

EFEITOS DE *Melaleuca alternifolia* NA CANDIDOSE BUCAL EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS

Cássia Fernandes Araujo¹, Vanessa Maria de Campos Rasteiro¹, Anna Carolina Borges Pereira da Costa¹, Antonio Olavo Cardoso Jorge¹, Juliana Campos Junqueira¹

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777 - Jardim São Dimas, São José dos Campos - SP, cassia.araujo@gmail.com

Resumo - O presente trabalho avaliou a atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* na candidose bucal induzida por *Candida albicans* em camundongos imunossuprimidos. Para a indução da candidose, os animais foram tratados com cloreto de tetraciclina a 0,83 mg/mL na água de beber e receberam injeções subcutâneas de prednisolona na dose de 100 mg/kg de massa corpórea. Os camundongos foram inoculados com swab embebido na suspensão contendo 10⁸ células/mL de *C. albicans*. Após a última aplicação de prednisolona, os animais foram submetidos a tratamento controle (solução fisiológica tampão fosfato, PBS) e aplicação do óleo essencial a 12,5% no dorso da língua, ambos por 3 vezes, a cada 5 minutos. Após 24h, foram sacrificados. Antes e depois dos tratamentos, foram coletadas leveduras da cavidade bucal. As coletas foram diluídas e semeadas para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e, a seguir, foram analisadas pelo teste *t* de Student, considerando-se nível de significância de 5%. O óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou redução estatisticamente significativa do número de UFC/mL do grupo tratado em relação ao grupo controle (p=0,001).

Palavras-chave: candidose experimental; camundongos imunossuprimidos, *Melaleuca alternifolia*, *Candida albicans*.

Área do Conhecimento: Odontologia/Microbiologia.

Introdução

A incidência de infecções fúngicas superficiais e profundas aumentou consideravelmente nos últimos 20 anos devido à maior utilização de medicamentos imunossupressores. Embora novos antifúngicos tenham sido licenciados recentemente, alguns pacientes permanecem difíceis de serem tratados. As principais razões para esse fato incluem resistência antifúngica intrínseca ou adquirida do microrganismo e disfunções do organismo que podem impedir a utilização de certos agentes medicamentosos. Além do mais, é grande a quantidade de fármacos associados a consideráveis eventos adversos (PASQUALOTTO et al., 2008). Atualmente, um dos grandes desafios da medicina e da odontologia é o manejo adequado das intercorrências infecciosas bacterianas e fúngicas que acometem a população. Apesar da disponibilização de novos antimicrobianos, o desenvolvimento de resistência bacteriana e fúngica tem aumentado significativamente, o que torna relevante o estudo de tratamentos alternativos (PICAZO et al., 2008).

A candidose bucal tem sido estudada em modelos animais experimentais, principalmente em ratos e camundongos, por desenvolverem lesões de candidose experimental na cavidade

bucal similares às observadas em seres humanos, além de apresentarem baixo custo e facilidade de manuseio. O desenvolvimento de trabalhos *in vivo* é de extrema importância, uma vez que a ação da terapia antimicrobiana em infecções bucais pode ser afetada pelas condições ambientais da mesma, como presença de saliva, variações de pH, características da mucosa e ação do sistema imunológico (KÖMERICK et al., 2003).

O interesse por estudos com produtos naturais, oriundos de plantas, é crescente em diversos países, objetivando o isolamento de substâncias com potentes atividades farmacológicas, antimicrobianas e que apresentem baixa toxicidade (LIMA, 2002). Trabalhos realizados *in vitro* demonstraram que *M. alternifolia* apresenta efeitos fungistáticos e fungicidas sobre *Candida albicans* (PARKER e LUZ, 2007; MONDELLO et al., 2006). Contudo, até o momento não há registro de estudos de *M. alternifolia* em modelos animais de candidose bucal experimental.

Metodologia

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP sob protocolo nº 024/2009-PA/CEP e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a

Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Utilizou-se 18 camundongos machos (*Mus musculus*, albinos, Swiss), com aproximadamente 12 semanas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

Para a indução da candidose os animais foram tratados com cloreto de tetraciclina a 0,83 mg/mL na água de beber durante todo o experimento, e imunossuprimidos com duas injeções subcutâneas de prednisolona (Depo-Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, Brasil) na região da calvária, dose de 100 mg/Kg de massa corporal. Essas injeções foram realizadas um dia antes e três dias após a inoculação de *Candida*. Para infecção de *Candida*, um swab umedecido na suspensão do microrganismo (10^8 células/mL) foi aplicado sobre o dorso da língua dos camundongos (TAKAKURA et al., 2003; MIMA et al., 2010).

Após a última aplicação de prednisolona, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de ketamina (União Química, São Paulo, Brasil), concentração de 100 mg/Kg de peso corporal, e Xylazina (Produtos Veterinários, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/Kg de peso corporal para aplicação do óleo essencial e tratamento controle (solução fisiológica tampão fosfato, PBS). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi pipetado no dorso da língua no volume de 50 μ L por três vezes em intervalos de 5 minutos, na concentração de 12,5%. No grupo controle foi pipetado solução fisiológica no mesmo volume e frequência. Após 24 horas, os animais foram submetidos à eutanásia por doses excessivas de anestésico.

