

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS DE *Sapindus saponaria*(L.) E PRÓPOLIS SOBRE *Candida albicans* ISOLADAS DE PACIENTES COM CANDIDÍASE VULVOVAGINAL DURANTE A ADESÃO EM LINHAGEM CELULAR.

Izabela Micheli Batalini(PIBIC/CNPq-UEM), Melyssa Negri e Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (orientador),e-mail: terezinha.svidzinski@gmail.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.

Ciências biológicas- Microbiologia.

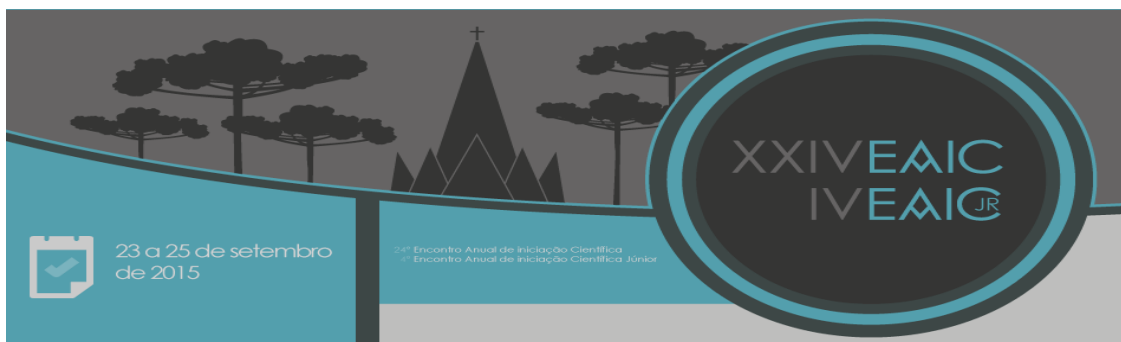
Palavras-chave: *Candida albicans*, *Sapindus saponaria* L., própolis, aspartil proteinase.

Resumo:

Candidíase vulvovaginal (CVV) está entre as infecções vaginais com maior prevalência e os episódios de recorrência podem estar relacionados à resistência antifúngica. Uma das alternativas para a redução na utilização de antifúngicos comerciais é a utilização de produtos naturais, pois são uma alternativa econômica e alvo para novos estudos. Dentre os produtos naturais, própolis e *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) têm apresentado inúmeras propriedades farmacêuticas, incluindo atividade antifúngica, sobretudo frente à espécie *Candida albicans*. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar a ação dos extratos de *S. saponaria* (SSE) e própolis (PES) durante a adesão em linhagem celular por *C. albicans* isoladas de CVV. No experimento foram utilizadas cepas de *C. albicans*, sendo dois isolados clínicos de CVV e uma cepa padrão ATCC 90028. Antes dos testes de adesão foi avaliado a citotoxicidade dos compostos SSE e PES em células HeLa. Durante a adesão em linhagem celular HeLa, as leveduras foram expostas ao SSE ou PES. Foram avaliados a capacidade de adesão por unidade formadora de colônia e a expressão das SAP's por PCR em tempo real. Observou-se que as cepas de *C. albicans* foram capazes de aderir em linhagem celular HeLa mesmo na presença de SSE e PES, porém estes compostos naturais interferiram na expressão das diferentes SAP's. Dessa forma, SSE e PES não impedem a adesão, mas influenciam na expressão de SAP's.

Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma das principais responsáveis pela infecção vaginal, sendo a espécie *Candida albicans* o agente mais frequentemente isolado (1). As causas da recorrência parecem estar potencialmente envolvidas com a terapêutica antifúngica prolongada, com cepas resistentes aos antifúngicos e fatores de virulência associados a



estes isolados. Assim, tem-se percebido a necessidade do desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Dentre estes produtos naturais, própolis e *S. saponaria* L. (Sapindaceae) destacam-se por ser uma importante alternativa terapêutica do ponto de vista econômico e eficácia farmacológica. Assim, o conhecimento de fatores de virulência de isolados de candidíase vulvovaginal como, capacidade de aderência em células e da produção de aspartil proteinases, durante o tratamento com extratos naturais tornam-se importantes para a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na patogenicidade desses micro-organismos e verificar a influência dos produtos naturais na patogenia de *C. albicans* (2,3).

