



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WAGNER LOYOLA

**AÇÃO PROTETORA DE EXTRATO DE SEMENTES DE
Artocarpus integrifolia L. CONTRA INFECÇÃO POR *Candida*
albicans ATRAVÉS DO AUMENTO DAS FUNÇÕES DE
FAGÓCITOS**

Londrina
2008

WAGNER LOYOLA

**AÇÃO PROTETORA DE EXTRATO DE SEMENTES DE
Artocarpus integrifolia L. CONTRA INFECÇÃO POR *Candida*
albicans ATRAVÉS DO AUMENTO DAS FUNÇÕES DE
FAGÓCITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ionice Felipe.

Londrina
2008

WAGNER LOYOLA

**AÇÃO PROTETORA DE EXTRATO DE SEMENTES DE
Artocarpus integrifolia L. CONTRA INFECÇÃO POR *Candida*
albicans ATRAVÉS DO AUMENTO DAS FUNÇÕES DE
FAGÓCITOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Santana da Silva

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis

Prof. Dr. Luis Carlos Jabur Gaziri

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio

Profa. Dra. Ionice Felipe

Londrina, 24 de março de 2008.

A

Maria Emilia e Gabriel com muito amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus inteligência suprema, causa primária de todas as coisas. Por todos os presentes que tem me dado durante a minha vida, inclusive as pessoas que estão ao meu lado sempre

À Profª. Drª. Ionice Felipe, pela oportunidade, orientação, paciência e dedicação. Pelo incentivo nesse processo de formação científica, seu exemplo sempre estará em meus pensamentos e em minhas atitudes

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Jabur Gaziri, pela participação neste trabalho, e por toda orientação durante minha vida acadêmica, “se enxerguei ao longe é por que estive sobre os ombros de gigantes” (Isaac Newton).

Aos amigos Ivete Conchon Costa e Flavio Lauretti, “na vida não fazemos amigos, nós os reconhecemos”, por todo incentivo e principalmente pela amizade sincera.

Aos amigos Pedro S. Raimundo Filho e Jesus Antonio Vargas, no auxílio constante e principalmente pela amizade que foram além do compromisso profissional.

Aos amigos, Luiz Antonio Custódio e Eliana de Vito, pela participação e apoio durante esta etapa.

Ao amigo Alexandre Saito pela constante colaboração nesta tese.

Aos estagiários Ana Carolina Vitor, Jean Alcântara de Freitas e Adriana Storer pelo apoio e amizade.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia, pelo constante apoio.

A Todos que de forma direta ou indireta me auxiliaram neste trabalho

LOYOLA, Wagner. **Ação protetora de extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. contra infecção por *Candida albicans* através do aumento das funções de fagócitos.** 2008. 52f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Este trabalho pesquisou os principais efeitos de extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* (EJ), na fagocitose e morte de *Candida albicans*, na produção de TNF- α e envolvimento com a sobrevivência dos animais a um inóculo letal do fungo. Os macrófagos de animais pré-tratados com EJ por 72 h foram co-incubados 1:5 leveduras de *C. albicans* (CR15) por 30 minutos a 37°C. A eficiência fagocítica foi de 68% de macrófagos fagocitantes na presença de soro, cuja atividade fungicida reduziu 76% do inóculo de *C. albicans*. Esta ativação dos fagócitos pode ser explicada pelo aumento significativo na produção de anion superóxido comparado ao de fagócitos de animais controle (PBS). A atividade dos receptores foi pesquisada na presença de Manose (50 mM) e Manana (100 μ g) ou Laminarina (1mg). A eficiência da fagocitose aumentou significativamente (52%) nos macrófagos de camundongos pré-tratados com JE 72 h antes dos ensaios, contra 20% dos macrófagos controle. Este aumento foi reduzido a 34% na presença de bloqueadores do receptor de manose (Manose mais Manana) e para 16% na presença de glucana solúvel (laminarina), um inibidor do receptor Dectina-1. Os macrófagos pré-tratados com JE 72h apresentaram aumento na produção de TNF- α após serem co-incubados com *C. albicans*, por 2h, ação que foi inibida com a presença de laminarina durante os ensaios. Neste trabalho, avaliamos também a ação do EJ na proteção contra candidíase, assim, animais pré-tratados 72h com o extrato, apresentaram aumento na produção de TNF- α após 2h de infecção com *C. albicans* e uma redução na concentração do fungo no exsudato peritoneal, fígado, baço e rim durante este tempo. Estes resultados sugerem que EJ aumentou significativamente os níveis de TNF- α , a atividade dos receptores de Manose, Dectina-1 e de Complemento, sendo estes processos relacionados com maior atividade fagocítica e candidacida, o que possibilitou 90% dos animais tratados com extrato sobreviverem a um inóculo letal de *C. albicans* versus 20% do controle.

Palavras-chave: Artocarpus. Testes microbiológicos. Fungos patogênicos. Microbiologia. *Candida albicans*

LOYOLA, Wagner. **Ação protetora de extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. contra infecção por *Candida albicans* através do aumento das funções de fagócitos.** 2008. 52f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

In this study we analysed the main receptors participating in phagocytosis of *Candida albicans* and candidacidal mechanisms by macrophages from mice pretreated from *Artocarpus integrifolia* seeds extract (jack extract). The animals' macrophages pretreated with EJ for 72 h were co-incubated 1:5 of *C. albicans* CR15 (yeast) for 30 minutes 37°C. The phagocytic efficiency was 68% of macrophages from mice pretreated, in serum non-immune presence, whose fungicidal activity reduced 76% *C. albicans* inoculum. This activation of phagocytic cells can be explained by the significant increase in anion superoxide production comparative by animals control phagocytes (PBS). The receptors activity was investigated in Mannose presence (50mM) and Mannan (100mg) or laminarin (1mg). The phagocytosis efficiency increased significantly (52%) in mice's macrophages of pretreated with EJ 72 h before the assays, against 20% of the macrophages control. This increase was reduced 34% in receptors presence of mannose inhibitors, and from 16% in presence of Dectin-1 inhibitor laminarin. The macrophages pretreated with EJ 72h had presented increase in production of TNF- α after be co-incubated with *C. albicans*, for 2h, action that was inhibited with laminarin presence during the assays. In this work, we also evaluate the EJ action in protection against candidiasis, thus, mice pretreated 72h with extract before the infection, those had presented increase in production of TNF- α 2h of after infection with *C. albicans* and a reduction in fungus concentration in exsudate peritoneal, liver, spleen and kidney during this time. These results suggest that EJ increased significantly the TNF- α levels, receptors Mannose activity, Dectin-1 and Complement, these processes related with increased phagocytic and candidacidal activity and 90% of these mice survived versus 20% of the control.

Keywords: Pathogenic fungi. Microbiology. Artocarpuses. Microbiological assay.

LISTA DE ABREVIATURAS

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

SAPs – Aspartil proteinases

MAT – Matting locus

MTL – Like Matting locus

PMN – Leucócitos Polimorfonucleares

TLR – Receptores Toll Like

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos e Granulócitos

MAPK – Proteína Mitógena Kinase

IFN- γ – Interferon gama

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

PAF – Fator Ativador de Plaquetas

DTH – Hipersensibilidade do Tipo Tardia

JE – Extrato de Sementes de *Artocarpus integrifolia* (Jaca)

Con-A – Concanavalina A

IL-12, 10, 8, 1 β , 6 – Interleucinas 10, 12, 8, 1 β , 6

MHC II – Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II

MR – Receptor de Manose

VCAM – Moléculas de Adesão Celular Vascular

PRR – Receptor de Reconhecimento Padrão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>CANDIDA ALBICANS</i> E CANDIDÍASE	10
1.2 RESPOSTA IMUNE A CANDIDÍASE.....	15
1.2.1 Imunidade Inata	15
1.2.2 Receptores da Resposta Imune Inata	16
1.3 CÉLULAS EFETORAS	18
1.3.1 Células Dendríticas.....	18
1.3.2 Neutrófilos	19
1.3.3 Macrófagos	20
1.4 IMUNIDADE ADAPTATIVA	22
1.5 EXTRATO DE SEMENTES DE <i>ARTOCARPUS INTEGRIFÓLIA</i>	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
ARTIGO: Protection against <i>Candida albicans</i> infection by an extract of <i>Artocarpus integrifolia</i> seeds through enhanced phagocyte functions	40
Abstract.....	40
Introduction	41
Materials and methods.....	41
Results	43
Discussion.....	44
References	45
Fig. 1.....	47

Fig. 2.....	48
Fig. 3.....	49
Fig. 4.....	50
Fig. 5.....	51
Table 1.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Candida albicans* E CANDIDÍASE

A importância das doenças fúngicas aumentou nas últimas três décadas, devido principalmente, ao aumento da população de indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), transplantados e portadores de câncer (ROMANI, 2004; DAVIES et al., 2006).

As espécies de *Candida* em condições predisponentes podem expressar fatores de virulência causando doenças conhecidas como candidíases (HUBE & NAGLIK, 2001). As doenças causadas por esse fungo, podem variar desde infecções superficiais de pele e mucosa até formas sistêmicas chamada de candidemia, podendo atingir órgãos profundos (ODDS, 1988; ODDS 1994; CALDERONE & FONZI, 2001).

Candida são microrganismos integrantes da microbiota bucal do homem desde o nascimento. Esta condição microbiológica propicia comumente uma relação de equilíbrio entre o fungo e o hospedeiro, diante da manutenção da integridade das barreiras teciduais, relação harmônica da microbiota autóctone e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, havendo em contrapartida por parte do fungo permanência equilibrada da capacidade de aderência e de produção de toxinas e enzimas (CALDERONE & FONZI, 2001).

Das espécies pertencentes ao gênero *Candida*, a que mais causa infecções é a *C. albicans*. Este fungo é dimórfico oportunista, frequentemente isolado na cavidade oral, sistema digestório e vagina de humanos e vários mamíferos (DIGNANI et al., 2003). Pode variar sua forma de leveduriforme para filamentosa, sendo que durante este processo pode apresentar as formas intermediárias de tubo germinativo e pseudo-hifa. Outras espécies não *C. albicans*, como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* entre outras, também tem capacidade de se tornarem patogênicas (ODDS, 1994; ROILIDES et al., 1999; PAUL et al., 2007). Tanto as formas leveduriformes como as filamentosas estão presentes nos sítios de infecção, sugerindo que ambas contribuem para a patogenicidade do fungo (MITCHELL, 1998; CLEMONS & STEVENS, 2001; HUBE & NAGLIK, 2001; DIGNANI et al., 2003).

A maior frequência das infecções ocorre no tegumento, como: da pele, das unhas e das mucosas do trato gastrointestinal, oral ou a vaginal. Cerca de 70% das mulheres saudáveis terão algum caso de candidíase vaginal durante a vida, e 5% terão infecções recorrentes (SOBEL et al. 1988; SOBEL et al., 1992). Porém, nos indivíduos com resposta imune deprimida por câncer, transplantados ou com procedimentos cirúrgicos, este fungo poderá causar candidíase sistêmica, podendo levá-los à morte. Aproximadamente 85% dos pacientes portadores do vírus HIV terão pelo menos um caso de candidíase orofaríngea (BORG-VON ZEPPELIN et al., 1999).

A limitação de nutrientes no tecido hospedeiro é um fator importante para a atividade do patógeno. O microrganismo deve estar apto a realizar suas reações de catabolismo e anabolismo, para poder sobreviver como um saprófita ou como um patógeno, na superfície dos tecidos do hospedeiro. Quanto maior a expressão de genes que regulam estas duas vias, mais competente será o patógeno. Desta forma *C. albicans* é capaz de crescer em extremos fisiológicos de pH. Devido a esta habilidade este fungo pode causar infecções tanto na corrente sanguínea, onde o pH é neutro, como na superfície de mucosas com pH ácido (CALDERONE & FONZI, 2001). Portanto, *C. albicans* está constituída geneticamente para se adaptar e sobreviver em diferentes locais do organismo hospedeiro, capacidade que envolve fatores essenciais, tais como moléculas de aderência do fungo a matriz extracelular do tecido hospedeiro, a produção de fosfolipase, protease e elastase que podem lesar e impedir as defesas do hospedeiro (ROMANI, 2004). Em princípio, a principal ação do microrganismo é sobreviver e reproduzir, sendo que, a morte ou danos severos ao hospedeiro, constitui efeitos colaterais (HUBE & NAGLIK, 2001).

A aderência às células do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e um passo essencial no estabelecimento de infecções. Neste processo, ocorre a combinação de mecanismos específicos (adesinas) e não específicos (forças eletrostáticas, agregação e hidrofobicidade) (COTTER & KAVANAGH, 2000; ANDRE et al., 2004). De acordo com Masuoka et al. (1999), leveduras com características mais hidrofóbicas aderem-se com mais facilidade às células epiteliais, proteínas da matriz extracelular e plástico, e são mais resistentes à fagocitose. A fração protéica das manoproteínas, provavelmente, determina o padrão de hidrofobicidade da parede celular, como demonstrado em estudos com anticorpos. As formas filamentosas de *C. albicans* têm superfície mais hidrofóbica que as leveduriformes.

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura complexa e responsável pela manutenção da forma celular, gradiente osmótico e regulação da permeabilidade. É formada por

várias camadas, e seu peso seco compõe-se de 47-60% de beta glucanas (β 1-3; β 1-6) e 10% de quitina, imersas em matriz amorfa de polímeros de manose, as mananas (aproximadamente 40% do peso seco), associadas covalentemente a proteínas em ligações N e O glicosídicas. Além disso, a parede celular contém proteínas (6 a 25%) e uma porcentagem de lipídios (1 a 7%).

A produção de aspartil proteinases (SAPs) constitui um importante fator de virulência. Estas enzimas são codificadas por um grupo de dez genes, sendo que cada enzima SAP é codificada por um par de genes desta família gênica. As diferentes SAPs são expressas em diferentes condições de crescimento em laboratório e durante infecções experimentais *in vivo* e *in vitro*. A contribuição das SAPs para a patogênese da *C. albicans* tem sido demonstrada claramente com a utilização de mutantes deficientes nestas enzimas e de inibidores de proteinases (HUBE & NAGLIK, 2001). O fungo utiliza estas enzimas como artifício para obtenção de nutrientes degradando estruturas do hospedeiro (imunoglobulinas, colágeno, albumina, queratina), além de utilizá-las na evasão da resposta imune (De ANDRADE & FELIPE, 1992; BORG-VON ZEPPELIN et al., 1998; KOELSCH et al., 2000; Dos SANTOS et al., 2002).

A deleção de genes que codificam SAP1, SAP2 ou SAP3, de isolados de *C. albicans* resultou em menor dano ao organismo do hospedeiro (SCHALLER et al., 1999), menor aderência às células epiteliais bucais (WATTS et al., 1998) e menor virulência no modelo de vaginite em ratos DE BERNARDIS et al., 1999). Nas infecções de mucosas a SAP3 foi considerada a mais importante, enquanto em infecções profundas este papel é desempenhado pelas SAPs 4 e 6, as SAPs 7 e 8 também são importantes durante as infecções (NAGLIK et al., 2003).

A virulência do fungo *C. albicans* não depende apenas de seu repertório genético, mas também da condição imunológica do hospedeiro o qual desempenha papel fundamental na progressão da doença (MITCHELL, 1998; MARTINEZ-SANCHEZ & PEREZ-MARTINS, 2001). Estudos epidemiológicos demonstraram que patógenos deste grupo passaram de oitavo lugar em causas de infecções nosocomiais, para quarto lugar. Este fato se deve principalmente ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos ou submetidos a processos invasivos tais como aidéticos, transplantados, pacientes com ventilação artificial, em uso de cateter venoso central ou alimentação parenteral (SENET, 1997; HUBE & NAGLIK, 2001). O uso de drogas imunossupressoras tais como, corticosteróides e drogas citotóxicas, utilizadas em pacientes leucêmicos, portadores de linfoma ou outros tumores, assim como o uso

prolongado e indiscriminado de antibióticos de amplo espectro e utilização de técnicas invasivas que abrem brechas para a invasão do fungo são fatores predisponentes.

Formas de reprodução sexuadas não eram observadas em laboratório ou em isolados clínicos. A população de *C. albicans* era vista como uma grande estrutura clonal, indicando predominantemente um modo assexuado de reprodução. O locus do genoma do fungo *S. cerevisiae* que continha os genes responsáveis pela reprodução sexuada foi chamado de mating (MAT) locus e a região homóloga em *C. albicans* foi chamada de mating-type-like (MTL) (JOHNSON, 2003). O locus em *C. albicans* (9kb) é muito maior do que em *S. cerevisiae* (0,7kb) e contém muito mais genes. Em princípio, este tipo de reprodução poderia gerar o aumento da diversidade genética durante um processo infeccioso. Porém, nem todos os fungos resultantes desta variação genética sobreviveriam às condições encontradas no hospedeiro. Esta idéia pode contribuir para o entendimento da estrutura clonal e da alta taxa de reprodução sexuada encontrada em laboratório (JOHNSON, 2003).