Antes e depois do tratamento experimental foram coletadas leveduras da cavidade bucal dos animais. As coletas foram diluídas seriadamente e semeadas em ágar Sabouraud dextrose (37°C por 48h) para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). A seguir, os dados foram transformados em logaritmo e analisados pelo teste *t* de Student, considerando-se nível de significância de 5%.

Resultados

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou redução estatisticamente significativa do número de UFC/mL em relação ao grupo controle ($p=0,001$).

A Figura 1 compara os valores dos resultados de UFC/mL (Log) obtidos do Grupo Controle em relação ao Grupo tratado com Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia*.

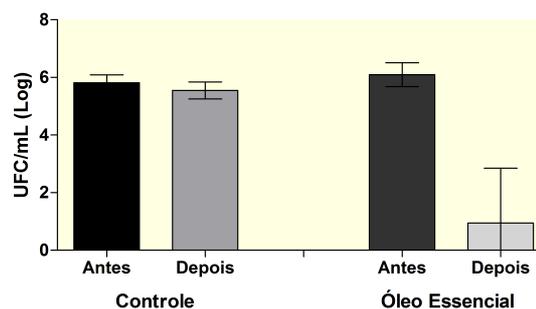


Figura 1 - Médias e desvios-padrão de UFC/mL (Log) de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos camundongos antes e depois do tratamento Controle e do tratamento com Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia*.

Discussão

Com o crescente número de infecções fúngicas, torna-se cada vez mais necessário o estudo do comportamento desses microrganismos, com o intuito de serem desenvolvidas alternativas de tratamento. A utilização de animais em pesquisa possibilita analisar a interação microrganismo-hospedeiro. Vários trabalhos foram desenvolvidos em animais para estudar a ação de fatores predisponentes e terapias para a candidose bucal, como a sialoadenectomia (JORGE et al., 1993; TOTTI, 2004; JUNQUEIRA et al., 2005) e terapias antifúngicas alternativas, como a terapia fotodinâmica (JUNQUEIRA et al., 2009; MIMA et al., 2010).

O óleo de *M. alternifolia* a 12,5% demonstrou ser eficaz no tratamento de candidose bucal induzida nos camundongos, apresentando redução de 5,15 \log_{10} . Esses resultados estão de acordo com Mondello et al. (2006), os quais avaliaram as propriedades antifúngicas dos componentes bioativos do óleo essencial de *M. alternifolia*, por meio de estudo *in vitro*, em cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*; e estudo *in vivo* na candidose vaginal induzida por *C. albicans* em modelos de ratas ovariectomizadas. Os autores concluíram que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou atividades fungistáticas e fungicidas para todas as espécies de *Candida* estudadas. Em relação ao estudo *in vivo*, verificou-se que três semanas após a indução de candidose experimental, os animais tratados com óleo essencial apresentaram resolução completa do processo infeccioso, enquanto que os animais do grupo controle apresentaram persistência da infecção. Ademais, os autores constataram que o componente *terpinen-4-ol* foi o mediador da atividade do óleo essencial tanto no estudo *in vitro* como *in vivo*.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi eficiente no tratamento da candidose bucal induzida nos camundongos, sendo considerado uma possível alternativa de tratamento para essa enfermidade.

Referências

- JORGE, A. O. C.; TOTTI, M. A.; DE ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Oral candidiasis established in the siloadenectomized rat. **J Oral Pathol Med.** 1993;22:54-6.
- JUNQUEIRA, J. C.; COLOMBO, C. E.; 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.** 2005;49(3):199-207.
- JUNQUEIRA, J. C.; MARTINS, J. S.; FARIA, R. L.; COLOMBO, C. E. D.; JORGE, A. O. C. Photodynamic therapy for the treatment of bucal candidiasis in rats. **Lasers Med Sci.** 2009;24:877-884.
- KÖMERIK, N.; NAKANISHI, H.; MACROBERT, A. J.; HENDERSON, B.; SPEIGHT, P.; WILSON, M. *In vivo* killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother.** 2003;47:932-40.
- LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Agros, 2002. p. 482-501.
- 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.** 2010;109(3):392-401.
- MONDELLO, F.; BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; CASSONE, A.; SALVATORE, G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azolesusceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Diseases.** 2006;6:1-8.
- PARKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn.** João Pessoa. 2007;17(1):102-107.
- PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. **J of Antimicrob Chemother.** 2008;61(1):19-30.
- PICAZO, J.J.; ROMO, F.G.; CANDEL, F.J. Candidemia in the critically ill patient. **International J of Antimicrob Agents.** 2008;32(2):83-85.
- 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(5):321-6.
- TOTTI, M. A. G.; SANTOS, E. B.; ALMEIDA, O. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. **Braz Oral Res.** 2004;18(3):202-7.

XIV INIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

X EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

IV INIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior