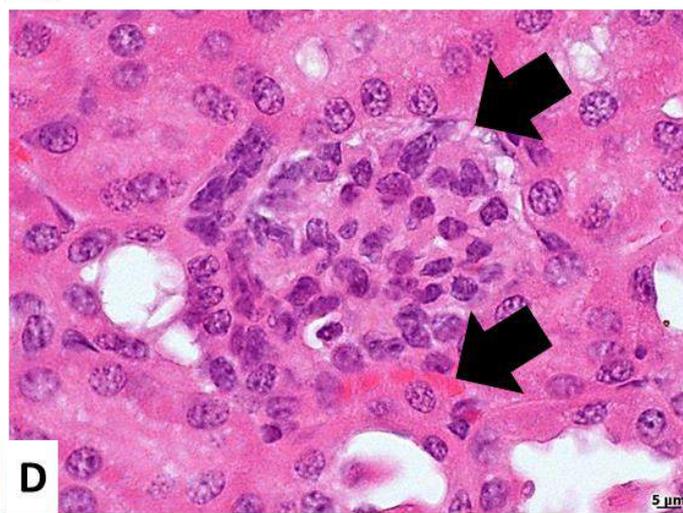
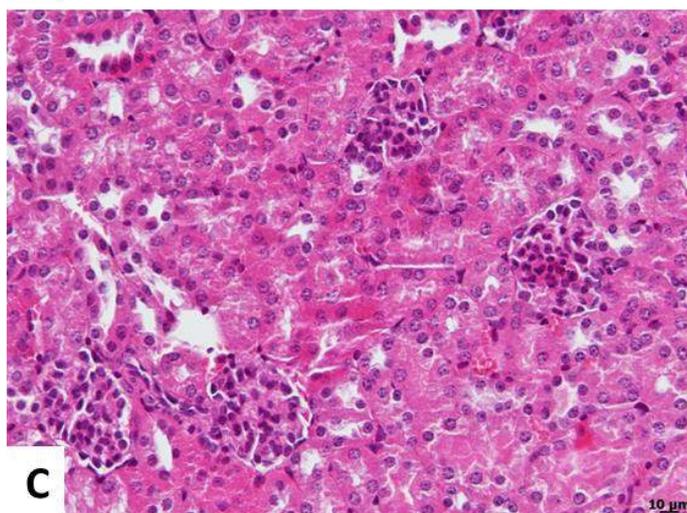
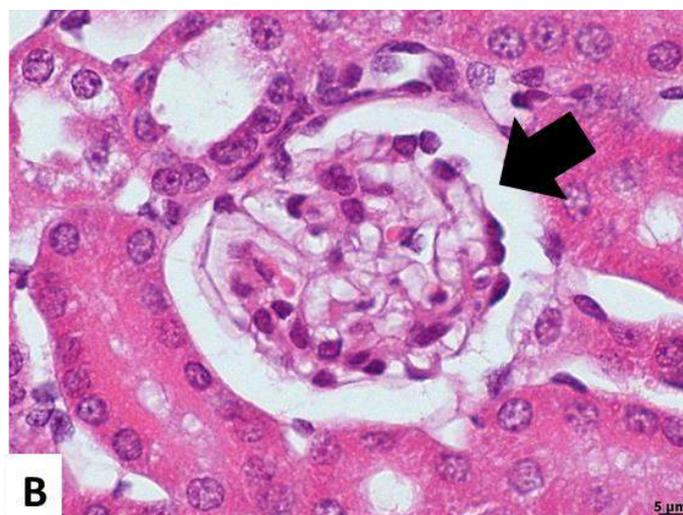
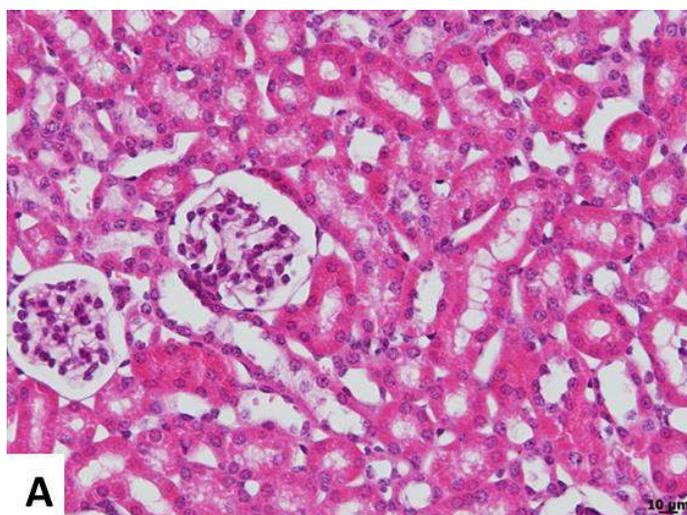
Apêndices

APÊNDICE E - **Imagens microscópicas do fígado de camundongos BALB/c saudáveis (não infectados) que receberam por gavagem, durante 7 dias, 100 mg/mL de fluconazol (grupo FLU).** Esteatose microvesicular (**A e B**). Em **B**, note o citoplasma do hepatócito preenchido com pequenos vacúolos lipídicos e o núcleo localizado centralmente à célula (ponta de seta). Esteatose macrovesicular ao redor da zona periportal em um padrão de cerca de tela de arame (**C e D**). Em **D**, note o citoplasma do hepatócito ocupado por um grande vacúolo (área clara) que desloca o núcleo para a periferia celular (ponta de seta). Corpúsculos de Mallory-Denk no interior do hepatócito balonizado (ponta de seta) (**E**). As lâminas microscópicas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum nos aumentos de 40x e 100x.



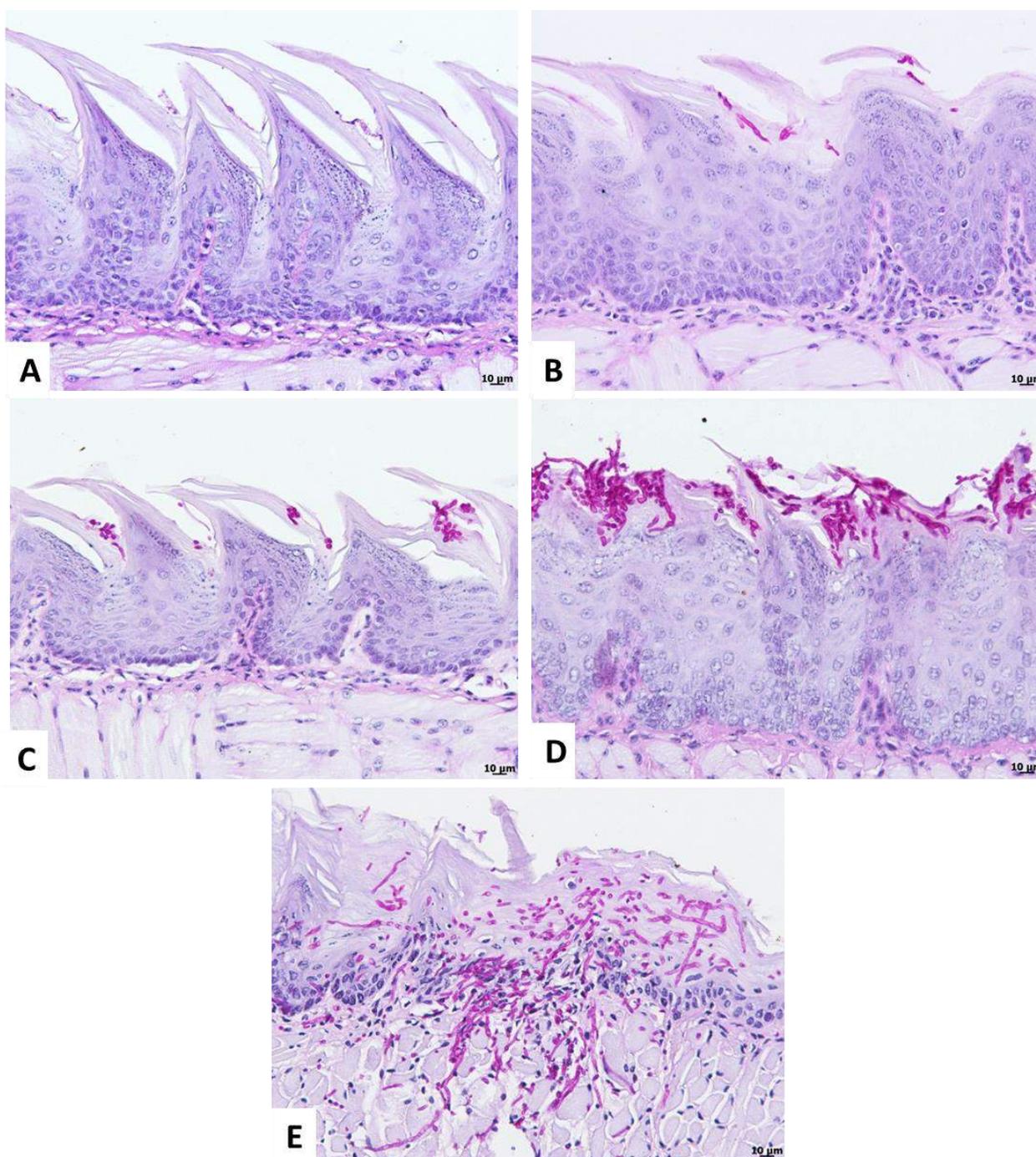
Apêndices

APÊNDICE F - **Imagens microscópicas dos rins de camundongos BALB/c saudáveis (não infectados) que receberam por gavagem, durante 7 dias, 100 mg/mL de fluconazol (grupo FLU).** Glomérulos renais com padrões de normalidade (**A e B**). Em **B**, note espaço de Bowman (ponta de seta) e os túbulos distais. Glomérulos renais maiores e mais celularizados com áreas micro-hemorrágicas (**C e D**). Em **D**, note a perda/diminuição do espaço de Bowman (ponta de seta preta) pelo maior volume dos túbulos capilares e com algumas hemácias ao redor do glomérulo (ponta de seta preta) (**D**). As lâminas microscópicas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum nos aumentos de 40x e 100x.