Materiais e métodos

Foram utilizadas três cepas de *C. albicans*, sendo dois isolados clínicos de pacientes com CVV (A2 e 31MC), e uma cepa padrão ATCC 90028. Antes dos ensaios de adesão, foi avaliado a citotoxicidade dos compostos *Sapindus saponaria* L. *Sapindaceae* (SSE) e própolis (PES) utilizando o kit Cell Titer 96 (Promega, Madison, WI, EUA). Para avaliar a influência dos compostos naturais sobre a adesão de *C. albicans*, as leveduras foram expostas ao SSE ou PES durante a adesão em linhagem celular HeLa. Assim, as células HeLa foram pré-cultivadas a 37°C a 5% CO₂ em DMEM e um inóculo na concentração de 10⁷ leveduras/ml com 156,25µg/mL de SSE ou 273,43 µg/mL de PES foram colocadas em contato com as células durante 2 horas sob agitação em shaker a 60 rpm. Após o período de incubação, os poços foram lavados com PBS e avaliado a unidades formadoras de colônia (UFC) e a expressão de aspartil proteinases (4)

Resultados e Discussão

A incidência de CVV tem aumentado nos últimos anos, e *C. albicans* tem se mostrado como a espécie mais prevalente. As diferentes formas de CVV tem efeitos significativos na qualidade de vida do indivíduo impactando consideravelmente na saúde do mesmo. Além disso, o tratamento clínico do paciente conta com um limitado número de medicamentos e que muitas vezes apresentam certa toxicidade (1).

Dessa forma, o presente trabalho busca melhorar esse quadro aumentando assim o arsenal para o tratamento da CVV, estudando assim a possibilidade da utilização de extratos naturais (SSE e PES). Para isso primeiramente avaliou-se a citotoxicidade desses extratos em células HeLa. A viabilidade celular foi satisfatória para mais que 80% das concentrações testadas às 24 e 48 h, demonstrando a baixa toxicidade dos extratos em células humanas, SSE apresentou 100% de viabilidade em ambos os tempos testados, enquanto que PES apresentou 70% de viabilidade celular em 24 horas e 47% em 48 horas (Figura 1 A e B). Conforme observado por Capoci et al., 2014 (5) quando avaliou a toxicidade do PES.

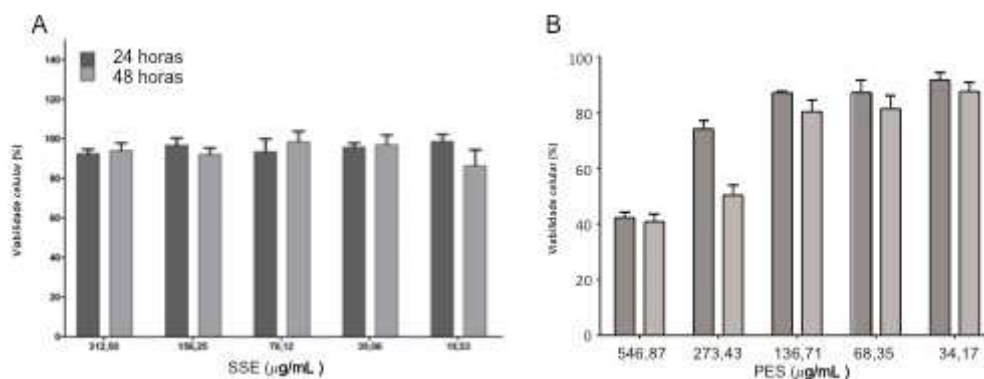
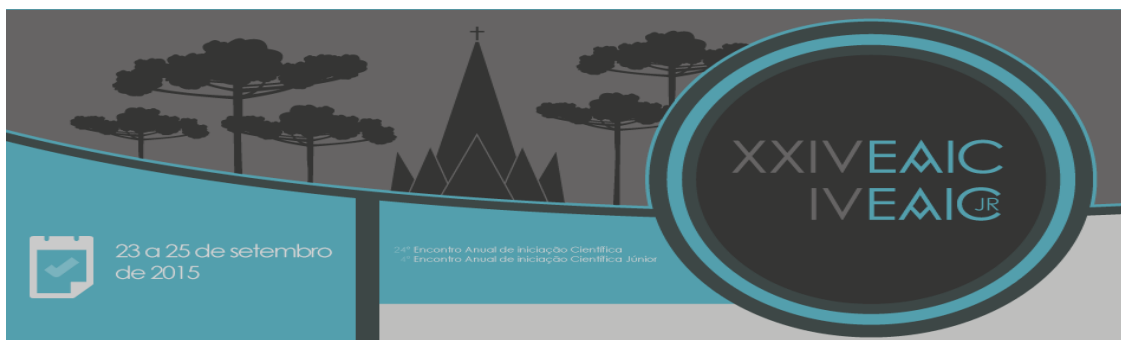


