



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAIS HERRERO GERALDINO

**CONCANAVALINA-A AUMENTA A PRODUÇÃO DE TNF- α ,
A ATIVIDADE DE RECEPTORES DE MANOSE E A
CAPACIDADE DE DESTRUIR *Candida* POR MACRÓFAGOS
PERITONEAIS**

THAIS HERRERO GERALDINO

**CONCANAVALINA-A AUMENTA A PRODUÇÃO DE TNF- α ,
A ATIVIDADE DE RECEPTORES DE MANOSE E A
CAPACIDADE DE DESTRUIR *Candida* POR MACRÓFAGOS
PERITONEAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ionice Felipe

Londrina
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G354c Geraldino, Thais Herrero.
Concanavalina-A aumenta a produção de TNF- α , a atividade de recepção de manose e a capacidade de destruir *Candida* por macrófagos peritoneais
Herrero Geraldino. – Londrina, 2010.
93 f. : il.

Orientador: Ionice Felipe.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2010.
Inclui bibliografia.

1. *Candida albicans* – Teses. 2. *Candida albicans* – Patogenicidade – Teses. 3. Fungos patogênicos – Teses. 3. Macrófagos – Teses. I. Felipe, Ionice. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 576.8

THAIS HERRERO GERALDINO

**CONCANAVALINA-A AUMENTA A PRODUÇÃO DE TNF- α , A
ATIVIDADE DE RECEPTORES DE MANOSE E CAPACIDADE DE
DESTRUIR *Candida* POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ionice Felipe
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida
USP – Ribeirão Preto – SP

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho
UEL – Londrina – PR

Londrina, 22 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

A DEUS, pelo dom da vida, pelas graças e pela oportunidade de
conhecer tantas pessoas e poder aprender com elas.

A minha família, pelo carinho.

Ao meu pai, minha estrela lá no céu.

A minha mãe, meu grande alicerce, por estar presente tentando
ajudar nos momentos de dor e desespero e também nos momentos de alegria e
realização. Amo muito você...

Aos meus companheiros e grandes amigos de laboratório, pessoas
que fizeram e fazem a diferença em minha vida.

As pessoas que quando olho para trás, sinto muitas saudades...

As pessoas que me aconselharam quando me senti sozinha...

E a todas as pessoas que fazem parte da minha vida, e também,
àquelas que por algum motivo já não fazem mais...

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Ionice Felipe, sua força e determinação, mesmo quando todas as condições se mostram adversas são admiráveis. A paixão com que você se dedica à pesquisa é sem dúvida um exemplo. Obrigada pela oportunidade de fazer parte da sua equipe.

A Prof^a. Dr^a. Ivete Conchon Costa, pelo carinho, pelos conselhos e colaboração sempre que precisei.

A Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Ehara Watanabe, coordenadora do Programa de Pós-Graduação, pelo carinho e atenção disponibilizados para comigo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas do curso de mestrado, pela amizade e incentivo.

Aos grandes e verdadeiros amigos conquistados durante estes dois anos de curso. Meus companheiros de laboratório Paula, Custódio, Kamila e Lorena, não apenas pela amizade mas pela colaboração constante na realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Pedro, Zui e Vera, pelo carinho, apoio e disponibilidade nos momentos que precisei.

Ao Departamento de Ciências Patológicas e Fisiológicas, pela ajuda e colaboração no uso de alguns equipamentos.

A secretária do Departamento Ana, pela ajuda e atenção.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária por tornar possível este trabalho.

Agradeço enfim, a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Aos que me ouviram, aos que me apoiaram, aos que me ensinaram, aos que me incentivaram, meus sinceros agradecimentos.

GERALDINO, Thais Herrero. **Concanavalina-a aumenta a produção de tnf- α , a atividade de receptores de manose e capacidade de destruir *Candida* por macrófagos peritoneais**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

RESUMO

O reconhecimento de *Candida albicans* por receptores tipo Toll e receptores de lectina em células fagocíticas ativam vias de sinalização intracelular que disparam a produção de citocinas pró-inflamatórias que são importantes para a defesa do hospedeiro. A resposta Th1 fornece o controle da infectividade por fungos pelo aumento da expressão de receptores que agem como sensores para indução da infecção e ativação da resposta imune inata assim como o subsequente desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou o papel protetor de Concanavalina-A (Con-A) contra um inóculo letal de *C. albicans* e indicou que os macrófagos são as principais células efetoras na eliminação do patógeno. O principal objetivo deste estudo foi investigar a atividade dos receptores de manose e a produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), assim como, o aumento na capacidade para destruir o patógeno por macrófagos ativados de camundongos pré-tratados com Con-A. Então, macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS foram coincubados com isolados de *C. albicans* CR1, CR15 e 577 por 0.5, 1 e 2h. A capacidade de macrófagos ativados com Con-A produzir TNF- α , ingerir via receptores de manose e destruir todos os isolados foi significativamente maior comparados aos macrófagos PBS e os macrófagos ativados exibiram uma menor incidência de apoptose, verificado pela ligação da anexina V-FITC. A transição de células leveduriformes para forma filamentosa durante coincubação por 2h com macrófagos controle foi em torno de 73 a 80%, enquanto na presença de macrófagos ativados com Con-A, foi de 35 a 40%. Nossos resultados sugerem que a capacidade de melhor depurar a infecção por *C. albicans* através do tratamento com Con-A é provavelmente devido a ativação dos macrófagos, que produzem mais TNF- α , expressam mais receptores de manose e são mais capacitados para destruir *C. albicans* fagocitada.

Palavras-chave: Concanavalina-A. *Candida albicans*. Macrófagos peritoneais. TNF- α . Receptor de manose.

GERALDINO, Thais Herrero. **Concanavalina-a aumenta a produção de tnf- α , a atividade de receptores de manose e capacidade de destruir *candida* por macrófagos peritoneais**. 2010. 71 f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Patology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

ABSTRACT

Recognition of *Candida albicans* by Toll-like receptors and lectin receptors on the phagocytic cells activates intracellular signaling pathways that trigger production of proinflammatory cytokines that are critical for host defence. Th1-response provide control of fungal infectivity by increasing the expression of receptors that acts as sensors for infection inducing the activation of the innate immune responses as well as the subsequent development of adaptive immune responses. In previous work, our group demonstrated the protective role of concanavalin-A (Con-A) for a lethal inoculum of *C. albicans* and indicated the macrophages as main effectors cells to clear the pathogen. The main objective of this study was to investigate the activity of mannose receptors and tumor necrose factor-alpha (TNF- α) production, as well as, the increase in capacity to kill the pathogen by activated macrophages from mice pretreated with Con-A. Thus, peritoneal macrophages from mice pretreated for three days with Con-A or PBS were coincubated with CR1, CR15 and 577 isolates of *C. albicans* for 0.5, 1 and 2 h. The ability of Con-Activated macrophages to produce TNF- α , ingest via mannose receptors and kill all the isolates was significantly greater compared to PBS-treated macrophages and activated macrophages exhibited a lower incidence of apoptosis, verified by binding to annexin V-FITC. The transition of yeast cells to filamentous forms during coincubation for 2h with control macrophages was about 73 to 80%, whereas in presence of Con-A-activated macrophages, it was 35 to 40%. Taken together, our results suggest that a greater clearance of *C. albicans* infection through treatment with Con-A is probably due to activation of macrophages, which produce more TNF- α , expresses more mannose receptors and are better endowed to kill ingested *C. albicans*.

Keywords: Concanavalin-A. *Candida albicans*. Peritoneal macrophages. TNF- α . Mannose receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Cascata de sinais de transdução para formação de hifas em <i>Candida albicans</i>	20
Figura 2 –	Modelo hipotético para a correlação da expressão de genes SAP com a patogenicidade em <i>Candida albicans</i>	24
Figura 3 –	Aparência morfológica dos isolados de <i>Candida albicans</i>	42
Figura 4 –	Exposição da fosfatidilserina após incubação de macrófagos com <i>Candida albicans</i> CR15	43
Figura 5 –	Micrografia de fluorescência de macrófagos corados com iodeto de propídeo e 6-	44
Figura 6 –	Efeito da administração de Concanavalina-A na fagocitose de <i>Candida albicans</i> mortas pelo	46
Figura 7 –	Efeito da administração de Concanavalina-A na fagocitose de <i>Candida albicans</i> vivas	47
Figura 8 –	Avaliação da expressão dos receptores de manose pela ligação do FITC-manose-BSA	48
Figura 9 –	Efeito de Concanavalina-A na produção de TNF- α por macrófagos	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALS	Agglutinin-Like Sequence
ALT	Alanina transaminase
ATP	Adenosina trifosfato
Con-A	Concanavalina-A
CO₂	Gás Carbônico
COV	Candidíase orofaríngea
CR	Receptor de complemento
CVV	Candidíase vulvovaginal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FcR	Receptor de anticorpo
Fig	Figura
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
Gp	Glicoproteína
GPI	Glicosil Fosfatidil Inusitol
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hwp	Hiphal wall protein 1
IHs	Infecções Hospitalares
IFN-γ	Interferon - gama
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleucina
IMC	Imunidade mediada por célula

Kda	Quilodáltons
LPS	Lipopolissacarídeo
Mb	Milhões de bases
M-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP-2	Proteína inflamatória macrofágica
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NFkB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator agregador das plaquetas
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogênionico
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
ROS	Espécies reativas do oxigênio
S	Soro
SAPs	Aspartil proteinases
SFB	Soro fetal bovino
spp	espécie não identificada
TCR	Receptor de células T
Th1	Linfócitos T helper 1

Th2	Linfócitos T helper 2
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral – alfa
TNF-β	Fator de necrose tumoral – beta
UFC	Unidade formadora de colônia
vs	Versus
μg	Microgramas
μl	Microlitro
6-CFDA – 6	Carboxifluoresceína diacetato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CANDIDA ALBICANS	14
1.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	16
1.2.1	Parede Celular	16
1.2.2	Adesinas	17
1.2.3	Dimorfismo	19
1.2.4	Aspartil Proteinases	22
1.2.5	Fosfolipases	25
1.3	MORTE CELULAR: APOPTOSE E NECROSE	26
1.4	RESPOSTA IMUNE À <i>Candida Albicans</i>	28
2	OBJETIVOS	38
2.1	GERAL	38
2.2	ESPECÍFICOS	38
3	MATERIAS E MÉTODOS	38
3.1	ANIMAIS	38
3.2	ISOLADOS DE <i>Candida Albicans</i>	38
3.3	CULTURA DE <i>Candida Albicans</i>	38
3.4	MACRÓFAGOS E ENSAIOS FAGOCÍTICOS	39
3.5	EXPRESSÃO E ATIVIDADE DOS RECEPTORES DE MANOSE	40
3.6	DIMORFISMO	40
3.7	ENSAIOS DE APOPTOSE	40
3.8	ENSAIOS DE TNF- α	41
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4	RESULTADOS	42
4.1	DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE ISOLADOS DE <i>Candida Albicans</i>	42
4.2	APOPTOSE E NECROSE DE MACRÓFAGOS	43
4.3	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CON-A NA FAGOCITOSE DE <i>Cândida</i>	45

4.4	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CON-A NA ATIVIDADE DOS RECEPTORES DE MANOSE	47
4.5	EFEITO DE CON-A NA PRODUÇÃO DE TNF-A POR MACRÓFAGOS	49
4.6	TRANSIÇÃO DA FORMA DE LEVEDURA PARA FILAMENTOSA DURANTE COINCUBAÇÃO COM MACRÓFAGOS	51
5	DISCUSSÃO	53
	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 CANDIDA ALBICANS

C. albicans é um fungo pertencente ao filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales, diplóide, com genoma nuclear contendo aproximadamente $1,6 \times 10^7$ pb, distribuídos em oito cromossomos com tamanho variando entre 1,03 e 4,3 Mb. O gênero é constituído de aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, das quais 10% podem causar infecções em seres humanos. Destas, *C. albicans* é a espécie mais freqüentemente descrita em casos de infecções hospitalares (IHs) em vários países e apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença. Entretanto, outras espécies como *parapsilosis*, *tropicalis* e *glabrata* também apresentam altas prevalências em vários países do mundo. (MALUCHE; SANTOS, 2008).

C. albicans possui notável capacidade de sobreviver e proliferar mesmo sob mudanças radicais do ambiente, adaptando-se aos extremos de pH, osmolaridade, disponibilidade de nutrientes e temperaturas (HUBE, 2004). Essa versatilidade contribui para o sucesso de *C. albicans* como colonizador de diferentes sítios anatômicos em indivíduos saudáveis. Como patógeno, causa infecção em diferentes locais do corpo, especialmente em pacientes imunocomprometidos (ÁLVARES et al., 2007).

Espécies de *Candida* podem colonizar a cavidade oral, trato gastrointestinal, respiratório e urinário. Cerca de 20 a 80% da população humana apresenta colonização no tubo gastrintestinal sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais a sua saúde. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos (JOUAULT et al., 2009).

A candidíase se manifesta quando fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e mecânicos, modificam o relacionamento que ocorre entre

o hospedeiro e a microbiota natural. Ou seja, a relação de comensal é dependente da manutenção da integridade do tecido do hospedeiro, da microbiota normal assim como do sistema imune intacto. Neste caso a candidíase pode ser localizada, determinando sintomatologia restrita a essa área, ou sistêmica e fatal (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Condições fisiológicas como gravidez e patológicas como: *diabetes mellitus*, prematuridade, câncer, queimaduras, desnutrição, imunodeficiências, terapêutica prolongada com antibióticos de amplo espectro, agentes imunossupressores e antitumorais, corticosteróides, nutrição parenteral, uso de cateteres arteriais ou endovenosos, ventilação artificial, procedimentos cirúrgicos, predisõem à infecção por espécies de *Candida* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

Também, os extremos do ciclo de vida humana, infância e velhice, constituem indubitavelmente as fases de existência do homem onde os relatos de ocorrência de candidíase são mais propícios, em decorrência do aprimoramento ou deficiência fisiológica do sistema imune. A morbidade e mortalidade associada a estas infecções são substanciais, e está claro que as doenças fúngicas têm emergido como um importante problema de saúde pública (RIBEIRO et al., 2004).

A incidência de infecções hospitalares (IHs) por fungos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas acarretando altos índices de mortalidade que atingem até 60% dos óbitos por IHs (ZARDO; MEZZARI, 2004). Em hospitais terciários, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, o que torna este microrganismo um significativo patógeno nosocomial, podendo ser responsável por uma variedade de quadros clínicos, desde infecções superficiais de mucosa, como candidíase vulvovaginal (CVV) e orofaríngea (COF), até infecções sistêmicas com disseminação para órgãos parenquimais (CHANG et al., 2005). A candidemia pode ocorrer através da via endógena, no qual há a translocação de *Candida sp.* do trato gastrointestinal até os capilares mesentéricos. Sendo assim, fatores que aumentem a colonização intestinal por *Candida* (uso de antibióticos ou oclusão intestinal) ou determinem atrofia ou lesão de mucosa intestinal (jejum prolongado, nutrição parenteral total, hipotensão, quimioterapia) pode potencializar este fenômeno. A via exógena ocorre através do contato das mãos de profissionais de saúde, com pacientes portadores de cateteres vasculares em posição central, implante de próteses contaminadas, bem como pela

administração parenteral de soluções contaminadas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

No Brasil e no mundo, existem vários grupos de pesquisadores preocupados com a importância das IHS por leveduras tendo em vista os altos níveis de morbidade e mortalidade. Têm sido realizados muitos estudos epidemiológicos e de resistência aos antifúngicos. Porém, são escassos os relacionados ao potencial de virulência desses microrganismos e talvez essa seja uma das principais causas do aumento das infecções hospitalares por leveduras (ZARDO; MEZZARI, 2004).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência do microrganismo é o resultado de uma multiplicidade de fatores que agem simultaneamente para vencer as defesas do hospedeiro. No caso da infecção por *Candida*, estes fatores podem estar correlacionados com a aderência à célula epitelial, a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lipases), a capacidade de transição das formas de levedura para hifas, além de alteração fenotípica da colônia (*switching* fenotípico). Outro importante fator de virulência é a composição da parede celular, que confere proteção contra a lise osmótica e medeia a interação inicial entre o microrganismo e o hospedeiro facilitando a adesão e a penetração através do tecido infectado (NAGLIK et al., 2004).