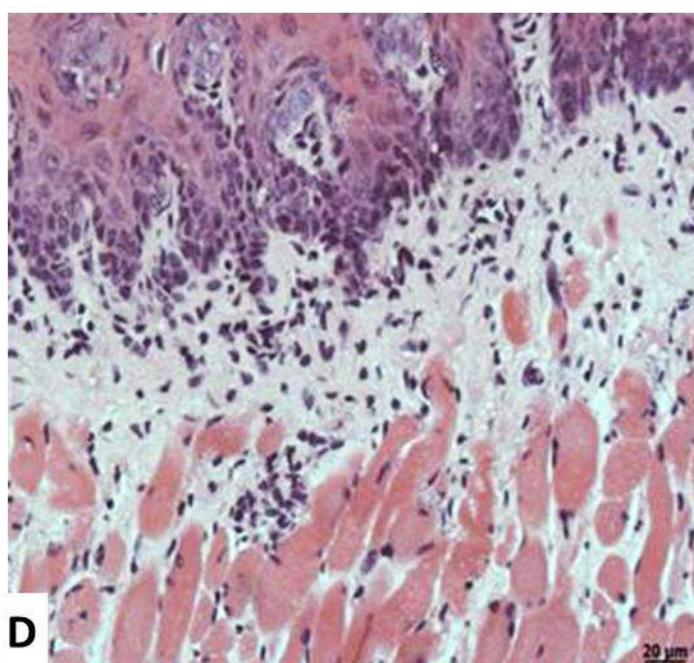
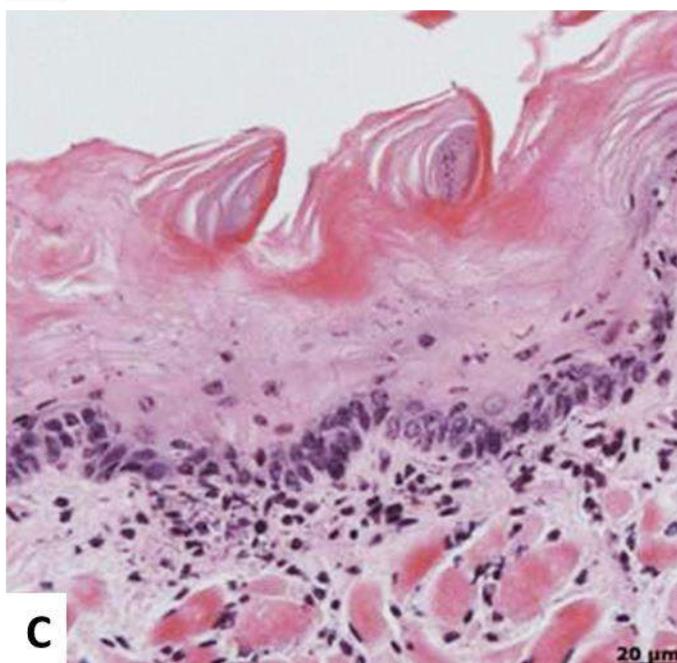
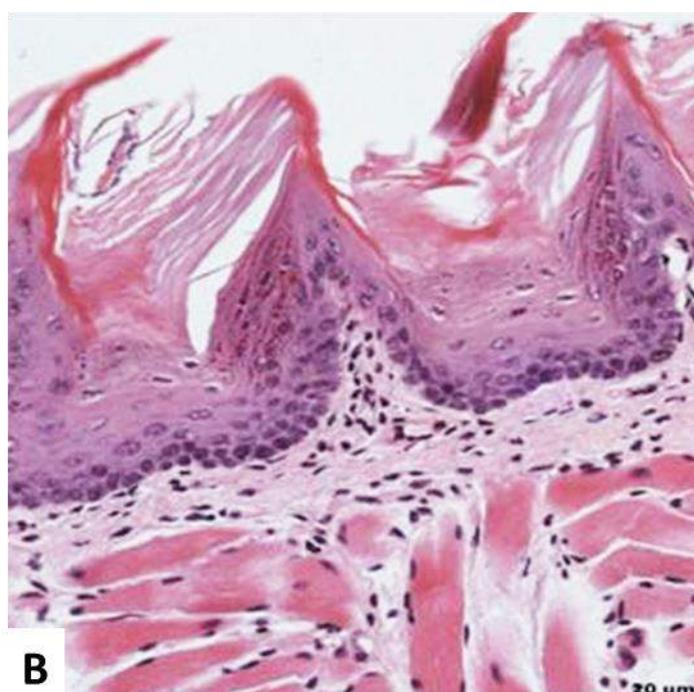
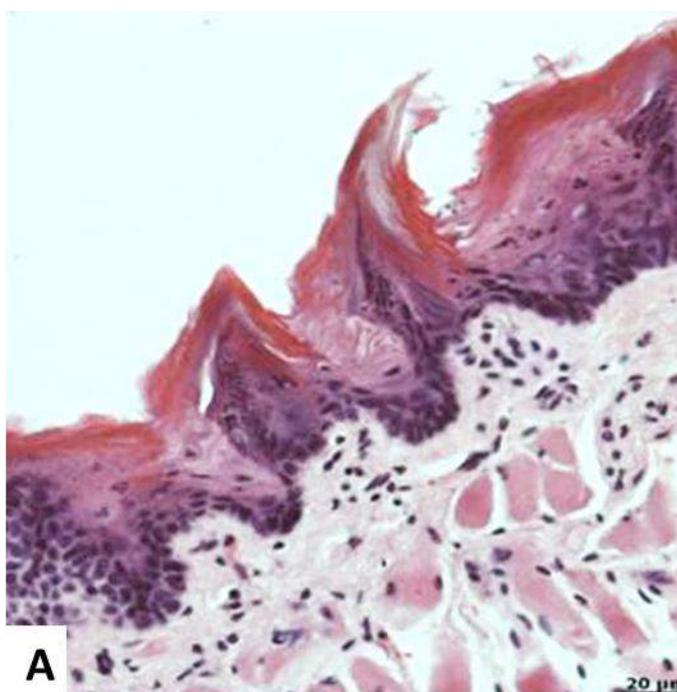
Apêndices

APÊNDICE G - **Imagens representativas dos diferentes escores microscópicos referentes à quantificação de leveduras/hifas de *C. albicans* no dorso da língua dos animais.** Revestimento epitelial do tipo pseudoestratificado pavimentoso queratinizado com a presença de papilas filiformes sem nenhuma levedura/hifa **(A)**, ou com 1 a 5 **(B)**; ou 6 a 15 **(C)**; ou 16 a 50 leveduras/hifas **(D)** na sua superfície; ou mais de 50 leveduras/hifas penetrando no tecido conjuntivo subjacente com ausência de papilas filiformes e presença de hiperplasia epitelial **(E)**. As lâminas microscópicas foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum no aumento de 40x.