Figura 1. Viabilidade celular após a exposição aos extratos naturais nos tempos de 24 e 48 horas, através da técnica de MTS. A) Exposição aos extratos de *Sapindus saponaria* L. Sapindaceae (SSE); B) Exposição ao extrato de própolis (PES).

Apesar dos produtos naturais testados em nosso estudo não interferirem no processo de adesão de *C. albicans* em HeLa com $p > 0,005$ (Figura 2), estudos mostram que tanto o SSE quanto o PES tem ação antifúngica e PES é capaz de reduzir o biofilme de *C. albicans* (5). Sendo este, um importante fator, uma vez que esses produtos naturais não interferem na colonização (adesão), mas sim no processo de estabelecimento da infecção que seria a capacidade de formar biofilme. Quanto ao resultado das SAP's, observou-se que o SSE influencia neste processo. Nas amostras A2 e ATCC a expressão de SAP's aparece aumentada quando expostas ao SSE, enquanto que na amostra 31MC aparece diminuída.

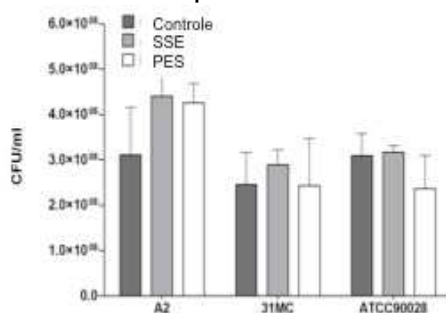


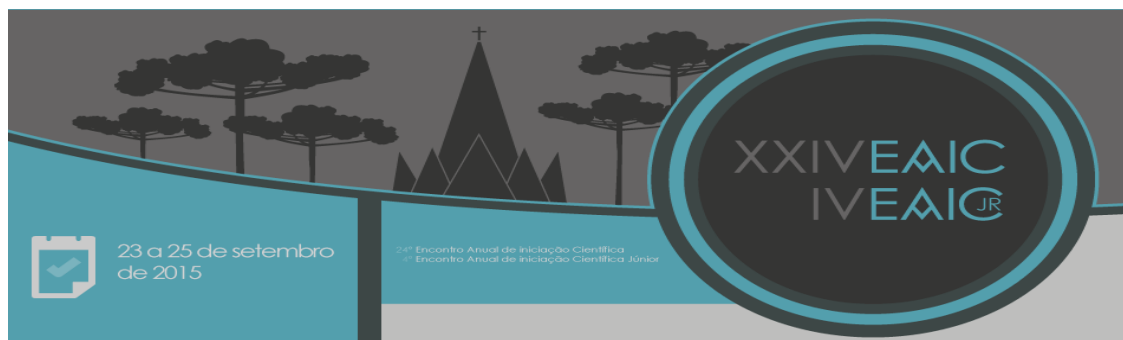
Figura 2. Capacidade de adesão em células humanas cervicais de *Candida albicans* (A2, 31MC são isolados clínicos de CVV e cepa referência ATCC 90028) na presença dos extratos de *Sapindus saponaria* L. Sapindaceae (SSE) ou própolis (PES).

Conclusões

Os resultados obtidos para a análise de adesão em linhagem celular HeLa, demonstraram que ambos produtos naturais testados SSE e PES não interferem nesse processo, mas influenciam na expressão de SAP's.

Agradecimentos

CNPq, CAPES e Fundação Araucária.



Referências

1. SOBEL, JD. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, p. 1961-1971, 2007.
2. TZUZUKI, JK et al: Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais Ac Bras Ciências** 2007; v.79, p.577-583.
3. NAILIS, H et al. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. **BMC Mol Biol**, v.4, p. 7-25, 2006.
4. NEGRI, M et al. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p. 1270-1275, 2011.
5. CAPOCI, I.R.G et al. Ação de *Sapindus saponaria* e própolis sobre a adesão e biofilme de *Candida albicans* isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal. In: V SIMPÓSIO DE BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA, Maringá, 2014.