Sendo assim, é geralmente aceito que a virulência ou patogênese de *C. albicans* é um evento multifatorial, governado pela capacidade de o microrganismo adaptar-se com eficiência a mudanças ambientais e, finalmente, coordenar a expressão de vários genes de virulência (TAMURA et al., 2007).

1.2.1 Parede Celular

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura complexa e de grande importância para o fungo, pois suas proteínas de superfície desenvolvem um

papel fundamental na integridade estrutural da parede, medeiam à aderência e a interação inicial entre o microrganismo e o hospedeiro, além de apresentarem funções enzimáticas. Para *C. albicans*, a parede celular tem sido alvo constante de atenção nas últimas décadas, pois estudos relacionados à identificação e a distribuição dos componentes da parede celular podem contribuir para o conhecimento do seu papel na patogênese fúngica (ex.: expressão de adesinas e receptores para proteínas do hospedeiro; atividade proteolítica extracelular e hidrofobicidade) e na interação parasito-hospedeiro (CHAFFIN, 2008).

A parede celular de *C. albicans* é composta por complexos polímeros de glicose com ligações β -1,3 e β -1,6 (β -glucanas), cadeias de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) com ligações β -1,4 (quitina) e polímeros de manose (manana) em associação covalente com proteínas (glico[mano]proteínas), formando assim, a porção polissacarídica da parede celular. As β -glucanas são os principais constituintes, respondendo por 50 a 60% do peso da parede celular e juntamente com a quitina (um componente relativamente menor (0,6 a 3%)), apresentam uma função estrutural formando um rígido esqueleto que proporciona uma forte propriedade física (KAPTEYN et al., 2000). A quitina desenvolve ainda uma importante função na reprodução do fungo por formar uma constrição entre a célula parenteral e a célula filha durante o brotamento. Além disso, a parede celular apresenta ainda proteínas (6 a 25%) e uma pequena porção de lipídeos (1 a 7%) (CABIB et al., 2001).

As manoproteínas constituem componentes imunodominantes presentes na parede celular de *C. albicans* e representam 30 a 40% de sua composição, determinam as propriedades da superfície celular e têm sido associadas a aderência, modulação e supressão da resposta imune celular (RUIZ-HERRERA et al., 2006).

1.2.2 Adesinas

A aderência pode ser mediada por uma variedade de proteínas expressas na superfície do microrganismo, incluindo uma família de genes, *Agglutinin-Like Sequence (ALS)* que codificam oito destas proteínas de superfície,

ALS1 a ALS7 e ALS9 (ZHAO et al., 2004). Mutantes deficientes nos genes que codificam estas adesinas não somente exibiram diminuição na aderência aos substratos do hospedeiro *in vitro*, mas também uma correspondente redução na virulência em vários modelos experimentais de infecção por *C. albicans* (SHEPPARD et al., 2004).

Duas destas proteínas codificadas por estes genes, Als1p e Als5p têm sido relacionadas com a função adesiva de *C. albicans*. A Als5p medeia a adesão inicial da levedura a substratos cobertos com proteínas da matriz celular e com células epiteliais humanas. A aderência mediada por esta proteína ocorre dentro de minutos e é forte o suficiente para resistir à agitação, mas é reversivelmente inibida por agentes desnaturantes como formaldeído, pH alto ou uréia (ZHAO et al., 2005). Com relação a Als1p, Kamai et al. (2002) demonstraram em modelo experimental de candidíase oral em camundongos que células de *C. albicans* nocaute para ALS1 aderiam menos do que cepas selvagens, mostrando a importância desta proteína no processo de aderência tanto *in vitro* como *in vivo*.

Phan et al. (2007) descobriram que Als3, expressa na superfície de *C. albicans*, é requerida no processo de invasão celular. Esta proteína se liga a caderinas de células endoteliais e células epiteliais orais, e esta ligação induz as células do hospedeiro a endocitar o fungo. Recentemente Almeida e colaboradores (2008) demonstraram que *C. albicans* na forma de hifa utiliza a adesina Als3 para ligar-se a ferritina no interior de células epiteliais e adquirir o ferro para seu crescimento. Mutantes para Als3 falharam na ligação com a ferritina, cresceram menos com ferritina como fonte de ferro e foram incapazes de danificar as células do hospedeiro, portanto, Als3 além de adesina e invasina confere ao fungo a capacidade de explorar uma fonte de ferro do hospedeiro.

Segundo Ribeiro et al. (2007) a formação dos tubos germinativos (quando a *Candida* passa da forma leveduriforme para a forma filamentosa) favorece a capacidade de aderência de *C. albicans* que envolve por parte do fungo: glicoproteínas de superfície, proteínas do tipo lectinas, que reconhecem diferentes tipos de carboidratos e receptores para a fração C3b do sistema complemento. E por parte das células epiteliais do hospedeiro, receptores para as adesinas de *Candida* como fibronectina, fibrina e laminina.

Uma adesina bem caracterizada de *C. albicans* é a proteína da parede da hifa 1 (Hiphal wall protein - Hwp 1), que é uma proteína da superfície

celular expressa apenas nas hifas e que, através de sua ligação com GPI está covalentemente ligada a glucana da parede celular do fungo. A Hwp 1 é requerida para a aderência às células epiteliais orais (NAGLIK et al., 2006). STAAB et al. (1999) demonstraram que a inativação do gene *HWPI* gera células fúngicas incapazes de formar complexos estáveis com as células epiteliais bucais do hospedeiro. Além disso, esses mutantes apresentam capacidade reduzida em causar candidíase sistêmica em camundongos. O domínio N-terminal de Hwp 1 serve como um substrato para as transglutaminases de mamíferos, o qual faz uma ligação cruzada covalentemente da Hwp 1 com as proteínas da superfície das células do hospedeiro (NAGLIK et al., 2006).

1.2.3 Dimorfismo

O dimorfismo é um dos mais importantes fatores de virulência da *C. albicans*. De todas as *Candida spp.*, apenas *C. albicans* e *C. dubliniensis* formam ambos os tipos de crescimento filamentoso, hifas ou pseudohifas, e são definidas como polimórficas em seu padrão de crescimento. O dimorfismo se caracteriza pela capacidade de crescimento do fungo sob duas formas: 1) Levedura unicelular esférica e 2) Forma filamentosa multicelular também chamada micelial - hifas ou pseudohifas (CALDERONE; FONZI, 2001). Esta variação na sua morfologia é induzida por condições ambientais favoráveis no hospedeiro como alta temperatura, pH neutro, CO₂, nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio e aminoácido), N-acetilglicosamina, estágios de carência nutricional e soro. O tubo germinativo é a forma de transição entre leveduras e a forma filamentosa e ocorre no fluido biológico da infecção sendo um fator chave para a interação do fungo com o hospedeiro. A formação de pseudohifas ocorre pela divisão celular polarizada, onde a levedura cresce por brotamento e se alonga sem se destacar das células adjacentes (SAVILLE et al., 2003).

A capacidade de *C. albicans* diferenciar-se rápida e reversivelmente entre levedura e forma filamentosa interfere na patogenicidade. O crescimento filamentoso traz vantagens para a *Candida* durante a interação com o sistema imune de mamíferos. A grande virulência atribuída à transição levedura - tubo germinativo

pode ser devido em parte a deficiência da síntese de IL-12 pelo hospedeiro. A IL-12 é considerada uma citocina importante na defesa contra *Candida* em níveis mucosos e sistêmicos. Experimentos evidenciaram que leveduras induzem a produção de IL-12 e IL-10 e células do tubo germinativo induzem predominantemente IL-10, citocina associada à candidíase em camundongos. A formação do tubo germinativo e filamentação *in vivo* pode então prejudicar o desenvolvimento de uma resposta protetora contra os fungos (SAVILLE et al., 2003).

De acordo com Ariizumi et al. (2000), o receptor transmembrana tipo II Dectin-1 que contém um domínio extracelular de lectina tipo C é capaz de reconhecer somente a forma de levedura de *C. albicans*. Este receptor de reconhecimento da imunidade inata é expresso em fagócitos incluindo macrófagos e células dendríticas e contribui para a resposta imunológica a β -glucana, um componente estrutural da parede celular dos fungos. A forma filamentosa da *Candida* não expõe β -glucana na sua superfície e por isso não é reconhecida por este receptor (BROWN; GORDON, 2003).

Segundo Sato et al., (2004) a transição de *C. albicans* de leveduras para hifas é controlada por vários fatores de transcrição, incluindo os reguladores CPH1 e EFG1 que formam as duas vias de morfogênese conforme Figura A.

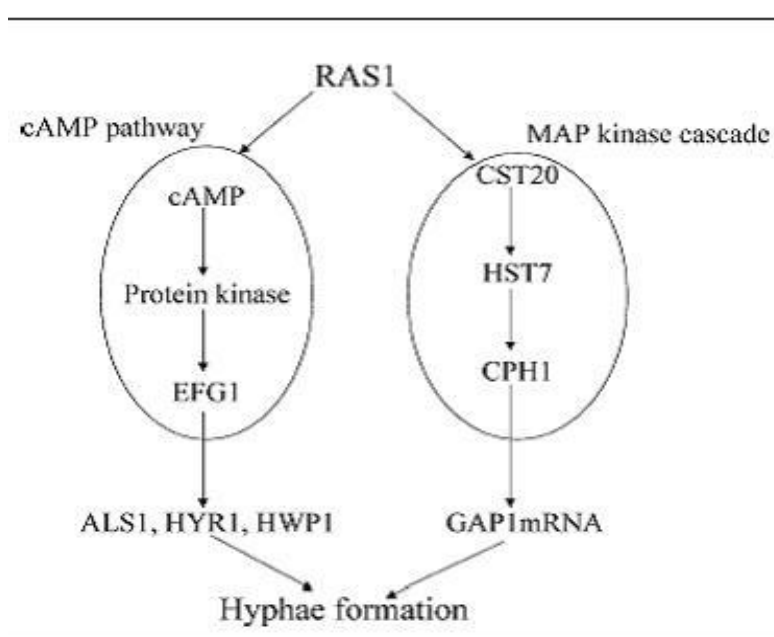


Figura 1 – A cascata de sinais de transdução para formação de hifas em *C. albicans* Fonte: Sato et al. (2004)

A primeira destas vias inclui homólogos de *C. albicans* que corresponde ao STE 12, via de formação de pseudohifas de *S. cerevisiae*. O homólogo de *C. albicans* de Ste12p é o CPH1, que é regulado pela proteína kinase mitógeno ativada e inclui Cst20, Hst7, Cek. A segunda via de morfogênese é identificada pelo fator de transcrição EFG1, regulado pela proteína kinase c-AMP (PKA) onde duas subunidades de PKA, Tpk1 e Tpk2, têm efeitos diferenciais na morfogênese hifal sob diferentes condições. Esta via é independente, mas paralela a via CPH1 e inclui homólogos de RAS, adenilciclase e proteína kinase-A. O regulador de transcrição hifal TEC1 é regulado por EFG1 e CPH2. RAS pode ativar ambas as vias CPH1 e EFG1 (LENGELER et al., 2000).

A função destes fatores na morfogênese e sua relevância para infecções de *Candida* são estudadas em mutantes onde faltam o EFG1 funcional ou CPH1 ou ambos os fatores. Os resultados obtidos com estes mutantes sugerem que a falta de CPH1 diminuiu a capacidade de formação de hifas em meio sólido, enquanto que mutantes deficientes em EFG1 falharam em produzir hifas (DIETERICH et al., 2002). Parece que outras vias são requeridas para morfogênese incluindo a integridade da parede celular, proteína kinase-C (PKC) e a via de osmoregulação-glicerol de alta osmolaridade-Hog1. A função da via Hog1p em *C. albicans* não é totalmente relatado para osmoregulação. Em vez disso, mutantes deletados para *sln1* ou *ssk1* são defeituosos na filamentação (NAVARRO-GARCIA et al., 1998).

De acordo com Watanabe et al., (2006), a valinomicina e o miconazol inibem o crescimento hifal e induzem o crescimento de *C. albicans* para a forma de levedura, atuando na transição morfológica do fungo dimórfico. Estes compostos alteram a concentração de potássio intracelular e promovem a inibição do crescimento hifal. Porém, quando é adicionado soro ocorre um aumento do potássio intracelular bloqueando a ação da valinomicina no crescimento hifal. O miconazol é conhecido por inibir a biossíntese do ergosterol, componente da membrana celular do fungo, alterando a permeabilidade da membrana e promovendo um escape de íons positivos da célula.

1.2.4 Aspartil Proteinases

Embora a formação de hifas seja provavelmente o determinante de virulência mais documentado de *C. albicans*, a natureza e o papel das enzimas hidrolíticas, especialmente as Aspartil Proteinases Secretoras (SAPs), tem sido os principais objetivos de estudos fisiológicos e bioquímicos desta espécie. As SAPs são importantes determinantes de virulência de *C. albicans*, devido sua capacidade de causar danos na integridade da estrutura de proteínas e afetar a arquitetura padrão dos tecidos (TAYLOR et al., 2005a; STAIB et al., 2008).

A produção e secreção de proteinases por espécies de *C. albicans* foi descrita pela primeira vez em 1965 (STAIB, 1965) e desde então vem sendo intensamente estudada por ser considerada um fator importante na patogenicidade de espécies de *Candida* (SCHALLER et al., 2005; STAIB et al., 2008).

As proteinases são capazes de digerir proteínas do hospedeiro, invadir os tecidos através da degradação de imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento, e proteínas da matriz extracelular. As aspartil proteinases (SAP) constituem uma família composta de várias isoenzimas, onde algumas (SAP1-10) são produzidas pelas espécies de *Candida* (TAYLOR et al., 2005a). Estas enzimas são codificadas por uma família de 10 genes homólogos no qual são diferentemente regulados durante a infecção. Oito dessas proteinases (SAP1-8) são secretadas para o espaço extracelular, enquanto as SAP9 e SAP10 estão ligadas a membrana via âncora de GPI (ALBRECHT et al., 2006).

Estas enzimas têm sido purificadas e caracterizadas, o que tem fornecido uma maior descrição das características das isoenzimas SAPs (NAGLIK et al., 2003). As propriedades bioquímicas demonstram que o peso molecular pode variar entre 35 a 45kDa, possuem atividade proteolítica em pH baixo, em torno de 2,0 a 5,0, com uma especificidade bastante ampla, incluindo queratina, colágeno, albumina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulinas e proteínas de matriz extracelular (OKSUZ et al., 2007). Esta versatilidade nas propriedades pode providenciar sucesso vital de *C. albicans* como um patógeno oportunista, por permitir a sobrevivência deste fungo e causar infecções em uma variedade de diferentes tecidos assim como em numerosas superfícies mucosas, pele e órgãos internos (TOSUN et al., 2005).

Naglik et al. (2004) em uma revisão da literatura que buscou explorar os papéis funcionais das proteinases de *C. albicans* e como elas contribuem com a interação hospedeiro/patógeno *in vivo*, observaram que a subfamília SAP1-3 apresenta um grande espectro de atividade e são conhecidas por degradar muitas proteínas humanas de mucosas, incluindo matriz extracelular. A eficiente remoção das barreiras do hospedeiro *in vivo* não seria apenas para providenciar nutrientes para a célula, mas também revelam um potencial sistema de ataque de *C. albicans*, de colonização e penetração dos tecidos do hospedeiro e possivelmente promovem disseminação de *C. albicans* pelo sistema circulatório.

A subfamília de SAP4-6 foi detectada durante a formação de hifas em pH próximo do neutro *in vitro*, sendo a SAP-5 a primeira a ser secretada durante a formação de hifa, e tiveram suas funções associadas ao desenvolvimento de candidíase disseminada. Esta subfamília de SAPs pode também degradar os mesmos substratos que SAP1-3. Porém, é provável que o alvo das subfamílias SAP1-3 e SAP4-6 sejam proteínas celulares e tecidos diferentes durante o processo infeccioso, que pode ser o resultado de diferenças na especificidade do substrato. A SAP9 e SAP10 estão ligadas a processos regulatórios na superfície celular do fungo, essenciais durante a interação com tecidos epiteliais (CHEN et al., 2002; ALBRECHT et al., 2006).

A produção e secreção de proteinases não é característica exclusiva de *C. albicans*. Todas as espécies de *Candida* até o presente momento estudadas, crescidas na presença de proteína com fonte de nitrogênio, são produtoras de proteinases para o meio extracelular, o que faz com que este não seja um fator de virulência exclusivo de *C. albicans* (ALMEIDA et al., 2004; OKSUZ et al., 2007).

As aspartil proteinases, além de serem um importante fator de virulência de *Candida albicans* durante a infecção de mucosas e candidíase disseminada, podem ainda contribuir para a indução de resposta inflamatória no hospedeiro.

A patogenicidade de *C. albicans* é um processo multifatorial que é regulado por uma rede de fatores de virulência. A produção de uma família de aspartil proteinase providencia para este fungo um eficiente e flexível sistema proteolítico que pode promover o sucesso vital deste patógeno como patógeno oportunista e pode parcialmente explicar porque *C. albicans* é um fungo patogênico comum nos humanos. A produção de SAP parece ser um processo altamente

regulado, o que provavelmente reflete em processos de transcrição de coregulação com outros atributos de virulência que possuem múltiplas funções *in vivo*, como demonstrado na Figura B (NAGLIK et al., 2004).

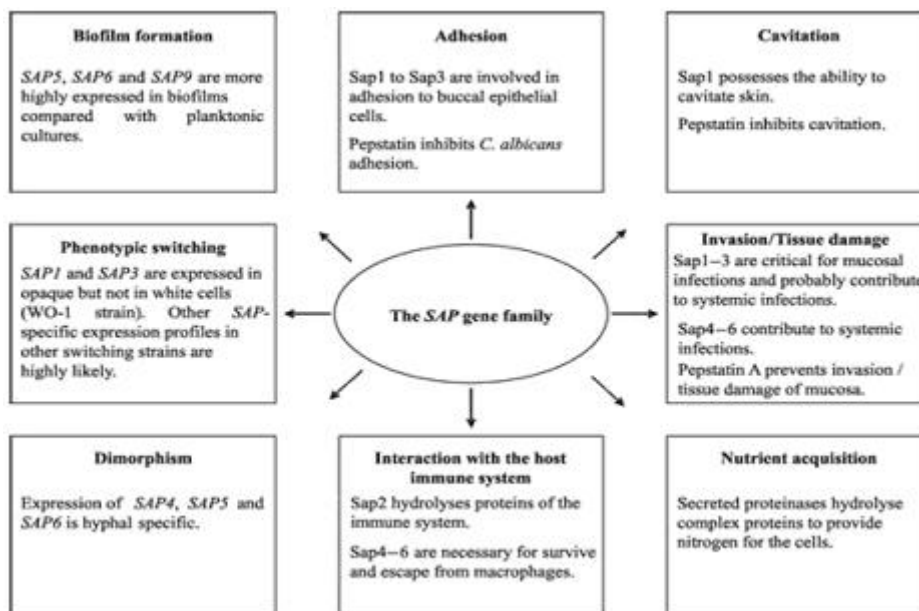


Figura 2 – Modelo hipotético para a correlação da expressão de genes SAP com a patogenicidade em *C. albicans*.

Fonte: Naglik et al., (2004)

Devido às aspartil proteinases serem um importante fator de virulência para este fungo, inibidores dos genes que codificam estas proteinases, poderiam ser utilizadas como novos agentes antifúngicos para o tratamento de infecções por *C. albicans*. Staib et al. (2008) realizaram um estudo com um inibidor de protease a pepstatina, e inibidores de proteases do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e verificaram que enquanto a pepstatina bloqueou a atividade de todas as SAPs testadas (*SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5*, *SAP6*, *SAP8* e *SAP9*), os inibidores de proteases do HIV, ritonavir e saquinavir inibiram a expressão de *SAP1* e *SAP3*, mas não a expressão de outras SAPs. Portanto o conjunto pode ser usado para testar a atividade de novos inibidores de proteases contra isoenzimas SAPs individuais pela sua capacidade de bloquear o crescimento do patógeno, pois compostos que atuem especificadamente sobre determinadas SAPs de *C. albicans* seriam candidatas promissoras no tratamento de infecções por este fungo patogênico, no futuro (STAIB et al., 2008).

1.2.5 Fosfolipases

A secreção de fosfolipase por *C. albicans* é considerada um atributo chave para a invasão da mucosa epitelial, por catalisarem a hidrólise de fosfolipídios. A literatura apresenta número contraditório de genes que ativam a produção de fosfolipases, mas muitos já são descritos como PLB1, PLB2, PLC1 e PLD1 (SAMARANAYAKE et al., 2006). Mukherjee et al (2003) realizaram um estudo para analisar os fatores que afetam a expressão do gene PLB1 da *C. albicans* e demonstraram que ele estava presente no crescimento deste fungo e que glicose e fosfolipídios eram essenciais para a indução da expressão. A PLB1 é de fundamental importância na manifestação da candidíase sistêmica, na qual, designa o crescimento da *C. albicans* em pH neutro (CALDERONE; FONZI, 2001).

A fosfolipase B1, B2, C e D de *C. albicans* tem um papel significativo no processo de invasão do hospedeiro, mas como cada uma delas age ainda não está bem esclarecido. Samaranayake et al (2006) mostraram que estas fosfolipases têm papel fundamental no crescimento da *C. albicans* e assim modulam a doença *in vivo*. Estudos mostram a participação das fosfolipases nos fatores de virulência da *C. albicans* nas mais diversas localizações, como na cavidade oral, nas fezes, no sistema urogenital e pele (OKSUZ et al., 2007).

Samaranayake et al. (2005) correlacionaram à expressão de genes da enzima fosfolipase B com quatro fatores de virulência como a formação do tubo germinativo, hidrofobicidade da superfície celular, adesão a células epiteliais e produção de hemolisina em pacientes com HIV. Entretanto, Oksuz, et al (2007), relataram a presença de alta concentração de fosfolipases em amostras de *C. albicans* mesmo em indivíduos saudáveis.

Silva et al. (2007) realizaram um estudo com o objetivo de verificar a produção de proteinase, fosfolipase e *slime* de 37 cepas de *Candida* sp isoladas de diferentes sítios corpóreos e ainda verificar o perfil de sensibilidade às drogas fluconazol e itraconazol. Do total de 37 cepas de *Candida* sp 100% foram produtoras de proteinases, e destas, 83,8% eram fosfolipases positivas, sendo todas sensíveis ao fluconazol e ao itraconazol.

Em uma outra pesquisa, Kadir et al. (2007) verificaram que a Clorexidina (um antisséptico bucal) foi capaz de suprimir a patogenicidade da *C.*

albicans através da modulação da atividade da fosfolipase mesmo em doses subterapêuticas.

1.3 MORTE CELULAR: APOPTOSE E NECROSE

A morte celular pode ocorrer por duas vias distintas: necrótica ou apoptótica. Estas vias podem ser discriminadas através de estudos morfológicos e bioquímicos. A necrose resulta de uma disfunção celular aguda em resposta a condições estressantes ou após agentes tóxicos e processos passivos com rápida depleção de ATP celular. A liberação dos conteúdos celulares, seguido da morte celular, para o espaço extracelular pode causar além de danos teciduais, injúrias em células vizinhas ou então ataque de células pró-inflamatórias em lesões (CHAUFFAILLE, 2005).

A necrose é caracterizada pelo entumescimento celular, alterações das organelas, ruptura da membrana plasmática, lise celular e liberação de componentes celulares. Há um balanço entre apoptose e necrose, determinado pela resposta biológica dos fagócitos, onde a necrose leva a inflamação e imunidade enquanto que a apoptose não (HASLETT et al., 1992; GREEN et al., 2000).

Já apoptose ou também chamada de morte celular programada diferencia-se da morte celular reconhecida como necrose. Enquanto a apoptose é altamente ordenada a ponto de ser chamada de morte programada, a necrose é abrupta, ocorrendo após insulto extremo. O fenômeno apoptótico é necessário, fundamental e altamente organizado para o desenvolvimento e a manutenção da integridade do organismo, além de ser tão complexo quanto à divisão e à diferenciação celular. O desencadeamento da apoptose é orquestrado tanto no desenvolvimento embrionário e na renovação tecidual como na resposta patológica à lesão celular (ruptura do DNA) ou à infecção por patógenos, ou seja, situações que representam ameaças à integridade do organismo. (CHAUFFAILLE, 2005).

Uma rede complexa de moléculas regula a apoptose e os principais componentes são as caspases (enzimas proteolíticas) que podem ser ativadas pela via mitocondrial ou intrínseca, ou seja, por sinais que levam à liberação de citocromo

C desencadeando uma série de reações até à formação do apoptossoma (ALNEMRI et al., 1996).

Apoptose ocorre em dois estágios; o primeiro estágio é de sinalização e o segundo é o da execução final. A apoptose apresenta um processo caracterizado pela redução celular, condensação de cromatina, fragmentação do DNA internucleossomal e a formação de corpos apoptóticos. Mudanças bioquímicas também são observadas devido à perda da assimetria da membrana e externalização da fosfatidilserina para superfície celular, além da exposição da trambospondina que é uma glicoproteína trimérica que faz a ligação entre células apoptóticas e fagócitos (EARNSHAW et al., 1999).

Estudos realizados por Panagio et al. (2002) e Gasparoto et al. (2004) mostraram que isolados de *C. albicans* de pacientes HIV+ apresentam um novo mecanismo de patogenicidade envolvido na imunodepressão, a indução da apoptose em macrófagos peritoneais de murinos, fato este que as tornam mais virulentas.

Panagio et al. (2002) verificaram a exposição de fosfatidilserina na superfície de macrófagos, por meio de ligação a Anexina V-FITC, após coincubação de 5 a 15 minutos com isolado de *C. albicans* (CR1) de paciente HIV+. Estas células evoluíram para necrose entre 30 e 120 minutos. Os eventos de apoptose e necrose não ocorriam quando macrófagos eram coincubados com isolado de *C. albicans* (577) de indivíduo HIV-, sugerindo que o isolado de *C. albicans* CR1 produziu molécula(s) específica(s) para indução de apoptose.

Gasparoto et al. (2004), após infectarem os camundongos com *C. albicans* (CR1) verificaram que macrófagos do exudato peritoneal apresentaram ligação a anexina V-FITC e se tornaram permeáveis ao Iodeto de propídeo. Tais mudanças ocorreram entre 30 minutos e 2 horas após infecção *in vivo* e evoluíram para necrose. Após 24 horas de infecção com *C. albicans* viável, houve aumento de neutrófilos e dos níveis de IL-10 na cavidade peritoneal. Entretanto, *C. albicans* CR1, tratada com pepstatina (um inibidor de proteinases), antes do inóculo, não induziu apoptose de macrófagos, nem aumentou a produção de IL-10. Estes resultados indicam que o processo de apoptose pode induzir ou modular um padrão antiinflamatório da resposta imune, na fase inicial de infecção.

1.4 RESPOSTA IMUNE À *Candida Albicans*

Compreender os mecanismos através do qual o sistema imune do hospedeiro reconhece e elimina microrganismos patogênicos tornou-se cada vez mais importante devido o ressurgimento de novas doenças infecciosas, o aumento de tratamentos médicos que causam imunossupressão (quimioterapia e cirurgia de transplante), bem como o aumento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). As infecções por *C. albicans* são uma séria ameaça aos pacientes imunodeprimidos e àqueles que tenham sido submetidos a procedimentos cirúrgicos, com mortalidade atingindo 30 a 40%, apesar da disponibilidade de novas classes de drogas antifúngicas (HUFFNAGLE; DEEPE, 2003).

A capacidade de um fungo patogênico como *C. albicans* causar infecção depende da capacidade deste patógeno superar a resposta imune do hospedeiro que é regulada pela produção de citocinas pró e antiinflamatórias (ROMANI, 2004).

Os mecanismos de defesa contra infecções fúngicas são numerosos e abrangem desde mecanismos da imunidade inata, até mecanismos da imunidade adaptativa, os quais são especificamente ativados durante a infecção e doença (NEWMAN; HOLLY, 2001). Embora cada um possa contribuir de maneira diversa nos diferentes sítios de infecção, a imunidade inata, por meio de macrófagos e neutrófilos, domina a proteção contra candidemia, enquanto a imunidade celular ativada predominantemente por citocinas Th1, protege as mucosas da infecção (ROMANI, 2002).

As células da imunidade inata (macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) e células dendríticas), possuem um efeito direto antifúngico na destruição do patógeno e realizam um elo com a imunidade adaptativa, por meio da produção de citocinas e de quimiocinas proinflamatórias, indução de atividades coestimulatórias e apresentação de antígeno (ROMANI, 2004). Durante a indução da imunidade mediada por células (IMC), antígenos da *Candida* são apresentados para células T e estimulam sua proliferação com subsequente síntese de citocinas, e em ambos, humana e camundongos estas citocinas aumentam a função candidacida das células fagocíticas (NEWMAN; HOLLY, 2001).

O papel da imunidade celular no controle da infecção causada por *C. albicans* tem sido bem demonstrado em modelos experimentais nos quais a dicotomia da resposta imune do tipo CD4⁺ Th1 e CD4⁺ Th2 é considerada um fator importante para a suscetibilidade ou resistência à infecção por *Candida*. Enquanto uma resposta tipo Th1 com produção de IFN- γ e IL-2 está relacionada com resistência à *Candida*, a resposta tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, está relacionada com susceptibilidade a este patógeno (CARVALHO et al., 2003).

A estimulação de citocinas próinflamatórias e subsequente ativação das defesas antifúngicas do hospedeiro depende do reconhecimento específico do fungo invasor (CAMBI et al., 2008). O reconhecimento do patógeno na imunidade inata é mediado por uma série de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) presentes em microrganismos patogênicos, como lipopolissacarídeos (LPS) em bactérias ou mananas e β -glucanas em fungos (TAYLOR et al., 2005b). Os receptores de reconhecimento padrão incluem receptores tipo Toll (TLRs) e lectinas, que auxiliam nos processos de sinalização e fagocitose. Estes receptores de reconhecimento padrão (PRRs) são expressos por numerosas células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, células dendríticas, monócitos, macrófagos, células B, células T, células endoteliais e epiteliais (KERRIGAN; BROWN, 2009).

O Toll é originalmente definido como um gene da *Drosophila*, que está associado à resistência microbiana (HOFFMANN; REICHHART, 2002).

O reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs induz vias de sinalização intracelular que modulam uma resposta protetora e inflamatória, como a ativação de mecanismos antimicrobianos, expressão de moléculas coestimulatórias, liberação de citocinas próinflamatórias e modulação da imunidade adaptativa (NETEA et al., 2004; PIETRELLA et al., 2006).

A resposta imune na infecção por *Candida* é iniciada com o reconhecimento de PAMPs específicos, os quais levam a uma resposta próinflamatória. Desta forma, as moléculas da superfície de *Candida* funcionam como fatores de virulência que ativam o sistema imune. *C. albicans* possui uma variedade de PAMPs, incluindo quitina, glucana, manana, manoproteínas e glicolipídeos. O reconhecimento diferencial destes componentes na parede de *C. albicans* é mediado através de numerosos PRRs, como TLRs, receptor de manose,

Dectina-1, receptor de complemento 3 (CR3) e lectinas ligada a manose (NETEA et al., 2008; VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLU, 2009).

Os receptores tipo Toll 2 e 4 (TLR2 e TLR4) tem sido demonstrados como importantes receptores de reconhecimento para *Candida* (NETEA et al., 2004b; ROEDER et al., 2004).

Villamon et al. (2004), demonstraram que o TLR2 é essencial na defesa de murinos contra infecção por *Candida*, devido camundongos nocautes TLR2^{-/-} terem sobrevivido menos à infecção por *C. albicans* do que os camundongos normais e apresentado baixa produção de TNF- α e de quimiocina MIP-2. Por outro lado, Netea et al. (2004) demonstraram que TLR2 suprimiu a imunidade contra *C. albicans* através da indução de IL-10 e células T regulatórias. Sobre as condições deste último experimento, os macrófagos TLR2^{-/-} tiveram uma maior capacidade de migrar para o local da infecção e maior atividade candidacida. Isto implica que *C. albicans* pode evadir-se das defesas do hospedeiro através dos sinais mediados pelo TLR2.

Outro receptor PAMP, o TLR4, pode também estar envolvido nas defesas antifúngicas, embora não haja nenhum consenso geral quanto seu papel específico na resposta para infecções fúngicas. Camundongos deficientes para TLR4 demonstraram aumentada susceptibilidade para candidíase disseminada (BELLOCCHIO et al., 2004). Um estudo realizado por Blasi et al. (2005) com linhagens de macrófagos deficientes em TLR2, TLR4 e MyD88 mostrou que os macrófagos com TLR2 deletado exibiam aumentada capacidade para conter a infecção por *C. albicans*, comparados aos controles. Em contraste, ambos os macrófagos deficientes em TLR4 e MyD88 mantiveram os níveis de atividades funcionais normais comparados com os seus respectivos controles. Na produção de citocinas os macrófagos deficientes em TLR2 mostraram um padrão de produção de citocinas similar ao controle. Estes resultados mostraram que o TLR2 e TLR4 apresentam diferente relevância biológica, em que TLR2, mas não o TLR4, está envolvido na realização da atividade candidacida mediada por macrófagos, enquanto a produção de citocinas em resposta a *C. albicans* parece ser TLR4 dependente, mas não TLR2.

A razão para esta divergência nos resultados de camundongos nocautes para TLR2 e TLR4 em diferentes estudos não é compreendido. No entanto, resultados discrepantes podem ser pelo menos parcialmente explicados

pelo uso de animais com diferentes genomas, desafiados com diferentes cepas de fungos e análise da carga fúngica em diferentes órgãos. Este último pode ser um fator importante, porque o crescimento e morfogênese do fungo podem ser regulados de forma diferenciada em diferentes tecidos. Além disso, uma resposta protetora tecido-específico tem sido comprovada na existência de infecções por *Candida*. Deste modo, dependendo do mecanismo imune regulador e efetor em cada tecido ou órgão, a sinalização mediada pelo TLR pode ou não desempenhar um papel importante na proteção (VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLU, 2009).

É conhecido também que os TLR1 e TLR6 são capazes de formar heterodímeros com TLR2, e que esta heterodimerização fornece um reconhecimento específico de estruturas microbianas e uma ajustada resposta para as diferentes classes de microrganismos. O heterodímero TLR2/TLR1 reconhece lipopeptídeos triacil de bactérias (TAKEUCHI et al., 2002), enquanto o heterodímero TLR2/TLR6 reconhece lipopeptídeos diacil de bactérias e ácido lipoteicóico (TRANTAFILOU et al., 2006). Embora o papel do TLR2 no reconhecimento de *C. albicans* é bem estabelecido, pouco se sabe sobre o potencial envolvimento do TLR1 e/ou TLR6 no reconhecimento de *Candida* e na defesa do hospedeiro contra *Candida*.

Em adição, Netea et al. (2007) realizaram um trabalho para investigar o papel do TLR1 e TLR6 no reconhecimento de *C. albicans* e a defesa do hospedeiro. Os resultados demonstraram que o TLR1 não está envolvido no reconhecimento de *C. albicans*, e os camundongos nocautes (TLR1^{-/-}) mostraram uma susceptibilidade normal para candidíase disseminada. No entanto, o reconhecimento de *C. albicans* por TLR6 modulou o balanço entre citocinas Th1 e Th2, onde os camundongos TLR6^{-/-} tiveram uma resposta próinflamatória com aumento na produção de interferon- γ (INF- γ) e pouca produção de IL-10 comparados com o controle TLR6^{+/+}. No entanto este fenótipo não foi associado com uma significativa diferença na susceptibilidade para candidíase disseminada.

Outro tipo de lectina (CD-SIGN) é capaz de internalizar *C. albicans* por reconhecer estruturas complexas de manosídeos expostas nas células leveduriformes (CAMBI et al., 2003; TAYLOR et al., 2004). Nagaoka et al. (2005) demonstraram o papel regulatório da lectina tipo-C SIGNR1 na sinalização dependente de TLR4 em ratos. Na resposta imune celular, tal lectina se apresenta associada a receptores TLR2 (WELLS et al., 2008). Galectina-3, uma lectina originalmente descrita por sua ligação específica com a galactose, liga-se a

monosídeos β -1,2 específicos de *Candida* (FRADIN et al., 2000) e também se associam a receptores TLR2 quando há interação de macrófagos com leveduras (JOUAULT et al., 2006).

A capacidade de *C. albicans* rapidamente modificar sua morfologia de levedura para filamento é crucial para a patogenicidade. A ligação de distintos receptores para levedura e para hifa define a natureza da resposta efetora, pela produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores coestimulantes. Van der Graaf et al. (2005) demonstraram que blastoconídios e hifas de *C. albicans* diferem no estímulo da resposta no hospedeiro, onde os blastoconídios estimulam ambos receptores TLR-2 e 4, sendo que o último é responsável pela grande produção de IFN- γ por monócitos e de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por macrófagos peritoneais. Hifas, por sua vez, não foram reconhecidas por TLR-4 e induziram grande produção de IL-10, por meio do TLR-2, e não produção de IFN- γ .

Brown e Gordon (2001) identificaram em macrófagos o receptor dectina-1 para β -glucana. É um receptor transmembrana tipo II que contém um domínio simples extracelular de lectina tipo-C, expresso amplamente na superfície de fagócitos, incluindo macrófagos e células dendríticas e contribui na resposta imunológica para β -glucanas. Gantner et al. (2003) demonstraram que em macrófagos e células dendríticas, os receptores Dectina-1 e TLR2 colaboraram na coordenação da resposta inflamatória com a secreção de citocinas e a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) em resposta há partículas que contém β -glucana.

Em adição, foi demonstrado que após fagocitose de blastoconídeos de *C. albicans* incubados com macrófagos houve secreção de TNF- α , IFN- γ , aumento na produção de superóxido e da capacidade fungicida, devido o envolvimento dos receptores dectina-1, TLR2 e 4. No entanto, na fagocitose de hifas, houve uma resposta antiinflamatória, com a produção de IL-10, reduzida produção de superóxido e diminuída capacidade fagocítica. Isso ocorre porque durante o crescimento filamentosos não há separação de células, com isso a exposição da β -glucana não ocorre e o patógeno falha na ativação do dectina-1 (GANTNER et al., 2005).

Os fagócitos expressam também receptores para complemento (CR) e anticorpos (FcR), e vários pesquisadores têm demonstrado que a fagocitose de *C. albicans* por fagócitos mononucleares é aumentada quando as leveduras estão opsonizadas com soro normal (GAZIRI et al., 1999; SANTOS et al., 2002). Porém, quando o soro foi pretratado com sobrenadante de *C. albicans*, houve significativa redução da fagocitose sugerindo que C3 do complemento possa ter sido degradada por aspartil proteinases.

Receptores de manose têm sido implicados no reconhecimento de superfícies rica em manana, sendo especialmente importantes na fagocitose de *C. albicans*, resultando em produção de citocinas próinflamatórias, degradação do fungo, estímulo de moléculas coestimulatórias e moléculas de MHC classe II e ativação de resposta celular protetora Th1 (KERRIGAN; BROWN, 2009). Macrófagos são capazes de ingerir e matar *C. albicans* através dos receptores de manose, na qual estão envolvidos na produção de TNF- α , IL-1 α , IL-6 e fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos (GM-CSF) (NETEA et al., 2006).

O papel dos receptores de manose durante a infecção tem sido demonstrado em modelos de candidíase em murinos, onde a administração intraperitoneal de *C. albicans* resultou em um aumento da carga fúngica em camundongos nocaute em receptor de manose (VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2009). A expressão aumentada de receptores de manose devido ao fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF) (KARBASSI et al., 1987), do IFN- γ (MARÓDI; JOHNSTON JÚNIOR, 1993) e de Concanavalina-A (LOYOLA et al., 2002; MORESCO et al 2002) tem melhorado a capacidade fagocítica de macrófagos.

A ativação de macrófagos é importante para a atividade candidicida. O IFN- γ é considerado um excelente estimulador da capacidade de macrófagos para combater *C. albicans*, pois ativa células fagocíticas mononucleadas de diferentes hospedeiros e sítios anatômicos, estimulando os mecanismos dependentes de oxigênio e independente de oxigênio. A síntese de IFN- γ serve como um sinal de ativação para aumentar a capacidade fungicida de células efetoras como os macrófagos (HUFFNAGLE; DEEPE, 2003; ROMANI, 2002).

Como já mencionado, os fagócitos têm atividade intrínseca, que pode ser aumentada com a presença de opsoninas e citocinas derivadas de células T. Concanavalina-A (Con-A) é uma lectina mitogênica, isolada de *Canavalia ensiformis*, e apresenta ampla ação biológica através da interação com sítios de

interação com açúcares, mimetizando a ativação por antígenos e induzindo a ativação policlonal de linfócitos (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1968). Con-A liga-se diretamente às moléculas de carboidratos (D-glucopiranosídeo e D-manopiranosídeo) do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e ao receptor de linfócito T (TCR), induzindo resposta celular pela oligomerização de TCRs na superfície celular, resultando na indução da resposta celular (ANDERSON; MELCHERS, 1976). A ativação de células Th1 induz a produção de citocinas como IL-2, IFN- γ e TNF- β (BERTRAN et al., 1997; BARBUTO, 2001).

Felipe et al. (1995) demonstraram que o tratamento prévio de camundongos com Con-A ou extrato de semente de jaca aumentou a capacidade destes animais eliminarem o inóculo de *C. albicans* da cavidade peritoneal, baço, fígado e rim, em relação aos animais controle.

Em adição, Gaziri et al. (1999) demonstraram que após quatro dias de administração de uma dose única de Con-A em camundongos, houve uma predominante ativação nos macrófagos do exsudato peritoneal, observado pelo aumento na quantidade de células, o dobro dos camundongos não tratados, e distinto aspecto morfológico das células, onde as mesmas se apresentaram mais espalhadas e bem maiores que os macrófagos residentes. Esta ativação nos macrófagos aumentou significativamente a fagocitose de *C. albicans* 577 e dobrou a quantidade de leveduras intracelular por macrófago, quando comparados com o controle. Os inibidores de receptores de manose (manana e manose), quando adicionados antes e durante os ensaios fagocíticos, reduziram significativamente a fagocitose, sugerindo uma maior expressão e atividade destes receptores através do tratamento com Con-A.

Os neutrófilos são também extremamente importantes nas defesas não-específicas contra infecções sistêmicas causadas por *C. albicans*, como mostrado pelo fato que pacientes neutropênicos são altamente suscetíveis a infecções fúngicas. Os neutrófilos são capazes de matar *Candida* na forma de pseudohifa e hifa através de mecanismos oxidativos e não-oxidativos. Loyola et al. (2002) testaram a hipótese que após administração de dose única i.p. de Con-A nos camundongos, a proporção de neutrófilos e macrófagos no exsudato peritoneal e suas atividades fagocítica e candidacida poderia mudar com o tempo. Os resultados demonstraram que seis horas após a administração de Con-A houve uma migração de neutrófilos ativados para cavidade peritoneal. E um grupo de camundongos

submetidos a este tratamento sobreviveu ao inóculo de 1×10^8 de *C. albicans* (577), enquanto 50% dos não tratados morreram. Observaram ainda que os macrófagos, além de assumirem um importante papel na defesa contra candidíase, tiveram um aumento de atividade de receptores de manose. Fenômeno este evidenciado pelo aumento de interiorização do ligante albumina-manose-FITC, comparado com os macrófagos de animais tratados com PBS. Esse aumento de atividade de receptores de manose foi também evidenciado pelo aumento de fagocitose de *C. albicans*, atingindo o máximo pelo tratamento com Con-A 72 a 96 horas antes da retirada dos macrófagos para os ensaios fagocíticos.

Diante destes resultados, Moresco et al. (2002) realizaram um trabalho para avaliar o efeito de Con-A causar ativação da fagocitose e morte de *C. albicans* por macrófagos peritoneais de camundongos em aleitamento e adultos. Os resultados demonstraram que em ambos os camundongos, após administração de Con-A, os macrófagos tiveram o mesmo efeito ativador. Ou seja, ambos podem utilizar os mesmos mecanismos para a criação de uma população de macrófagos com aumentada capacidade de fagocitar e matar *C. albicans*. Provavelmente por Con-A ligar-se a resíduos de carboidratos em linfócitos Th1, e estimular a liberação de INF- γ , que, por sua vez, ativou os macrófagos e resultou em melhor atividade fagocítica e candidacida via receptores de manose, que foi dependente da dose de Con-A administrada.

Macrófagos peritoneais de murinos coincubados com um isolado de *C. albicans* (CR1) obtida de indivíduos infectados com HIV mostraram sinais precoces de apoptose, como a exposição da fosfatidilserina da membrana após 5 a 15 min de coincubação, progredindo para necrose após 2h de incubação, sugerindo que este isolado explora a indução de apoptose como um fator de virulência (PANAGIO et al., 2002).

Em adição, Gasparoto et al. (2004) realizaram um estudo para explorar se este isolado de *C. albicans* CR1 causava apoptose ou necrose de macrófagos após sua inoculação dentro da cavidade peritoneal de camundongos, e se esta indução correlacionava-se com a secreção de IL-10. Os resultados obtidos demonstraram que os macrófagos peritoneais de camundongos que receberam inóculo de *C. albicans* CR1 apresentaram sinais de apoptose e necrose de 30min a 2h depois, enquanto que *C. albicans* morta pelo calor não causou este mesmo efeito. A produção de IL-10 mostrou-se baixa durante as primeiras 6h pós-infecção,

quando os macrófagos predominavam no exudato peritoneal. No entanto, altos níveis de IL-10 foram encontrados após 24h correlacionando com um aumento de neutrófilos no exudato. Além disso, o tratamento de CR1 com pepstatina (inibidor de proteinases) preveniu o processo de apoptose e significativamente reduziu a produção de IL-10, sugerindo que o aumento da produção de IL-10 foi causada por um processo que ocorre durante a fase inicial da infecção, como a apoptose, necrose e eliminação das células mortas.

Recentemente Conchon-Costa et al. (2007) demonstraram que Con-A exerceu um efeito protetor contra inóculo de *C. albicans* (CR15) e que a proteção exercida por Con-A era tempo dependente. Assim, todos os camundongos infectados após três dias de tratamento com Con-A sobreviveram, enquanto 80% dos camundongos do grupo controle morreram num período de 28 dias. Camundongos que receberam um inóculo correspondente a 10^7 de blastoconídeo mantiveram inalterada a atividade de alanina transaminase (ALT) em 24 e 72 horas; porém, com inóculo cinco vezes superior os camundongos controles morreram, enquanto os tratados com Con-A apresentaram ALT inalterado, sem injúria ao fígado.

Neste estudo foi observado ainda, que no sobrenadante das células do exudato peritoneal, fígado e baço, o nível de TNF- α aumentou significativamente quando tratados com Con-A, porém esse fato não foi verificado nos animais-controle. Em resumo, o efeito protetor de Con-A foi evidenciado pela alta taxa de sobrevivência, índice normal de ALT, ativação de macrófagos, produção fisiológica de TNF- α e aumento da eliminação do patógeno (CONCHON-COSTA et al., 2007).

Os estudos anteriores mostraram que os macrófagos são as principais células efetoras contra infecção por *C. albicans*, e que esta atividade pode ser aumentada na presença de imunomoduladores como a concanavalina-A. Sabendo disso, o presente trabalho irá avaliar a atividade destas células contra três isolados de *C. albicans*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a interação de três isolados de *Candida albicans* (CR1, CR15 e 577) com macrófagos residentes ou ativados com Concanavalina-A (Con-A).

2.2 ESPECÍFICOS

- ❖ Comparar o grau de necrose induzido por três isolados de *C. albicans* em macrófagos residentes ou ativados com Con-A;
- ❖ Avaliar a expressão e a atividade dos receptores de manose no processo de fagocitose;
- ❖ Avaliar a capacidade fagocítica e candidacida de macrófagos residentes e ativados com Con-A;
- ❖ Avaliar ingestão de *C. albicans* opsonizada com soro fresco de camundongo via receptores CR3 como possível mecanismo de escape do sistema imune;
- ❖ Avaliar a transição da forma leveduriforme para a forma filamentosa durante a interação dos três isolados de *C. albicans* com os macrófagos residentes ou ativados com Con-A;
- ❖ Avaliar a produção de TNF- α após fagocitose dos três isolados de *C. albicans* por macrófagos residentes ou ativados com Con-A.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços, pesando entre 28-32g e 6-12 semanas de idade. Os camundongos foram mantidos em sala com temperatura ambiente e receberam ração estéril e água a vontade. O trabalho recebeu aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina sob registro nº 49/08, processo 26886/2008.

3.2 ISOLADOS DE *Candida Albicans*

Isolados de *Candida albicans* CR1 e CR15 utilizados neste estudo foram obtidos da mucosa oral de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) na Faculdade de Odontologia e no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, e mantidos em ágar Sabouraud dextrose coberto com óleo mineral. Após crescimento em caldo Sabouraud dextrose, os isolados foram utilizados após duas passagens em camundongos. *C. albicans* 577 foi isolada da pele de paciente HIV-negativo apresentando candidíase mucocutânea, foi utilizado como controle negativo por não induzir apoptose de macrófagos, *C. albicans* CR1 induz apoptose de macrófago (PANAGIO et al. 2002) e CR15 foi testada neste trabalho.

3.3 CULTURA DE *Candida Albicans*

Os isolados de *C. albicans* (CR1, CR15 e 577) foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose em temperatura ambiente depois de retirados do animal. Para realização dos ensaios fagocíticos, as células fúngicas foram obtidas por

crescimento em caldo Sabouraud dextrose por 24 horas a 28°C. Após este período de crescimento as leveduras foram coletadas por centrifugação (2000g, 6 min), lavadas 3 vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) e ressuspensas a 2×10^6 células/ml em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado por aquecimento. As leveduras foram também opsonizadas por 5 min a 37°C em RPMI 1640 contendo soro fresco de camundongo não-imune (2,5%) e imediatamente co-incubados com os macrófagos.

Para inativação dos isolados, os mesmos foram mantidos por 1h 30 min em banho Maria a 60°C em PBS. Para confirmar a inativação, foi realizado plaqueamento de 25µl dos três isolados em ágar Sabouraud dextrose por 24h a 37°C, para posterior uso nos ensaios fagocíticos.

3.4 MACRÓFAGOS E ENSAIOS FAGOCÍTICOS

Camundongos machos suíços, pesando entre 28-32g e 6-12 semanas de idade foram tratados com dose única de 250µg de Concanavalina-A (Sigma) / 250µL de PBS, intraperitonealmente (i.p.) ou somente PBS. Após 3 dias os animais foram sacrificados em éter etílico, as células do exudato peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal com 3ml de meio RPMI 1640 contendo 5% de SFB inativado por aquecimento. Os fagócitos coletados foram mantidos em frasco estéril imerso em gelo, para quantificação das células em câmara de Neubauer.

As células foram ajustadas a 4×10^5 células/ml e adicionadas às lamínulas (22x22mm) contidas em placas de cultivo celular de 6 poços e incubadas por 1 h a 37°C para permitir a aderência de células fagocíticas na superfície de vidro. Após este período de incubação as células foram lavadas com meio RPMI 1640, para remoção das células não aderentes.

Monocamadas de macrófagos peritoneais ativados com Con-A ou PBS foram co-incubadas com *C. albicans* CR1, CR15 e 577, viáveis ou mortas, por 0,5, 1 e 2 h a 37°C, opsonizadas ou não-opsonizadas com soro fresco de camundongo não-imune (2,5%) em uma proporção de 1:5. A porcentagem de

macrófagos fagocitando foi determinada após coloração das células com Giemsa pela contagem de 10 campos em imersão.

3.5 EXPRESSÃO E ATIVIDADE DOS RECEPTORES DE MANOSE

A análise da expressão dos receptores de manose foi realizada pela ligação da fluoresceína isotiocinato (FITC)-ligado a manose-BSA (Sigma). Monocamadas de fagócitos de camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS três dias antes foram incubadas com 40µg de FITC-ligado a manose-BSA / 0.5ml de PBS por 15 min a 24°C. As preparações foram mantidas em PBS-glicerol e analisadas em microscopia de fluorescência (Zeiss).

A inibição dos receptores de manose foi investigada pela adição de manana (Sigma; 100µg) e manose (Sigma; 100mM) empregado em meio RPMI nos ensaios fagocíticos como descrito anteriormente no item 3.4.

3.6 DIMORFISMO

O dimorfismo foi avaliado após 2h de coincubação de macrófagos com *C. albicans* CR1, CR15 e 577. Leveduras e formas filamentosas foram contadas dentro e fora dos macrófagos em imersão (10 campos), usando microscópio Nikon Alphaphot YS.

3.7 ENSAIOS DE APOPTOSE

Macrófagos peritoneais obtidos como descrito acima foram coincubados com *C. albicans* opsonizadas (5 leveduras/macrófagos) em meio RPMI contendo SFB por 1 h a 37°C, lavadas três vezes com meio RPMI e imediatamente lavadas com tampão e submetido ao kit TACS anexina V-FITC (R&D systems,

Mmineapolis, MN, USA), para detecção da apoptose. As células foram coradas com iodeto de propídeo e 6-carboxifluoresceína diacetato (6-CFDA), por 15 min a 18 – 24°C para avaliar a presença de células necróticas e viáveis, respectivamente, como descrito por Gasparoto et al., 2004. Todos os testes usando corante fluorescente foram observados em microscópio de fluorescência (Zeiss) e fotografados.

3.8 ENSAIOS DE TNF- α

Os sobrenadantes dos ensaios fagocíticos foram coletados por centrifugação das amostras (2000g, 10min, 4°C) e armazenados a -20°C para posterior detecção de TNF- α através da técnica do ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) usando Kit da eBioscience (USA) contendo anticorpo purificado anti-TNF- α de camundongo (1F3F3D4). A concentração da citocina foi determinada com referência na curva padrão por seriadas diluições de TNF- α recombinante de camundongo, a absorbância ótica mensurada a 492 nm.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através dos testes ANOVA e teste t Student para avaliar a diferença entre as médias. $P < 0,05$

4 RESULTADOS

4.1 DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE ISOLADOS DE *Candida Albicans*

Os três isolados de *C. albicans* (CR1, CR15 e 577) após retirada da cultura estoque (ágar Sabouraud dextrose cobertas com óleo mineral) foram crescidos em Sabouraud dextrose a 28°C por 24h, centrifugados 2 vezes para remoção do óleo mineral e adicionado meio fresco. A Figura 1 mostra a aparência morfológica entre os três isolados após análise em microscópio óptico, onde se observa que blastoconídeos de *C. albicans* 577 são ovais, de *C. albicans* CR1 são esféricos e pequenos e de *C. albicans* CR15 parece um grão de uva e são duas vezes maiores que CR1.

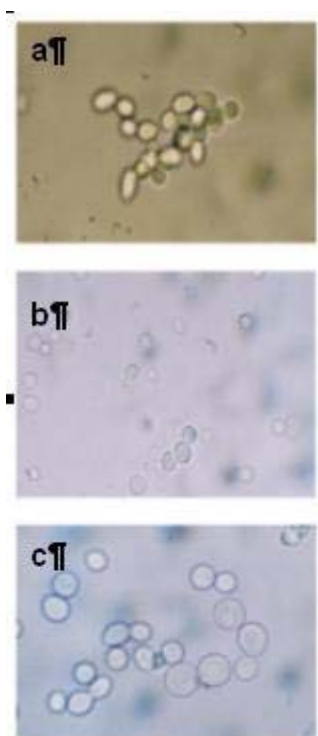


Figura 3 – Aparência morfológica dos isolados de *c. albicans* Os isolados 577 (a), CR1 (b) e CR15 (c) foram crescidos em caldo Sabouraud dextrose por 24 horas a 28°C e fotografados em microscópio óptico (40x).

4.2 APOPTOSE E NECROSE DE MACRÓFAGOS

A avaliação de apoptose e necrose de macrófagos foi realizada tendo como controle o isolado 577 por ter sido previamente observado não induzir apoptose de macrófagos (PANAGIO et al., 2002; GASPAROTO et al., 2004). Os macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS e coincubados com CR15 mostraram maior freqüência de exposição da fosfatidilserina, através da ligação da anexina V-FITC, comparado aos macrófagos ativados com Con-A (Fig 2a e 2b). A exposição da fosfatidilserina é uma característica que ocorre no início de apoptose. Quando monocamadas de macrófagos foram coincubadas com *C. albicans* CR15 mortas pelo calor ou previamente tratadas com pepstatina (um inibidor de proteinases) antes da incubação com macrófagos, não houve indução de apoptose (micrografia não mostrada).

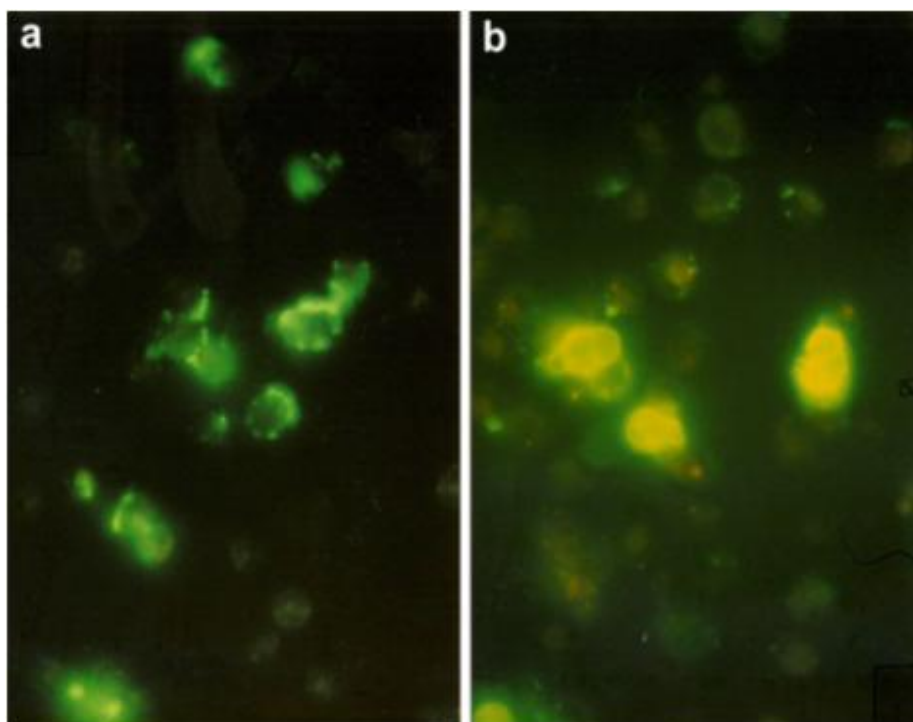


Figura 4 – Exposição da fosfatidilserina após incubação de macrófagos com *C. albicans* CR15

Macrófagos foram coincubados com *C. albicans* CR15 opsonizadas com soro fresco de camundongo não imune (2,5%) na proporção de 1:5 por 1h e marcadas com anexina V-FITC. (a) Macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS; (b) macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A. Resultados representativos de quatro experimentos independentes.

Fonte: Vito (2007).

As células necróticas foram visualizadas pela coloração com iodeto de propídeo (células coradas em vermelho) e as células viáveis pela coloração com 6-CFDA (células coradas em verde). Os macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS após fagocitose de *C. albicans* CR15 opsonizadas com iC3b foram mais frequentemente corados com iodeto de propídeo, enquanto, os macrófagos de camundongos ativados com Con-A mantiveram-se viáveis não permitindo a entrada do iodeto de propídeo (Fig 3). A Figura 3b mostra a maioria destes macrófagos corados com 6-CFDA e as leveduras do lado de fora coradas em vermelho com o iodeto de propídeo.

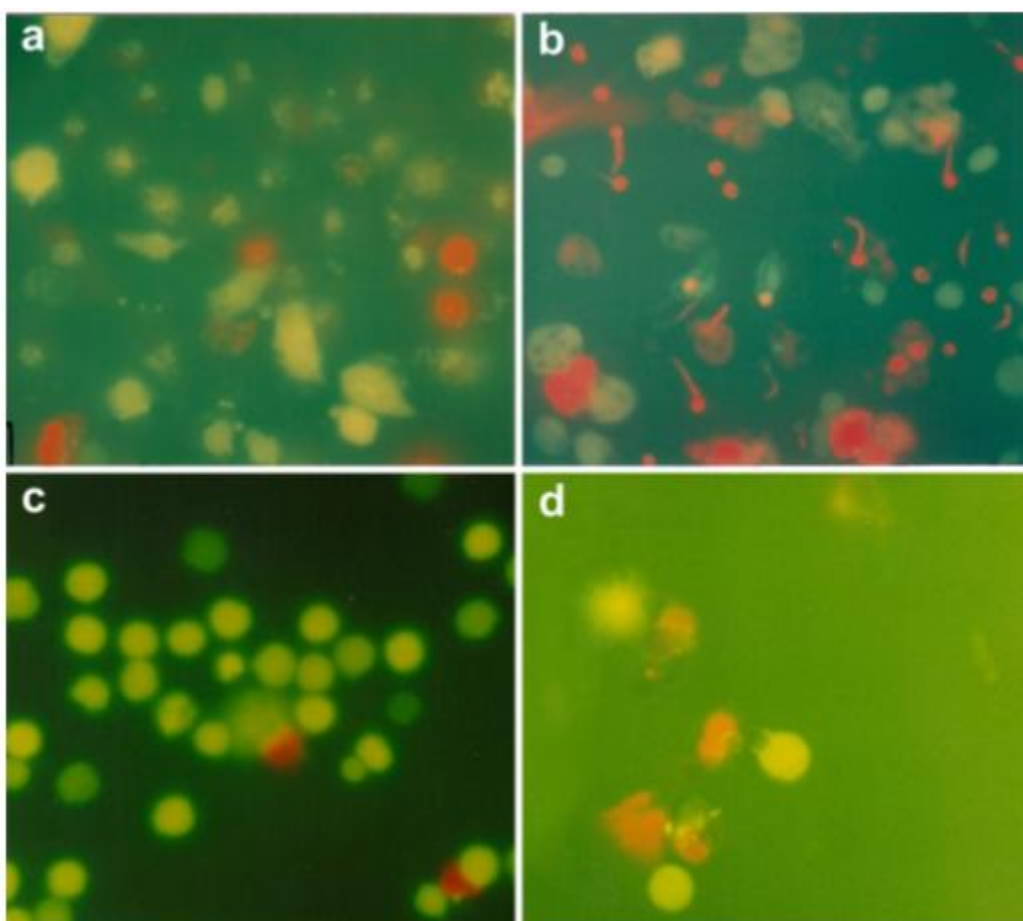


Figura 5 – Micrografia de fluorescência de macrófagos corados com iodeto de propídeo e 6-CFDA

(a) macrófagos controle de camundongos pré-tratados com Con-A; (b) macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A e incubados com *C. albicans* CR15 opsonizada; (c) macrófagos controle de camundongos pré-tratados com PBS; (d) macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS e incubados com *C. albicans* CR15 opsonizada. Resultados representativos de quatro experimentos independentes.

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CON-A NA FAGOCITOSE DE *Candida*

Para avaliar o efeito de Con-A na fagocitose de *C. albicans* CR1, CR15 e 577, macrófagos peritoneais previamente ativados com Con-A foram incubados com blastoconídeos dos três isolados mortos pelo calor por 0,5 e 2h. A porcentagem de macrófagos fagocitando *C. albicans* CR1, CR15 e 577 mortas na ausência do soro foi significativamente maior nos macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A 3 dias antes, comparado aos controles (Fig 4a e 4b). A opsonização com soro fresco de camundongo não imune aumentou a internalização de *C. albicans* CR1, CR15 e 577, para ambas as populações de macrófagos, pré-tratados com PBS ou pré-tratados com Con-A, no entanto, a internalização foi significativamente maior nos pré-tratados com Con-A quando comparado aos PBS (Fig 4a e 4b).