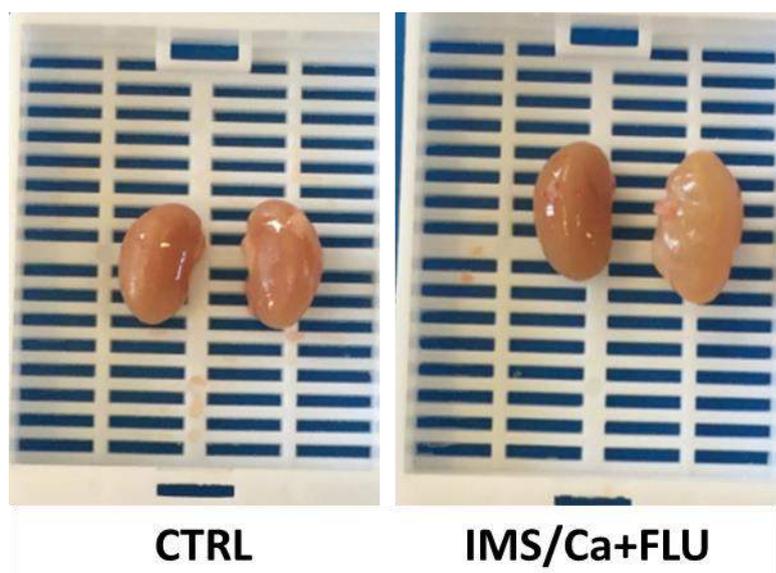
Apêndices

APÊNDICE H - **Imagens representativas dos diferentes escores microscópicos referentes à intensidade do infiltrado inflamatório intra e subepitelial no dorso da língua dos animais.** Revestimento epitelial do tipo pseudoestratificado pavimentoso queratinizado com a presença de papilas filiformes e, no tecido conjuntivo fibroso subjacente, há ausência de infiltrado inflamatório **(A)**, ou presença de leve **(B)**, moderado **(C)** ou intenso **(D)** infiltrado inflamatório subepitelial mononuclear. Nos casos **C** e **D**, notam-se células inflamatórias intraepiteliais (exocitose). As lâminas microscópicas foram coradas com Hematoxilina/Eosina (H&E) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum no aumento de 40x.



