



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCA CRISTIANE NOGUEIRA

EFEITO ANTIFÚNGICO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE
***Salvia hispanica* L. CONTRA CEPAS DE *Candida spp.* RESISTENTES DE**
INTERESSE CLÍNICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO*

FORTALEZA

2023

FRANCISCA CRISTIANE NOGUEIRA

EFEITO ANTIFÚNGICO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Salvia
hispanica* L. CONTRA CEPAS DE *Candida spp.* RESISTENTES DE INTERESSE
CLÍNICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N712e Nogueira, Francisca Cristiane.
Efeito antifúngico de um inibidor de tripsina de sementes de *Salvia hispanica* L. contra cepas de *Candida* spp. resistentes de interesse clínico e avaliação da toxicidade in vitro. / Francisca Cristiane Nogueira. – 2023.
86 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. *Salvia hispanica*. 2. Proteína. 3. *Candida albicans*. 4. Sinergismo. 5. Toxicidade. I. Título.
CDD 572
-

FRANCISCA CRISTIANE NOGUEIRA

EFEITO ANTIFÚNGICO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Salvia
hispanica* L. CONTRA CEPAS DE *Candida spp.* RESISTENTES DE INTERESSE
CLÍNICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de doutora em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Aprovada em: 24/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ayrles Fernanda Brandão da Silva
Perícia Forense do Ceará (PEFOCE)

Dra. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Raquel de Oliveira Rocha
Connecticut Agricultural Experiment Station (CAES)

Dedico à minha vó Rivalda (*in memoriam*),
meu primeiro exemplo de educadora e a pessoa
que mais se orgulharia dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

À Instituição Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. Código de Financiamento 001.

Aos meus pais, **Arleudo** e **Ziuná**, por todo amor e zelo. Que desde a infância me incentivaram e me guiaram pelo caminho dos estudos, sem medir esforços para me dar dignidade, educação e estímulo para trilhar o meu caminho. Mesmo distantes, cederam-me boas energias e força para não me desencorajar diante de todas as dificuldades do mundo longe de casa.

Às minhas irmãs, **Geilia Patrícia** e **Gerda Cristina**, por sempre torcerem e dá-me forças. Obrigada pelo laço de irmandade que se faz de alento nos meus momentos de dificuldades.

Ao meu namorado, **Maxwell Lima**, que pela grata surpresa da vida cruzou o meu caminho, tornou-se meu pilar de apoio, incentivo, cooperação e compreensão nos momentos mais difíceis e por ser minha alegria e companhia diária que tornaram meus dias mais leves.

Ao meu orientador **prof. Dr. Hermógenes David**, por ter me acolhido no seu laboratório desde o mestrado e me confiado a responsabilidade de buscar esse título tão importante. Muito obrigada por toda a trajetória científica que me ajudou a trilhar, por ser esse profissional que sempre me inspirei e por carregar consigo características humanas imprescindíveis, como: o espírito de justiça, empatia, respeito e grande admiração como professor, profissão esta que também decidi trilhar.

Aos meus amigos **Diêgo Chagas**, **Amanda Fernandes** e **Joana Grigório** por sempre me apoiarem, torcerem pelo meu sucesso, dividindo muitos momentos juntos e serem meu porto seguro de amizade da vida e os companheiros de trabalho/pesquisa do Laboratório de Química Medicinal: **Adriane Maia**, **Andréa Costa**, **Vilmara Farias**, **Rodolpho Guedes** e

especialmente, ao **Adson Ávila** pela parceria, paciência e por sempre me ajudar/orientar quando precisei.

Agradeço também a todos os pesquisadores do **Núcleo de Pesquisa em Desenvolvimento de Medicamentos – NPDM** que de alguma forma contribuíram com esse trabalho. Seja por empréstimo de equipamento, reagente ou pelos cafés e momentos de descontração que tornaram meus dias de experimento mais leves. Agradecimento especial a **Dona Ivaneide**, que sempre se dispôs a nos ajudar na limpeza/organização do laboratório, por dividir seu pequeno espaço de trabalho em uma copa improvisada do café da tarde e por seu abraço matinal, que sempre me transmitiu paz e afeto.

Gratidão a **EEMTI Adahil Barreto Cavalcante**, por ter me confiado a missão de educadora, especialmente a **prof. Sheila Lopes** e a **prof. Patrícia Sena**. À gestão, aos colegas professores e demais profissionais, agradeço a compreensão, os ensinamentos e por dividirem um ambiente de trabalho acolhedor e fraterno. Espero contribuir o quanto possível com a formação básica e humana dos nossos estudantes.

Ao **prof. Dr. Hélio Vitoriano** e aos demais membros do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), particularmente à **Dra. Livia Gurgel**, pela parceria nos ensaios de atividade antifúngica.

Agradeço à **prof.^a Dra. Daniele de Oliveira** e aos membros do Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX), particularmente a **Nadine Monteiro, Larissa Alves** e o servidor técnico da UFC **Rafael Guimarães**, pela assistência no estudo do modo de ação da atividade anticandida realizada neste trabalho.