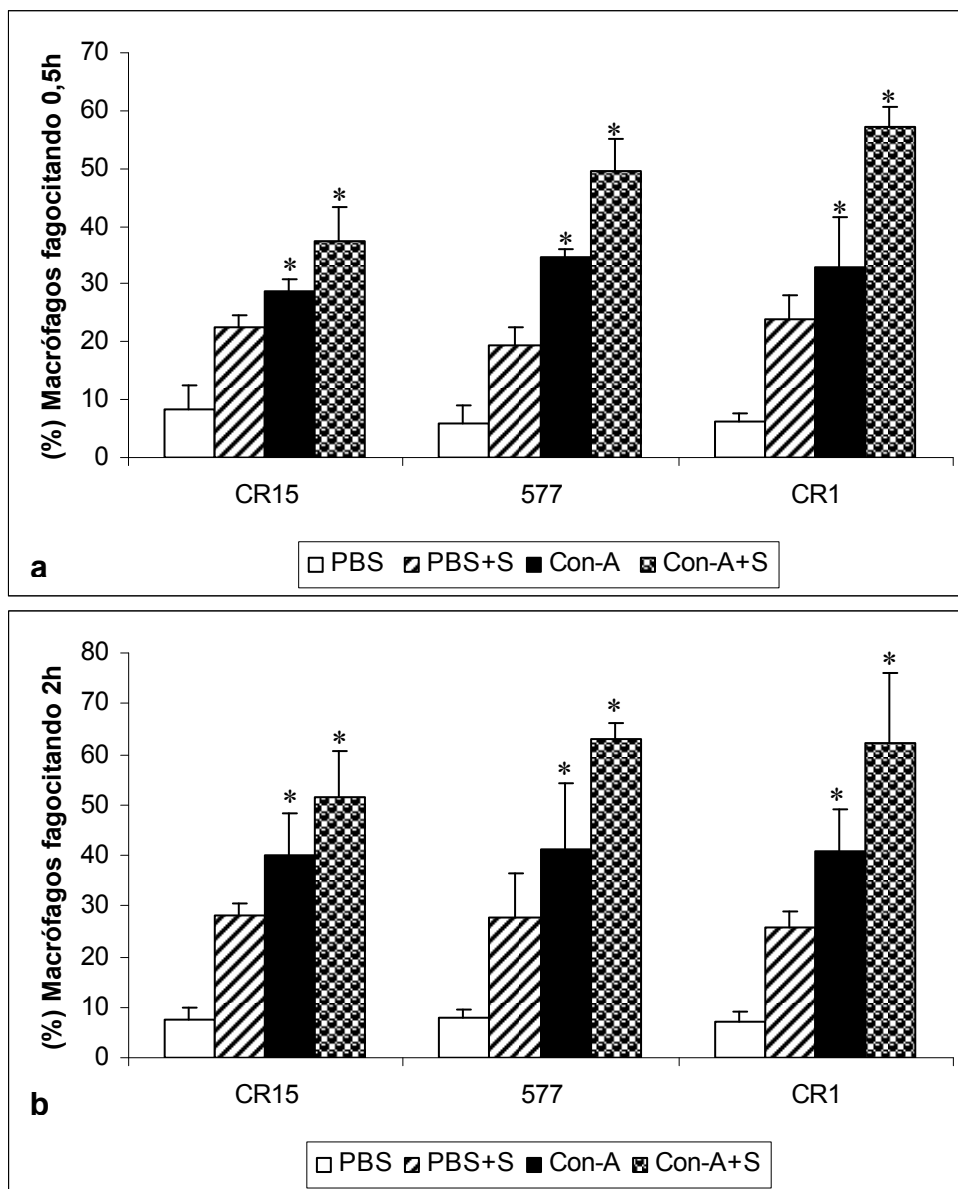


Figura 6 – Efeito da administração de Concanavalina-A na fagocitose de *C. albicans* mortas pelo calor.

Macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS ou com Con-A foram coincubados com *C. albicans* CR1, CR15 e 577 não opsonizadas ou opsonizadas (S) por 0,5h (a) e 2h (b) a 37 °C e a porcentagem de macrófagos fagocitando foi determinada pela contagem de 10 campos em imersão no microscópio óptico. Dados constituem média e desvio padrão de 3 experimentos. *P<0,05 comparados com macrófagos residentes.

Para avaliar o efeito de Con-A na fagocitose de *C. albicans* CR1, CR15 e 577, macrófagos peritoneais previamente ativados com Con-A foram incubados com blastoconídeos dos três isolados vivos por 2h. A porcentagem de macrófagos fagocitando *C. albicans* CR1, CR15 e 577 vivas na ausência de soro fresco de camundongo não imune foi significativamente maior nos macrófagos de

camundongos pré-tratados com Con-A, comparado aos controles (Fig 5). A opsonização com soro fresco de camundongo não imune aumentou a internalização dos três isolados testados, para ambas as populações de macrófagos, pré-tratados com Con-A ou PBS, sendo que a internalização foi significativamente maior nos pré-tratados com Con-A que nos pré-tratados com PBS. Estes resultados mostraram similaridade com os resultados obtidos nos ensaios fagocíticos realizados com os três isolados de *C. albicans* mortas pelo calor.

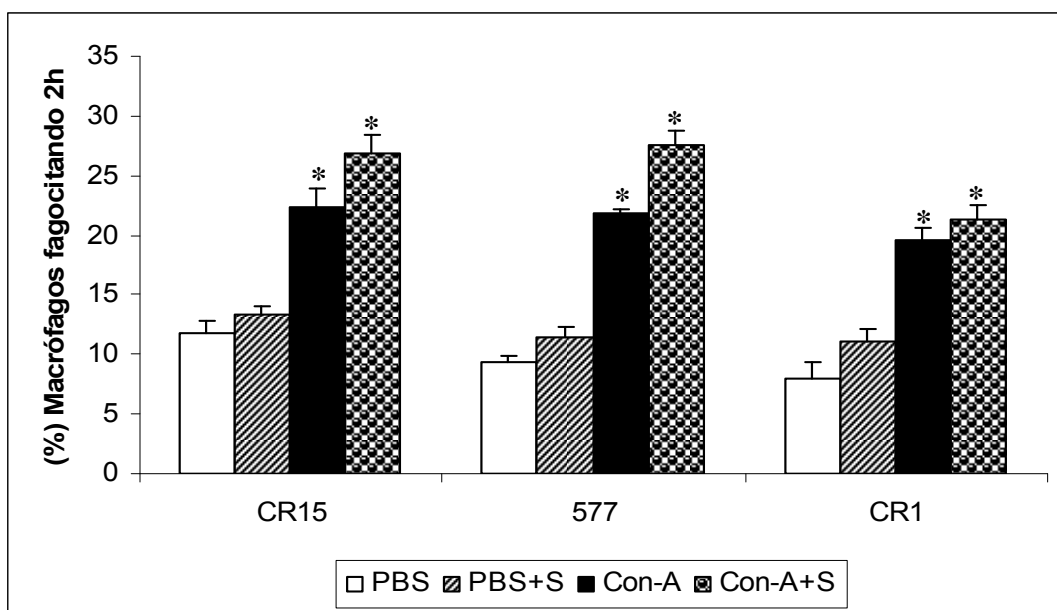


Figura 7 – Efeito de administração de Con-A na fagocitose de *C. albicans* vivas. Macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS ou com Con-A foram coincubados com *C. albicans* CR1, CR15 e 577 não opsonizadas ou opsonizadas (S) por 2h a 37°C e a porcentagem de macrófagos fagocitando foi determinada pela contagem de 10 campos em imersão no microscópio óptico. Dados constituem média e desvio padrão de 4 experimentos. *P<0,05 comparado com macrófagos residentes.

4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CON-A NA ATIVIDADE DOS RECEPTORES DE MANOSE

A avaliação da expressão dos receptores de manose foi realizada pela ligação do FITC-manose-BSA. Monocamadas de macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A por 3 dias antes, apresentaram uma maior expressão de receptores de manose, como verificado pela intensa ligação do FITC-manose-BSA a 24°C, comparado aos macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS (Fig 6).

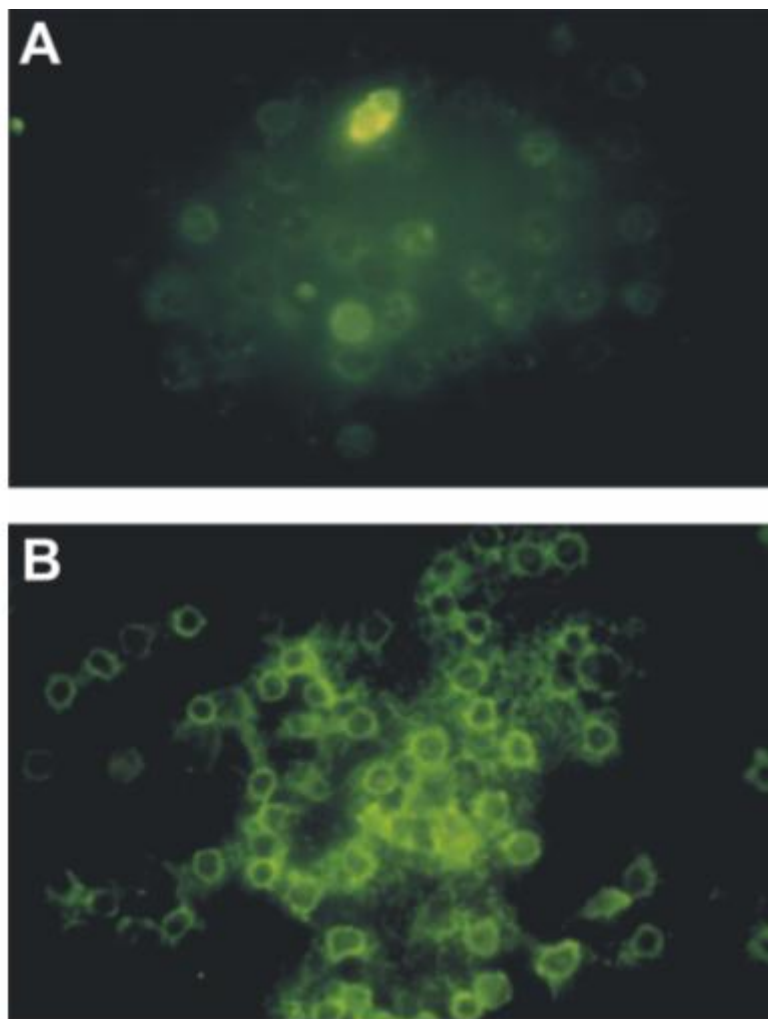


Figura 8 – Avaliação da expressão dos receptores de manose pela ligação do FITC-manose-BSA.

Monocamadas de macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS (A) ou Con-A (B) três dias antes foram incubados com FITC-manose-BSA por 15min a 24°C. Resultados representativos de quatro experimentos independentes.

Em adição, estudo do perfil de receptores de manose foi realizado utilizando um ensaio competitivo de fagocitose de *Candida* (2×10^6) na presença de manana (100µg/ml) e manose (100mM/ml). Os resultados mostram que macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A 3 dias antes apresentaram superior atividade dos receptores de manose que pode ser observado pela significativa redução da fagocitose dos três isolados testados na presença de manana e manose durante os ensaios fagocíticos quando comparado aos macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito inibitório da manana e manose da fagocitose de *C. albicans*

Condições	CR15	577	CR1
PBS Controle	8.3±4.1	5.7±3.2	6.2±1.5
PBS manana + manose	N.D	N.D	N.D
Con-A Controle	28.6±2.3*	28.8±11.1*	30.7±12.3*
Con-A manana + manose	14.2±3.4†	13.1±1.8†	15.4±5.3†

Camundongos foram pré-tratados com Con-A (250µg), 3 dias antes dos ensaios e os macrófagos incubados com *C. albicans* (5 blastoconídeos por macrófagos) por 0,5h a 37°C. A inibição dos receptores de manose foi investigada pela adição de manana e manose aos ensaios fagocíticos. Os resultados são média ± desvio padrão para três experimentos. * $P < 0.05$ para Con-A vs PBS. † $P < 0.05$ na presença dos inibidores. (N.D – não determinado).

4.5 EFEITO DE CON-A NA PRODUÇÃO DE TNF-A POR MACRÓFAGOS

Estudo anterior realizado *in vivo* por Conchon-Costa et al. (2007) demonstrou que camundongos pré-tratados com Con-A três dias antes e infectados com *C. albicans* CR15 tiveram um significativo aumento na produção de TNF- α no sobrenadante de células peritoneais, fígado e baço em relação aos animais pré-tratados com PBS. Sabendo disto, a participação da atividade dos macrófagos na produção de citocinas *in vitro* foi investigada. A produção de TNF- α no sobrenadante dos ensaios fagocíticos dos macrófagos ativados com Con-A e coincubados com *C. albicans* CR1, CR15 e 577 mortas pelo calor ou vivas, foi significativamente aumentada após 2h de coincubação com todos os isolados testados com significância de $P < 0.05$ comparado ao controle (Fig 7a e 7b).

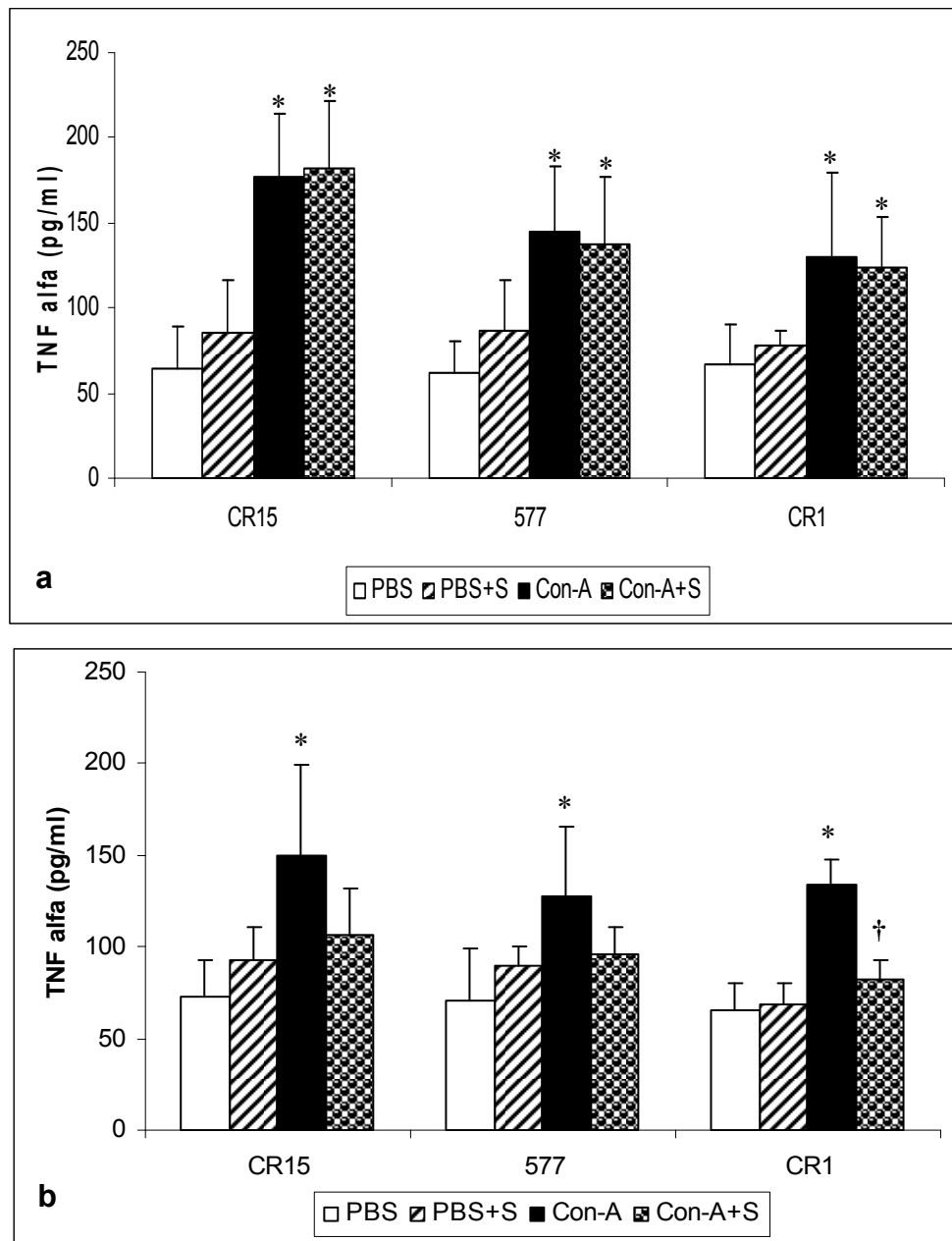


Figura 9 – Efeito de Con-A na produção de TNF- α por macrófagos.

Os sobrenadantes dos ensaios fagocíticos com *C. albicans* CR1, CR15 e 577 mortas pelo calor (a) ou vivas (b), opsonizadas com soro fresco de camundongo não imune (S) ou não opsonizadas, foram coletados para determinação da produção de TNF- α através da técnica de ELISA. Significância estatística * $P < 0.05$ para Con-A vs. PBS. † $P < 0.01$ para Con-A vs. Con-A+S.