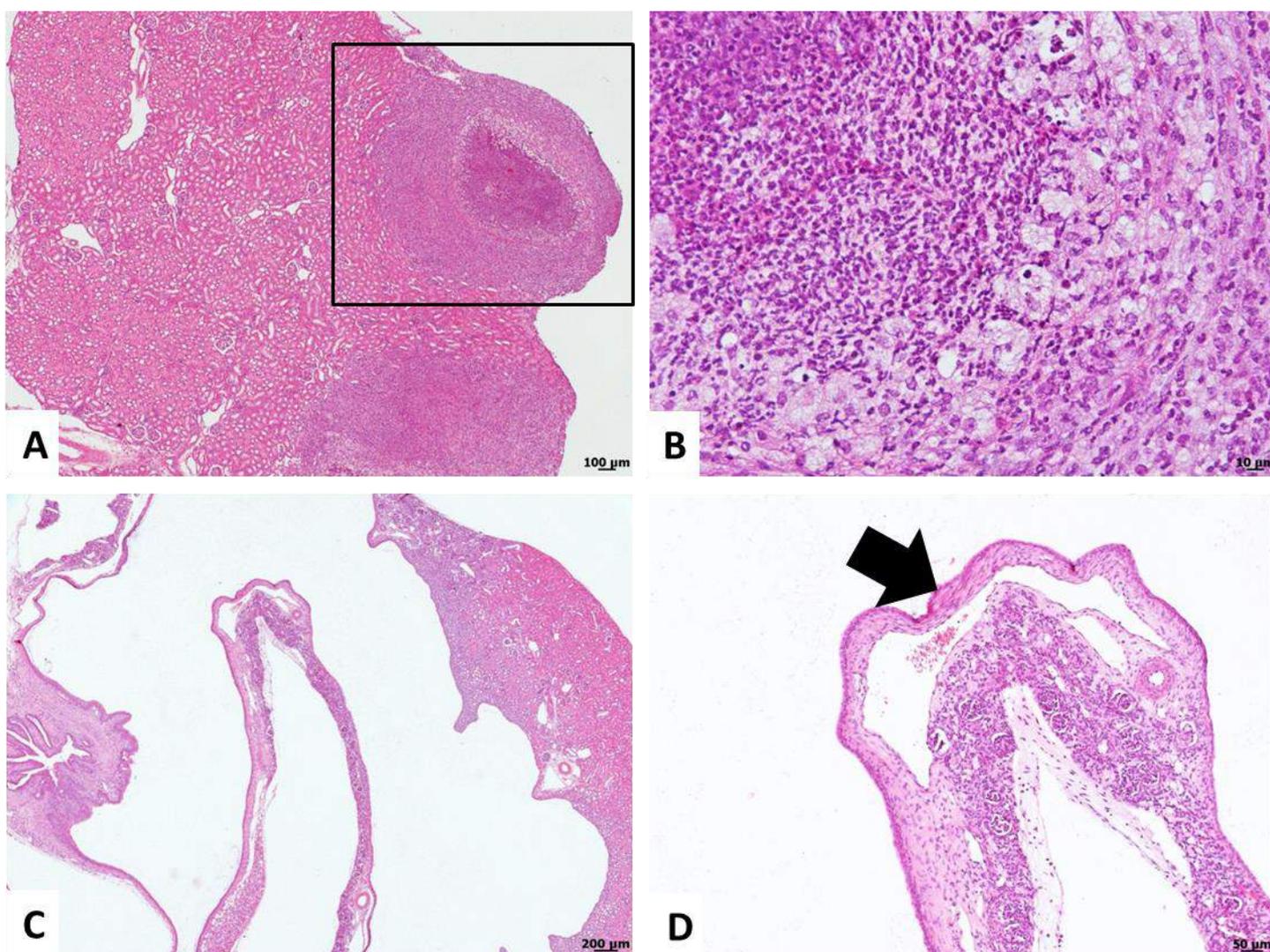
Apêndices

APÊNDICE I – Imagens macroscópicas dos rins de camungondos BALB/c infectados por *Candida albicans* e tratados durante 7 dias, por gavagem, com 100 mg/mL de fluconazol (IMS/Ca+FLU). Na esquerda, rins dos animais do grupo CTRL. Na direita, rins dos animais do grupo IMS/Ca+FLU. Note a alteração da coloração e o tamanho, além do aspecto entumescido no rim direito deste grupo, características compatíveis com tumefação tecidual.



Apêndices

APÊNDICE J - **Imagens microscópicas dos rins de camundongos BALB/c infectados por *Candida albicans* e tratados durante 7 dias, por gavagem, com 100 mg/mL de fluconazol (IMS/Ca+FLU).** Estas imagens foram retiradas do órgão que apresentou características macroscópicas de tumefação tecidual citada anteriormente no APÊNDICE I. Cisto simples no córtex renal (área quadrangular preta) de acordo com Garfield e Leslie (2020). Em **B**, note a presença expressiva de células inflamatórias e hemácias em seu interior. Espaço negativo indicando presença de cavidade cística (**C e D**). Em **D**, note a presença de epitélio simples cúbico adentrando o parênquima renal (ponta de seta). As lâminas microscópicas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e os cortes foram analisados através de microscopia óptica comum nos aumentos de 2.5x, 4x, e 40x.



Alexis

ANEXO A – Certificado Comitê de Ética (UNESP/Bauru)

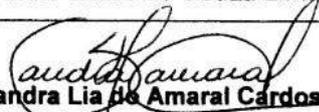


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Bauru

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de *Punica granatum* Linné utilizando diferentes modelos experimentais in vivo de candidose**", registrada com o nº **206/2018 Vol. 1**, sob a responsabilidade de NARA LÍGIA MARTINS ALMEIDA, aluna de doutorado da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - FOB/USP, sob orientação da Profª Adjª VANESSA SOARES LARA (FOB/USP) e com a co-orientação da Profª. Drª. MARIA SUELI PARREIRA DE ARRUDA, junto ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 03/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 05/05/2018 a 31/04/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico/BALB/c
Nº de animais	160
Peso/Idade	10 - 22g/6-8s
Sexo	Fêmea
Origem	Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru/SP


Profª Drª Sandra Lia de Amaral Cardoso.