Agradeço ao **prof. Odorico Moraes** e o colaborador **Bruno Cavalcanti**, do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), pelo auxílio nos ensaios toxicológicos realizados neste estudo.

Finalmente, agradeço às professoras/cientistas/mulheres da ciência que compõem essa banca examinadora: **Dra. Marjory Lima, Dra. Ayrles Brandão, Dra. Denise Cavalcante e Dra. Raquel Rocha**, pela apreciação deste trabalho e pelas valiosas contribuições no intuito de agregar qualidade à presente tese de doutorado. Muito obrigada pela disponibilidade e pela representatividade feminina que vocês simbolizam para a nossa ciência!

Os trabalhos experimentais que compõem esta tese foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições: **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ** - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas no Laboratório de Química Medicinal, sob a coordenação do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira; ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), sob coordenação do Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior; ao Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX), sob a coordenação da Prof.^a Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa; ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), sob coordenação do Prof. Dr. Manuel Odorico de Moraes e Prof.^a Dra. Cláudia Do Ó Pessoa e a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, no Departamento de Física da UFC. **CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)** – através de fomento à pesquisa. **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** através de concessão de bolsa de doutorado e de fomento à pesquisa. **FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP)**, por meio do apoio financeiro necessários na melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

RESUMO

Nos últimos anos, infecções fúngicas graves causadas por *Candida spp.* têm aumentado consideravelmente, bem como, os episódios de resistência aos antifúngicos convencionais. Esse cenário tem provocado o aumento dos custos com tratamento hospitalar mortalidade dos pacientes, o que reforça a necessidade de novas estratégias terapêuticas contra a resistência microbiana. O presente estudo avaliou o potencial antifúngico de um inibidor de tripsina termoestável isolado das sementes de *Salvia hispanica* L. (chia), aqui denominado de ShTI, contra *Candida spp.* resistentes ao fluconazol e a toxicidade *in vitro* em células de mamíferos. Para a determinação do efeito antifúngico de ShTI (0,02 - 8,22 μM) foi realizado o ensaio de microdiluição contra diferentes cepas de *Candida*. Tratamentos com ShTI e o antifúngico convencional fluconazol (CIM/2 a CIM/32) combinados também foram testados para avaliar um possível efeito sinérgico. Para avaliar o modo de ação, cepas de *C. krusey* (ATCC® 6258™) e *C. albicans* (cepa 1) tratadas com ShTI, foram analisadas quanto a integridade de membrana e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por microscopia de fluorescência, bem como, a morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A toxicidade de ShTI foi avaliada por ensaios de viabilidade (MTT) e morfologia celular e ensaio do cometa alcalino frente a cultura de fibroblastos L929, incubadas com ShTI (8,65 - 17,3 μM). Os resultados mostraram que ShTI foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas testadas: *C. parapsilosis* (ATCC® 22019), *C. krusey* (ATCC® 6258™) e cepas clínicas resistentes ao fluconazol: *C. albicans* (cepa 1 e 2), *C. parapsilosis* (cepa 1 e 2) e *C. tropicalis* (cepa 1 e 2) (CIM = 8,2 μM) e exibiu sinergismo contra *C. albicans* (cepa 1) (ICIF = 0,5) com alteração completa da estrutura morfológica da levedura. Além disso, ShTI promoveu um aumento da permeabilidade de membrana e a superprodução de EROs indicados por sinais de fluorescência e alterações morfológicas com a formação de poros, pseudohifas e extravasamento de fluido intracelular em células de *C. krusey* (ATCC® 6258™) e *C. albicans* (cepa 1). Além disso, ShTI não exibiu efeito cito- e genotóxico contra fibroblastos murinos nas concentrações testadas. Os resultados indicaram que ShTI é um candidato antifúngico promissor, especialmente contra espécies clínicas resistentes de *C. albicans* e demonstrou ser uma droga segura após ensaios toxicológicos preliminares *in vitro* em células de mamíferos. No entanto, tais estudos são preliminares e novos testes em modelo *in vivo* de infecção e ensaios toxicológicos pré-clínicos serão necessários para assegurar o uso de ShTI como uma nova droga.

Palavras-chave: *Salvia hispanica*; proteína; *Candida albicans*; sinergismo; toxicidade.

ABSTRACT

In recent years, serious fungal infections caused by *Candida spp.* have increased considerably, as well as episodes of resistance to conventional antifungals. This scenario has led to increased hospital treatment costs and patient mortality rates, which reinforces the need for new therapeutic strategies against microbial resistance. The present study evaluated the antifungal potential of a thermostable trypsin inhibitor isolated from *Salvia hispanica* L. (chia) seeds, here called ShTI, against *Candida spp.* resistant to fluconazole and *in vitro* toxicity in mammalian cells. To determine the antifungal effect of ShTI (0.02 to 8.22 μM) a microdilution assay was performed in broth in 96-well microplates against different strains of *Candida*. Combined treatments with ShTI and the conventional antifungal fluconazole (MIC/2 to MIC/32) were also tested to assess a possible synergistic effect. To evaluate the mode of action, strains of *C. krusey* (ATCC® 6258™) and *C. albicans* (strain 1) treated with ShTI were analyzed for cell membrane integrity and production of reactive oxygen species (ROS) by fluorescence microscopy, and cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The toxicity of ShTI was evaluated by viability (MTT) and, cell morphological assays and alkaline comet assay in L929 mouse fibroblast cell lines, incubated with ShTI (8.65 - 17.3 μM). The results showed that ShTI was able to inhibit the growth of all tested strains: *C. parapsilosis* (ATCC® 22019), *C. krusei* (ATCC® 6258™) and fluconazole resistant-clinical strains: *C. albicans* (strain 1 and 2), *C. parapsilosis* (strain 1 and 2), and *C. tropicalis* (strain 1 and 2) (MIC = 8.2 μM) besides exhibiting synergism against *C. albicans* (strain 1), (ICIF = 0.5) with complete alteration of the yeast morphological structure. Furthermore, ShTI promoted an increase in membrane permeability, overproduction of ROS indicated by fluorescence signals. Morphological changes with the formation of pores, pseudohyphae and extravasation of intracellular fluid, with the presence of pores *C. krusey* (ATCC® 6258™) and *C. albicans* (strain 1) cells. Furthermore, ShTI did not exhibit cyto- and genotoxic effects against murine fibroblasts at the tested concentrations. Results indicated that ShTI is a promising antifungal candidate, especially against clinically resistant species of *C. albicans* (strain 1), and has been shown to be a safe drug after preliminary *in vitro* toxicological assays in mammalian cells.

Keywords: *Salvia hispanica*; protein; *Candida albicans*; synergism; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de ação das principais drogas antifúngicas.....	21
Figura 2 – Mecanismos moleculares de resistências as drogas antifúngicas.....	26
Figura 3 – Representação esquemática dos diferentes modos de ação dos AMPs em células de leveduras.....	31
Figura 4 – Características botânicas da espécie vegetal <i>Salvia hispanica</i> L. (chia)	38
Figure 1 – Micrographs of <i>C. krusei</i> (ATCC® 6258™) and <i>C. albicans</i> (strain 1) cells to assess membrane permeabilization.....	56
Figure 2 – Micrographs of <i>C. krusei</i> (ATCC® 6258™) and <i>C. albicans</i> (strain 1) cells to assess membrane permeabilization.....	57
Figure 3 – Scanning electron micrographs of <i>C. krusei</i> (ATCC® 6258™) cells.....	61
Figure 4 – Scanning electron micrographs of <i>C. albicans</i> (strain 1) cells.....	62
Figure 5 – Cell viability assay (MTT test) of ShTI treatments (0.07 µM to 17.3 µM) in L929 mouse fibroblast cell lines.....	64
Figure 6 – Cell death pattern by apoptosis and necrosis of L929 mouse fibroblast cell lines after 24 h of incubation with ShTI (8.65 and 17.3 µM) in fluorescence microscopy.....	66
Figure 7 – Genotoxicity assay of ShTI (8.65 and 17.3 µM) in L929 culture cells by comet test.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos de resistência obtidos pelas espécies de <i>Candida spp.</i> as classes de drogas antifúngicas mais comuns.....	25
Tabela 2 – Aplicações terapêuticas de proteínas/peptídeos das sementes de <i>S. hispanica</i> (chia).....	40
Table 1 – Synergistic effect of ShTI and FLC against different <i>Candida</i> species.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	Peptídeos Antimicrobianos (do inglês, <i>Antimicrobial Peptides</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CFU	Unidades Formadoras de Colônias (do inglês, <i>Colony Forming Units</i>)
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DCFH-DA	2,7-diacetato de diclorofluoresceína (do inglês, 2'-7' <i>dichlorofluorescindiacetate</i>)
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada (do inglês, <i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>)
FLC	Fluconazol
IC50	Concentração Inibitória de 50% (do inglês, <i>Inhibitory concentration 50%</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês, <i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>)
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiozoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
PPIs	Inibidores de Protease de Plantas (do inglês, <i>Plant Protease Inhibitors</i>)
ShTI	Inibidor de Tripsina de <i>Salvia hispanica</i> L.
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	Infecções por espécies de fungos do gênero <i>Candida spp.</i>.....	18
2.2	Principais drogas usadas no tratamento de infecções fúngicas humanas....	21
2.3	Mecanismos de resistência de drogas adquiridos por espécies do gênero <i>Candida spp.</i>.....	25
2.4	Proteínas vegetais como fontes alternativas de novos antifúngicos.....	30
2.5	Características bioquímicas e aplicações antimicrobianas de inibidores de proteases de plantas.....	35
2.6	Características botânicas de <i>Salvia hispanica L.</i> (Chia) e aplicações farmacológicas na saúde humana.....	39
3	PERGUNTAS.....	45
4	HIPÓTESE.....	46
5	OBJETIVOS.....	47
5.1	Objetivo Geral.....	47
5.2	Objetivos Específicos.....	47
6	ARTIGO DA TESE.....	48
7	REFERÊNCIAS.....	80