A produção de TNF- α pela via do complemento CR3 foi também investigada. Todos os isolados de *Candida* testadas mortas ou vivas foram opsonizados com soro fresco de camundongo não imune, o sobrenadante coletado e submetido ao teste de ELISA. Os resultados mostraram que nos ensaios fagocíticos realizados com os isolados de *C. albicans* mortas pelo calor, a produção de TNF- α pelos macrófagos pré-tratados com Con-A foi superior aos obtidos pelos macrófagos pré-tratados com PBS. No entanto, nos ensaios fagocíticos realizados com os isolados de *C. albicans* vivas não houve aumento nos níveis desta citocina com a adição de soro tanto nos ativados quanto nos controles. Com relação a *C. albicans* CR1 houve redução na produção de TNF- α com $P < 0.01$ comparado ao sem soro (Fig 7a e 7b).

4.6 TRANSIÇÃO DA FORMA DE LEVEDURA PARA FILAMENTOSA DURANTE COINCUBAÇÃO COM MACRÓFAGOS

A capacidade de *C. albicans* diferenciar-se rápida e reversivelmente entre levedura e forma filamentosa interfere na patogenicidade, e o crescimento filamentoso traz vantagens para a *Candida* durante a interação com o sistema imune de mamíferos (GANTNER et al., 2005). Diante disso foi investigado a transição da forma de levedura para filamentosa durante coincubação com macrófagos pré-tratados com Con-A ou PBS. Após 2h de coincubação dos macrófagos com os isolados de *C. albicans* CR1, CR15 e 577, dez campos em imersão foram analisados. Os resultados ilustrados na Tabela 2 mostraram que o dimorfismo foi maior nos macrófagos dos camundongos pré-tratados com PBS comparado aos macrófagos pré-tratados com Con-A ($P < 0.01$).

Tabela 2 – Transição para formas filamentosas durante coincubação de blastoconídeos com macrófagos

Isolados	Con-A	PBS	Con-A+S	PBS+S
	Filamentos	Filamentos	Filamentos	Filamentos
CR15	36.5±6.3	74.7±11.2*	30.9±4.5	70.6±12.1*
577	35.6±6.3	72.6± 2.3*	32.2±6.3	68.2±13.0*
CR1	40.2±9.4	78.1±10.7*	25.7±8.1	69.1±8,5*

C. albicans foram coincubadas com macrófagos a 37°C por 2h. A análise foi realizada através da contagem de dez campos em imersão e a porcentagem de formas filamentosas foi determinada na presença (S) ou ausência de soro fresco de camundongo não imune. Os resultados são média ± desvio padrão para quatro experimentos. * $P < 0.01$ em relação aos macrófagos pré-tratados com Con-A.

5 DISCUSSÃO

Para um fungo patogênico como *C. albicans* causar infecção é necessário que supere a resposta imune do hospedeiro que é regulada pela produção de citocinas pró e antiinflamatórias (ROMANI et al., 2004). Para iniciar o processo de infecção ao hospedeiro, *C. albicans* expressa fatores de virulência tais como: adesividade, alterações fenotípicas e morfológicas que resultam no sucesso do processo infeccioso. Entre outros fatores envolvidos na transição da forma comensal para a patogênica, destaca-se a proteção contra lise osmótica (parede celular); liberação de proteinases, que facilitam que *C. albicans* atravesse o epitélio do hospedeiro; formação de hifas para aumentar a capacidade nutricional e fixação ao tecido (CALDERONE; FONZI, 2001).

Trabalhos realizados por Panagio et al. (2002) e Gasparoto et al. (2004) demonstraram um aumento na patogenicidade de *C. albicans* causado pela capacidade de isolados de *C. albicans* (CR1) de pacientes HIV+ induzirem apoptose em macrófagos peritoneais murinos e induzirem um aumento na produção de IL-10.

Neste trabalho, investigamos se *C. albicans* (CR15), também isolada de pacientes HIV+, apresentava a mesma capacidade de CR1 em induzir apoptose de macrófagos peritoneais. Apoptose ou morte celular programada pode favorecer o patógeno devido o alvo neste caso ser o macrófago, uma célula fundamental para eliminação do microrganismo. O processo de apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (CHAUFFAILLE, 2005). As células apoptóticas modificam a superfície da membrana que são reconhecidas pelos receptores presentes nos fagócitos. A fosfatidilserina foi implicada como sendo um importante ligante neste processo de reconhecimento, pois em condições de normalidade, a fosfatidilserina é encontrada no folheto interno da bicamada assimétrica da membrana de superfície e a translocação para o exterior da membrana é mediada por um fosfolípido que é ativado pela proteína kinase C δ (PKC δ) (HUYNH et al., 2001).

O reconhecimento da fosfatidilserina na superfície da membrana ocorre através do receptor de fosfatidilserina (PSR) que está presente nos fagócitos

e inicia a captação da célula apoptótica. O englobamento destas células apoptóticas não ocorre somente para removê-las do tecido, mas também para providenciar proteção do local danificado, resultado da liberação de componentes injuriosos ou pró-inflamatórios. Em adição ao papel proposto na remoção das células antes que sofra lise, a ingestão *in vitro* de células apoptóticas suprime ativamente a produção de fatores de crescimento pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas (GM-CSF, MIP2, IL-1, KC, IL-8 e TNF- α) e eicosanóides. Esta modulação negativa dos mediadores proinflamatórios em resposta a células apoptóticas tem sido demonstrada em macrófagos derivados de monócito humano (RAW 264.7), macrófagos de linhagem celular de murinos (J774), e macrófagos derivados da medula óssea, assim como fibroblastos e células epiteliais de mamíferos (FADOK et al., 1998; McDONALD et al., 1999).

Nossos resultados mostraram que a capacidade de *C. albicans* (CR15) induzir apoptose foi dependente do estado funcional dos macrófagos, e da opsonização com C3b e iC3b. A opsonização com soro fresco de camundongo não imune promoveu uma maior exposição da fosfatidilserina na superfície externa da membrana que pode ser observado pela ligação da anexina V-FITC nos macrófagos pré-tratados com PBS comparado aos pré-tratados com Con-A (Fig 2a e 2b). Além disso, os macrófagos pré-tratados com PBS coincubados com *C. albicans* CR15 opsonizadas foram mais destruídos e mais corados com iodeto de proprídeo (Fig 3c e 3d) comparado aos macrófagos pré-tratados com Con-A (Fig 3a). A Figura 3b mostra que, além destes macrófagos se manterem viáveis (o que pode ser observado através da coloração com o 6-CFDA), eles foram capazes de matar as leveduras tanto dentro quanto fora dos macrófagos, como observado pela coloração com iodeto de propídeo.

Tem sido demonstrado por vários pesquisadores que a fagocitose de *C. albicans* por fagócitos mononucleares, como os macrófagos, é aumentada quando as leveduras estão opsonizadas por componentes do sistema complemento (GAZIRI et al., 1999; SANTOS et al., 2002). No entanto o reconhecimento e a fagocitose pelo CR3 não dispara as defesas protetoras do hospedeiro, tais como o “burst” respiratório (NETEA et al., 2008; WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983). Como demonstrado por Panagio et al. (2002), o isolado de *C. albicans* 577 não induz apoptose de macrófagos. Uma hipótese para isto é o fato deste isolado não ser de paciente HIV+. Uma vez que glicoproteínas do vírus da imunodeficiência humana,

através da gp41 e a gp160 ativam a produção de SAPs em *C. albicans* (GRUBER et al., 1999). Assim, assume-se que este isolado é menos virulento que CR1 e CR15. No entanto, outros estudos deverão ser realizados para responder melhor esta questão. Os resultados obtidos neste trabalho com o isolado CR15 mostraram que provavelmente os três isolados testados, utilizando a via do complemento, encontraram um ambiente apropriado para sobreviverem dentro das células fagocíticas.

A contenção da invasão do patógeno no hospedeiro exige uma resposta rápida, geralmente exercida pelo sistema imune inato, o qual desenvolve prontamente e precede a expansão clonal de linfócitos antígenos-específicos e a liberação de citocinas que aumenta a ativação de macrófagos, consequentemente melhorando a fagocitose. Con-A se liga diretamente às moléculas de carboidratos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e receptores de células T auxiliar (TCR), resultando na ativação de células Th1 (BERTRAM et al., 1997) e produção de citocinas como, IL-2, IFN- γ , TNF- β (BARBUTO, 2001), aumentada ativação de macrófagos e, consequentemente melhora a fagocitose.

Estudos realizados anteriormente demonstraram que o tratamento prévio de camundongos com Con-A aumentou a capacidade destes animais em eliminar o inóculo de *C. albicans* da cavidade peritoneal, baço, fígado e rim, comparado aos animais controle (FELIPE et al., 1995). Em adição, Garizi et al. (1999) demonstraram que a administração de Con-A 4 dias antes do ensaio fagocítico resultou em ativação dos macrófagos do exudato peritoneal. A fagocitose de *C. albicans* 577 aumentou significativamente em relação aos macrófagos controle mediante o aumento de receptores de manose.

Corroborando estes resultados, neste trabalho, a análise da capacidade dos macrófagos fagocitar os três isolados de *C. albicans* (CR1, CR15 e 577) mortos pelo calor após 0.5 e 2h de ensaio fagocítico foi diferente nas duas populações de fagócitos (pré-tratados com Con-A ou pré-tratados com PBS). O tratamento dos camundongos com Con-A três dias antes dos ensaios fagocíticos, aumentou a capacidade dos macrófagos fagocitar os três isolados testados, comparado aos macrófagos de animais pré-tratados com PBS (Fig 4).

Os resultados dos ensaios fagocíticos com os isolados de *C. albicans* vivas (Fig 5), mostraram uma similaridade aos resultados obtidos com os isolados mortos pelo calor, no que diz respeito a capacidade dos macrófagos

fagocitar. Os resultados mostraram que os macrófagos pré-tratados com Con-A mantiveram um alto potencial para ingerir *C. albicans* (CR1, CR15 e 577) comparado aos macrófagos pré-tratados com PBS. A adição de soro fresco de camundongo não imune aumentou a fagocitose em ambas às populações de macrófagos, mas nos pre-tratados com Con-A foi significativamente superior, comparado aos pré-tratados com PBS. Embora a capacidade de fagocitar das populações de macrófagos coincubados com os três isolados de *C. albicans* mortas pelo calor ou vivas, tenham sido parecidos, observa-se uma redução na porcentagem de fagocitose nos ensaios realizados com os isolados vivos.

Esta redução pode estar relacionada com o desenvolvimento de fatores de virulência por *C. albicans* durante o período de coincubação com os macrófagos, como a transição da forma de levedura para filamentosa, indução de apoptose e também da produção de enzimas hidrolíticas (aspartil proteinases e fosfolipases). Segundo Romani et al. (1997), as formas filamentosas são necessárias para invadir as células do sistema imune, enquanto que as formas leveduriformes pode ser a forma de proliferação de tecidos infectados. Fè D'Ostiani et al. (2000) demonstraram que células dendríticas da pele de camundongos fagocitaram ambas as formas de *C. albicans* (levedura e hifas), por mecanismos distintos. Ambas as formas do fungo foram encontradas dentro de fagossomos, porém a hifa escapava do fagossomo e vivia livre no citoplasma e a levedura era degradada. Isso explica a enorme capacidade da *C. albicans* se adaptar e sobreviver no ambiente intracelular de macrófagos. A forma leveduriforme induziu a produção de IL-12, enquanto que a hifa inibiu IL-12 e induziu a produção de IL-4. É bem conhecido que a IL-12 sinaliza para Th1 e estas células liberam IFN- γ ativando os macrófagos, enquanto que a produção de IL-4 sinaliza para Th2 que libera IL-10, desativando as funções efetoras de macrófagos.

As SAPs, como já descrito anteriormente, constituem também um importante fator de virulência de *C. albicans*. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram a produção de proteinases como mecanismo de escape do sistema imune. Andrade e Felipe (1992) evidenciaram *in vitro* a participação de proteinases de *C. albicans* na morte precoce de macrófagos peritoneais e que a adição de albumina ou pepstatina ao meio de incubação protegeu as células fagocíticas dos efeitos deletérios das proteinases. A produção de proteinases (provavelmente SAP2) por CR1, CR15 e 577 foi detectada em placas

de Agar com meio mínimo e albumina como fonte de nitrogênio (ALMEIDA, et al., 2004).

Outra característica de macrófagos ativados não analisadas neste trabalho, porém evidenciada por Vito (2007), é a capacidade de matar os três isolados de *C. albicans* (CR1, CR15 e 577). Os resultados do trabalho demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados com Con-A reduziram 75% do inóculo de *Candida* após 1h de coincubação, enquanto somente 25% do inóculo foi reduzido pelos macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados com PBS. Segundo Barbuto (2001), macrófagos ativados apresentam ainda aumento da produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, produção de NO, conteúdos enzimáticos de lisossomas e conseqüente aumento do poder microbicida.

O aumento na capacidade de macrófagos pré-tratados com Con-A fagocitar e matar *C. albicans* (CR1, CR15 e 577) em relação aos macrófagos pré-tratados com PBS pode estar relacionada ao aumento da atividade dos receptores de manose nestes macrófagos, fato este observado pela intensa ligação do FITC-manose-BSA nos macrófagos pré-tratados com Con-A em relação aos pré-tratados com PBS (Fig 6), além da significativa redução da fagocitose após adição de manana e manose nos ensaios fagocíticos (Tabela 1). Estes receptores parecem desenvolver um importante papel na defesa do hospedeiro e providenciam um elo entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (STAHL; EZEKOWITZT, 1998). Há evidências que os receptores de manose estão associados com uma via de transdução de sinal levando a produção de citocinas como IL-1 β , IL-6 (YAMAMOTO et al., 1997) e TNF- α (NETEA et al., 2006). Isto explica o fato dos níveis de TNF- α obtidos nos ensaios fagocíticos realizados tanto com *C. albicans* (CR1, CR15 e 577) mortas pelo calor (Fig 7a) ou vivas (Fig 7b), na ausência de soro fresco de camundongo não imune, ter sido significativamente maiores nos macrófagos pré-tratados com Con-A, comparado aos macrófagos pré-tratados com PBS, contribuindo assim com uma maior redução do inóculo por estes macrófagos ativados, como demonstrado por de Vito (2007).

Estes dados corroboram com os obtidos *in vivo* por Conchon-Costa et al. (2007), que demonstraram que camundongos pré-tratados com Con-A apresentaram uma significativa redução do inóculo de *C. albicans* e uma elevada produção de TNF- α no fígado, baço e nas células do exudato peritoneal em relação

aos animais pré-tratados com PBS. Estes resultados sugeriram que os macrófagos de animais pré-tratados com PBS tiveram uma menor capacidade de depurar *C. albicans* do local da infecção, que por sua vez disseminou-se para outros órgãos como fígado e baço. A hipótese para isso seria que como os macrófagos não conseguiram matar *C. albicans*, estas começaram a secretar proteinases, e conseguiram evadir dos mecanismos microbicidas dos macrófagos e com isso, induziram morte de macrófagos após 0.5h de infecção.

Níveis similares de TNF- α foram obtidos nos ensaios fagocíticos realizados com os isolados de *C. albicans* (CR1, CR15 e 577) mortas pelo calor e opsonizadas com soro fresco de camundongo não imune, tanto nos macrófagos pré-tratados com PBS como nos macrófagos pré-tratados com Con-A. Os níveis de TNF- α foram novamente significativamente maiores nos macrófagos ativados por Con-A comparativamente aos tratados com PBS (Fig 7a). No entanto, nos ensaios fagocíticos realizados com os isolados de *C. albicans* vivas e opsonizadas com soro fresco de camundongo não imune, não houve mudança nos níveis de TNF- α produzidos pelos macrófagos pré-tratados Con-A em relação aos macrófagos pré-tratados com PBS. Observou-se ainda que, nos macrófagos pré-tratados com Con-A e coincubados com o isolado CR1 opsonizado com soro fresco de camundongo não imune, a produção de TNF- α foi significativamente inibida ($P < 0.01$) após 2h de coincubação (Fig 7b). Estes resultados sugerem que a fagocitose via CR3 pode não sinalizar para a produção desta citocina. Nas condições de não opsonização, o aumento de TNF- α pelos macrófagos pré-tratados com Con-A pode ser devido ao aumento da atividade dos receptores de manose.