Vice-Coordenadora da CEUA no exercício da Coordenação

ANEXO B – Limites decritos pelo controle de qualidade (QC) utilizados para a elaboração da curva-padrão (expected range) dos kits MILLIPLEX® Mouse cat# Th17/MTH17MAG-47K e cat# TGFβ 1,2,3/TGFBMAG-64K-03.

QUALITY CONTROL RANGES
MILLIPLEX® MAP Mouse Th17 Magnetic Bead Panel
Catalog # MTH17MAG-47K, MTH17MAG47K-PX25, MTH17MAG47PMX25BK
Control Catalog # MTH17-6047 Lot # MTH17-109 and MTH17-209

Analyte	QC Level	Expected Range	Units	Analyte	QC Level	Expected Range	Units	Analyte	QC Level	Expected Range	Units
IL-25 IL-17E	Control 1	8289 - 17216	pg/mL	IL-21	Control 1	241 - 500	pg/mL	IL-17A	Control 1	466 - 968	pg/mL
	Control 2	31907 - 66269	pg/mL		Control 2	923 - 1918	pg/mL		Control 2	1939 - 4027	pg/mL
GMCSE	Control 1	456 - 947	pg/mL	IL-22	Control 1	32 - 67	pg/mL	IL-17F	Control 1	123 - 256	pg/mL
	Control 2	1685 - 3501	pg/mL		Control 2	126 - 262	pg/mL		Control 2	486 - 1010	pg/mL
IFNγ	Control 1	99 - 206	pg/mL	IL-28B	Control 1	2241 - 4654	pg/mL	IL-33	Control 1	1029 - 2138	pg/mL
	Control 2	392 - 813	pg/mL		Control 2	8494 - 17641	pg/mL		Control 2	3916 - 8134	pg/mL
MIP3A	Control 1	813 - 1688	pg/mL	IL-10	Control 1	251 - 522	pg/mL	IL-31	Control 1	664 - 1379	pg/mL
	Control 2	2976 - 6181	pg/mL		Control 2	1002 - 2082	pg/mL		Control 2	2585 - 5369	pg/mL
IL-1-β	Control 1	183 - 380	pg/mL	IL-23	Control 1	4371 - 9078	pg/mL	TNF β	Control 1	5586 - 11601	pg/mL
	Control 2	729 - 1515	pg/mL		Control 2	16760 - 34809	pg/mL		Control 2	22018 - 45731	pg/mL
IL-2	Control 1	81 - 168	pg/mL	IL-12p70	Control 1	229 - 475	pg/mL	TNF α	Control 1	46 - 96	pg/mL
	Control 2	331 - 688	pg/mL		Control 2	977 - 2029	pg/mL		Control 2	178 - 370	pg/mL
IL-4	Control 1	19 - 40	pg/mL	IL-27	Control 1	9397 - 19516	pg/mL	CD40L	Control 1	715 - 1485	pg/mL
	Control 2	77 - 161	pg/mL		Control 2	35723 - 74194	pg/mL		Control 2	2653 - 5510	pg/mL
IL-5	Control 1	59 - 124	pg/mL	IL-13	Control 1	523 - 1654	pg/mL				
	Control 2	238 - 495	pg/mL		Control 2	2106 - 4373	pg/mL				
IL-6	Control 1	105 - 218	pg/mL	IL-15	Control 1	506 - 1051	pg/mL				
	Control 2	390 - 811	pg/mL		Control 2	1923 - 3994	pg/mL				

QUALITY CONTROL RANGES

MILLIPLEX® MAP TGF-β1,2,3 Plex Magnetic Bead Panel
Kit Catalog # TGFBMAG-64K-03

Control Catalog # TGFB-6064-3
Lot# TGFB-110 and TGFB-210

Analyte	QC Level	Expected Range	Units
TGFβ1	Control I	127 - 263	pg/mL
	Control II	522 - 1083	pg/mL
TGFβ2	Control I	132 - 274	pg/mL
	Control II	514 - 1069	pg/mL
TGFβ3	Control I	128 - 265	pg/mL
	Control II	534 - 1109	pg/mL

Note: The Quality Control Ranges are generated with overnight assay format using serum matrix provided in the kit. Quality Control values in culture media are not tested.