É conhecido que o reconhecimento do patógeno na imunidade inata é mediado por uma série de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), presentes nos microrganismos patogênicos. Na resposta imune contra *Candida* este reconhecimento ocorre através de PAMPs específicos, os quais desencadeiam uma resposta próinflamatória. *C. albicans* possui uma variedade de PAMPs, incluindo quitina, glucana, manana, manoproteínas e glicolipídeos. O reconhecimento diferencial destes componentes na parede de *C. albicans* é mediado através de numerosos PRRs, como TLRs, receptor de manose, Dectina-1, receptor de complemento 3 (CR3) e lectinas ligada a manose (NETEA et al., 2008; VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2009). No caso dos TLRs, os TLR2 e TLR4, têm sido demonstrados como importantes receptores de

reconhecimento para *Candida* (NETEA et al., 2004b; ROEDER et al., 2004). Os resultados obtidos com a adição de manana e manose durante os ensaios fagocíticos mostraram uma redução de 50% da fagocitose assim, a participação destes outros receptores (TLR2, TLR4 e dectina-1) não pode ser descartada. Segundo Netea et al. (2006), o reconhecimento de *Candida* por estes receptores aumenta também a produção de TNF- α .

CONCLUSÃO

Podemos concluir que:

- ❖ A capacidade de *C. albicans* induzir apoptose depende do estado funcional dos macrófagos visualizado pela ligação com a anexina V-FITC, onde nos macrófagos PBS foi maior comparado aos ativados com Con-A;
- ❖ O número de macrófagos corados com iodeto de propídeo (indicador de necrose) foi maior nos macrófagos PBS comparado aos macrófagos ativados com Con-A;
- ❖ Macrófagos Con-A apresentaram uma maior expressão de receptores de manose visualizado pela intensa ligação do glicoconjugado manose-BSA- FITC comparado aos macrófagos PBS;
- ❖ Os macrófagos ativados com Con-A apresentaram um aumento significativo na fagocitose e na atividade candidacida em relação ao controle e na presença de soro não imune em ambas populações de macrófagos houve aumento da fagocitose mas, não da atividade candidacida;
- ❖ Os níveis de TNF- α aumentaram significativamente nos ensaios fagocíticos realizados com macrófagos ativados com Con-A e correlaciona com maior capacidade para matar *Candida* reduzindo assim o dimorfismo. Em contraste os macrófagos controle mantiveram níveis basais de TNF- α , o que proporcionou um melhor ambiente para a transição da forma mais agressiva, ou seja, de levedura para forma filamentosa.

Em resumo, a ativação dos macrófagos com Con-A três dias antes proporcionou a eles uma maior capacidade de fagocitar e matar *C. albicans*. Este fato pode ser devido ao aumento da atividade dos receptores de manose, um aumento na produção de TNF- α , contendo o desenvolvimento de fatores de virulência, como a transição da forma de levedura para filamentosa, que seria crucial para a sobrevivência da *Candida*.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin-A polysaccharide interaction. **Can. J. Biochem.**, v.9, p.1147-1150, 1968.
- ALBRECHT, A. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **J. Biol. Chem.** v.281, p.688–694, 2006.
- ALMEIDA, R. S. C. et al. Atividade de aspartil proteinases por isolados de *Candida* de pacientes HIV+. **Biosaúde.**, v.6, n.1/2, p.17-26, Jan/Dez, 2004.
- ALMEIDA, R. S. et al. The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. **PLoS Pathogens**, v.4. n.11, Nov. 2008.
- ALNEMRI, E. S. et al. Human ICE/CED-3 Protease nomenclature. **Cell.**, v.87, p.171, 1996.
- ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras. Patol. Med. Lab.**, v.43, n.5, p.319-327, Out., 2007.
- ANDRADE, G. M.; FELIPE, I. Evidence for the participation os proteinases released by *Candida albicans* in the early killing of peritoneal macrophages *in vitro*. **Braz. J. Med.**, v.25, p.167-174, 1992.
- ANDERSON, J.; MELCHERS, F. **Concanavalin- A as a Tool**. London: WHILEY & SONS, 1976.
- ARIIZUMI, K. et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **J. Biol Chem.**, v.275, p.20157-20167, 2000.
- BARBUTO, J. A. M. Imunidade Celular. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p.179-193.

BELLOCCHIO, S. et al. The Contribution of the Toll-Like/IL-1 Receptor Superfamily to Innate and Adaptive Immunity to Fungal Pathogens In Vivo. **The Journal of Immunology**, v.172, p.3059-3069, 2004.

BERTRAM, E. M.; JILBERT, A. R.; KOTLARSKI, L. Optimization of an in vitro assay which measures the proliferation of duck T lymphocytes from peripheral blood in response to stimulation with PHA and Con-A. **Dev. Comp. Immunol.**, v.21, p.229-310, 1997.

BLASI, E. et al. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, p.69-79, 2005.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition: a new receptor for β -glucans. **Nature**, v.413, p.36-37, 2001.

BROWN G. D.; GORDON S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v.19, p.311-315, 2003.

CALDERONE, R. A.; FONZI, A. W. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology Rev.**, v.9, p.327-335, 2001.

CABIB, E. et al. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.19679–19682, 2001.

CAMBI, A. et al. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v.33, p.532–538, 2003.

CAMBI, A. et al. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. **J. Biol. Chem.**, v.283, p.20590–20599, 2008

CARVALHO, L. P. et al. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** v.36, n.5, p.571-576, set./out. 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n.5, p.599-607, set./out. 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, n.3, p.332-337, maio/jun. 2007.

CONCHON-COSTA, I. et al. Low dose of Concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.3, p.330–336, 2007.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v.72, n.3, p.495–544 , sept. 2008.

CHANG, M. F. et al. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* species. **BMC Infect. Dis.**, v.5, p.1-5, 2005.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.27, n.2, p.79-82, 2005.

CHEN, Y. C. et al. Differential secretion of Sap4–6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. **Microbiology**, v.148, p.3743–3754, 2002.

CHOI, J. H. et al. Impairment of p38 MAPK-mediated cytosolic phospholipase A2 activation in the kidneys is associated with pathogenicity of *Candida albicans*. **Immunology**, v.120, n.2, p.173-181, Fev, 2007.

DIETERICH, C. et al. In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EGF1 and CPH1 to adhesion and invasion. **Microbiology**, v.148, p.497-506, 2002.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v.68, p.383-424, 1999.

FADOK, V. A., et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J. Clin. Invest.**, v.101, p.890–898, 1998.

FÈ D'OSTIANI, C. et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of fungus *Candida albicans*: Implications for initiation of helper cell immunity in vitro and in vivo. **J. Exp. Med.**, v.191, p.1661-1673, 2000.

- FELIPE, I.; BIM, S.; SOMENSI, C. C. Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin A or jacalin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.4, p.477-483, 1995.
- FRADIN, C.; POULAIN, D.; JOUAULT, T. beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. **Infect Immun.**, v.68, p.4391-4398, 2000.
- GANTNER, B. N. et al. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J. Exp. Med.**, v.197, p.1107-1117, 2003.
- GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; UNDERHILL, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **The EMBO Journal.** v.24, p.1277-1286, 2005.
- GASPAROTO, T. H. et al. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.2, p.219-224, 2004.
- GAZIRI, G. et al. Phagocytosis of *Candida albicans*, by concanavalin-A activated peritoneal macrophages. **Med. Mycol.**, v.37, p.195-200, 1999.
- GREEN, D. R.; BEERE, H. M. Apoptosis: Gone but not forgotten. **Nature**, v.405, p.28-29, 2000.
- GRUBER, A. et al. Dissimilar attenuation of *Candida albicans* virulence properties by human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. **Immunobiology**, v.201, p.133-144, 1999.
- HASLETT, C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in tissue fate of granulocytes. **Clin. Sci.**, v.83, p.639-648, 1992.
- HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v.3, p.121-126, 2002.
- HUBE, B. From comensal to pathogen: stage- and tissue specific gene expression of *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.7, p.336-341, 2004.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEPE, G. S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Current Opinion in Microbiology**. v.6, p.344–350, 2003.

HUYNH, M. N.; FADOK, V. A.; HENSON, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. **J. Clin. Invest.**, v.109, p.41–50, 2002.

JOUAULT, T. et al. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v.11, n.7, p.1007–1015, 2009.

JOUAULT, T. et al. Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. **Journal of Immunology**., v.177, p.4679–4687, 2006.

KADIR, T.; GUMRU, B.; UYGUN, C. B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Arch Oral Biol.**, v.52, n.7, p.691-696, Jul., 2007.

KAMAI, Y. et al. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the Pathogenesis of Experimental Oropharyngeal Candidiasis. **Infect. Immun.**,v.70, n.9, p.5256–5258, 2002.

KAPTEYN, J. C. et al. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. **Molecular Microbiology**, v.35, n.3, p.601-611, 2000.

KARBASSI, A. et al. Enhanced killing of *Candida albicans* by murine macrophages treated with macrophage colony-stimulating factor: evidence for augmented expression of mannose receptors. **Journal of Immunology**. v.139, n.2, p.417-421, 1987.

KERRIGAN, A. M.; GORDON, B. D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**, v.214, n.7, p.562-575, Jul., 2009.

LENGELER, K. B. et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.64, p.746-785, 2000.

LOYOLA, W. et al. Concanavalin-A enhances phagocytosis and Killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunol. Medical Microbiol.** v.33, p.201-208, 2002.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **RBAC.**, v.40, n.1, p.65-67, 2008.

MARÓDI, L.; JOHNSTON, R. B. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon- γ . **Immunodeficiency.**, v.4, p.181–185, 1993.

McDONALD, P. P et al. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. **J. Immunol.**, v.163, p.6164–6172, 1999.

MORESCO, T. R. et al. Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A. **Med. Mycol.**, v.40, p.393-397, 2002.

MUKHERJEE, P. K. et al.. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. **Microbiology**, v.149, p.261-267, Jan, 2003.

NAGAOKA, K. et al. Association of SIGNR1 with TLR4-MD-2 enhances signal transduction by recognition of LPS in gram-negative bacteria. **International Immunology**, v.17, p. 827–836, 2005.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.3, p.400-428, Set. 2003.

NAGLIK, J. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol**, v.6, n.10, p.915-26, 2004.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. **Journal of Medical Microbiology.**,v.55, p.1323–1327, Jul., 2006.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. A role for the Map kinase MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. **Microbiology.**, v.144, p.411-424, 1998.

NETEA, M. G. et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **J. Clin. Invest.**, v.116, p.1642-1650, 2006.

NETEA, M. G. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.67–78, 2008.

NETEA, M. G. et al. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.52, p.118-123, 2007

NETEA, M. G. et al. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.23, p.672–76, 2004a.

NETEA, M. G. et al. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**. v.75, p.749–755, 2004b.

NEWMAN, S. L.; HOLLY, A. *Candida albicans* Is Phagocytosed, Killed, and Processed for Antigen Presentation by Human Dendritic Cells. **Infection And Immunity**, v.69, n.11, p.6813-6822, Nov. 2001.

OKSUZ, S. et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Jpn J Infect Dis.**, v.60, n.5, p.280-283, Set, 2007.

PANAGIO, L. A. et al. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. **J. Med. Microbiol**, v.51, p.929-936, 2002.

PIETRELLA, D. et al. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. **Cellular Microbiology**, v.8, p.602–612, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.1, p.133-163, Jan, 2007.

PHAN, Q. T. et al. Als3 Is a *Candida albicans* Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. **PLoS Biology**, v.5, n.3, p.543-557, Mar. 2007

RIBEIRO, E. L. et al. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab.**,v.64, p.106-128, 2004.

RIBEIRO, E. L. et al. Buccal *Candida albicans* of children with down's syndrome: behavior of germ tubes, exoenzymes and sensibility to killer toxins. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v.22, n.57, p.243- 249, 2007.

ROEDER, A. et al. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. **Medical Mycology**, v.42, p.485–498, 2004.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.1-13, 2004.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUCETTI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Trends in Microbiology**. v.10, p.508–514, 2002.

ROMANI, L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 and beyond. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.2, p.363-367, 1999.

ROMANI, L. The T cell response to fungi. **Curr. Opin. Immunol.**, v.9, p.484-490, 1997.

ROMANI, L.; PUCETTI, P.; BISTONI. Biological role of helper T-cell subsets in candidiasis. **Chem. Immunol.**, v.63, p.113-137, 1996.

RUIZ-HERRERA, J. et al. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Res.**,v.6, p.14–29, 2006.

SAMARANAYAKE, Y. H. et al. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. **J Med Microbiol.**, v.54, p.583-593, Jun, 2005.

SAMARANAYAKE, Y. H. et al. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. **APMIS**, v.114, n.12, p.857-866, Dec, 2006.

SANTOS, A. A. et al. Treatment of serum with supernatants from cultures of *Candida albicans* reduces its serum-dependent phagocytosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.1, p.79-83, 2002.

SATO, T. et al. Farnesol, a Morphogenetic Autoregulatory Substance in the Dimorphic Fungus *Candida albicans*, Inhibits Hyphae Growth through Suppression of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. **Biol. Pharm. Bull.**, v.27, n.5, p.751-752, Maio, 2004.

SAVILLE, S. P. et al. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryot Cell.**, v.2, p.1053-1060, 2003.

SILVA, J.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Enzymatic activity, slime production and antifungal agent sensitivity of *Candida* sp. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.40, n.3, p.354-355, Maio/Jun, 2007.

SCHALLER, M. et al. *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinases Modify the Epithelial Cytokine Response in an In Vitro Model of Vaginal Candidiasis. **Infection and Immunity.**, v.73, n.5, p.2758-2765, Maio, 2005.

SHEPPARD, D. C. et al. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. **The Journal of Biological Chemistry.** v.279, n.29, p.30480-30489, July, 2004.

STAAB, J. F. et al. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science**, v.283, p.1535-1538, 1999.

STAHL, P. D.; EZEKOWITZ, A. B. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. **Curr Opin Immun.**, v.10, p.50-55, 1998.

STAIB F. Serum proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. **Sabouraudia.** v.4, n.3, p.187-193, Out. 1965.

STAIB, P. et al. Tetracycline-Inducible Expression of Individual Secreted Aspartic Proteases in *Candida albicans* Allows Isoenzyme-Specific Inhibitor Screening. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.**, v.52, n.1, p.146-156, Jan. 2008.

TAKEUCHI, O. et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. **J. Immunol.**, v.169, p.10-14, 2002.

TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.40, n.1, Jan/Fev. 2007.

TAYLOR, P. R. et al. The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (Dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. **Journal of Immunology.**, v.172, p.1157–1162, 2004.

TAYLOR, B. N. et al. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited during Vaginal Infection. **Infection and Immunity.**, v.73, n.3, p.1828–1835, Mar. 2005a.

TAYLOR, P. R. et al. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology.**, v.23, p.901– 944, 2005b.

TOSUN, I. et al. Induction of secretory aspartyl proteinase of *Candida albicans* by HIV-1 but not HSV-2 or some other microorganisms associated with vaginal environment. **Mycopathologia.**, v.159, p.213–218, 2005.

TRIANTAFILOU, M. et al. Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting. **The Journal Of Biological Chemistry.**, v.281, n.41, p.31002–31011, October, 2006.

VAN DER GRAAF, C. A. A. et al. Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastospores and Hyphae. **Infect. Immun.**, v.73, p.7458-7464, 2005.

VILLAR, C. C.; DONGARI-BAGTZOGLOU A. Immune defence mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis. **Expert Rev Mol Med.**, v.10, p.1-20, 2007.

VILLAMÓN, E. et al. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. **Microb. In fact.**, v.6, p.1-7, 2004.

VITO, E. **Apoptose de macrófagos residentes e ativadas por Concanavalina-A após fagocitose de *Candida albicans*.** 2007. Dissertação. (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

WATANABE, H. et al. Relationship between Cell Morphology and intracellular Potassium Concentration in *Candida albicans*. **J. Antibiot.**, v.59, n.5, p.281-287, 2006.

WELLS C. A. et al. The Macrophage-Inducible C-Type Lectin, Mincle, Is an Essential Component of the Innate Immune Response to *Candida albicans*. **The Journal of Immunology.**, v.180, p.7404-7413, 2008.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. Receptors for C3b and iC3b promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J Exp Med.**, v.158, p.2016-2023, 1983.

YAMAMOTO, Y.; KLEIN, T. W.; FRIEDMAN, H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. **Infect Immun.**, v.65, p.1077-1082, 1997.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida spp.* **NewsLab**, Edição 63, 2004.

ZHAO, X. et al. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. **Microbiology.**, v.151, p.1619–1630, 2005.

ZHAO, X. et al. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v.150, p.2415–2428, 2004.