C. albicans ao longo da história tem sido descrita como agente de doenças em humanos. Hipócrates, Galen e Samuel Pepys já descreviam sintomas semelhantes aos das infecções por este fungo. Porém, não existia em qualquer língua um termo técnico que definisse a candidíase, atestando e difundindo seu reconhecimento (ODDS, 1988; CALDERONE, 2002). Depois de vários anos a confusão taxonômica foi resolvida pelo projeto de classificação codificado em 1923, definindo como *Candida albicans*. O nome deriva de Toga Candida, do latim a expressão do manto branco que identificava os candidatos ao senado romano, e albicans, gramaticamente devido à cor branca das lesões provocadas pelo fungo (ODDS, 1988).

Nos últimos anos vem ocorrendo aumento no número de relatos das infecções invasivas causadas por *Candida* ssp. Em 1963 conheciam-se apenas cinco espécies de *Candida* como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*. Atualmente, são conhecidas em torno de vinte espécies pertencentes ao gênero *Candida*, capazes de causar micoses, sendo estas espécies de maior interesse clínico (DIGNANI, 2003).

O estudo da história natural de pacientes com candidemia mostra que parte dos episódios de fungemia tem caráter transitório e autolimitado, particularmente em indivíduos não neutropênicos. Entretanto, não há dados clínicos e laboratoriais que permitam identificar com segurança, quais episódios serão apenas transitórios e quais acarretarão quadro de candidíase

hematogênica disseminada com invasão do tecido de vários órgãos e sepse (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Segundo Colombo (2000), outro aspecto relevante é que em alguns pacientes as complicações infecciosas, documentadas em vísceras, aparecem semanas ou meses após o episódio de candidemia como acontece com rinites e meningite causadas por *Candida* ssp. Quando presente, a disseminação aguda da candidemia para órgãos (fígado, rim e pulmões), pode também acometer pele e globo ocular. O padrão clínico mais freqüente de apresentação da candidemia em adultos, resulta na presença de febre em pacientes com antibioticoterapia. A febre pode ter início insidioso, ou apresentar-se de forma súbita, acompanhada de calafrios, mialgia, taquicardia e hipotensão (DIGNANI et al., 2003).

Endoftalmites podem ocorrer em cerca de 10 a 30% dos casos, sendo esta variação dependente das condições do hospedeiro (DIGNANI et al., 2003). *C. albicans* pode infectar as estruturas oculares por disseminação hematogênica ou por inoculação direta, durante cirurgia ocular. Os sintomas incluem perturbações visuais, escotomas e dor bulbar. As anormalidades são caracterizadas por lesões na retina e no humor vítrio, manchas de Roth e uveíte. Todas as estruturas oculares podem ser afetadas, porém quando ocorrem endoftalmites a terapia é difícil e a incidência de seqüelas é alta (DIGNANI, 2002).

Segundo Carstedt et al. (2002), existe uma prevalência de fungos do gênero *Candida* na cavidade bucal de crianças e adolescentes com síndrome de Down. Nessas crianças, além das alterações anatômico-fisiológicas bucais, macroglossia, estagnação salivar decorrente da incompetência muscular da boca, dificuldades motoras, constantes doenças respiratórias e comprometimento simultâneo das respostas imunológica inata e adquirida, estes fatores adicionais às tornem mais suscetíveis a processos infecciosos, incluindo os fúngicos, sendo as espécies de *Candida* são os agentes etiológicos mais preponderantes (RONCARIO et al., 2002). Agrega-se ainda a esta situação, a resposta imune celular e humoral. Linfócitos T e células NK possuem suas atividades funcionais afetadas, nessas crianças. Níveis baixos de imunoglobulinas IgG₂ e IgG₄ favorecem infecções microbiológicas, além da irregularidade fisiológica da peróxido-dismutase comprometendo a defesa orgânica contra microrganismos (RIBEIRO et al., 2002).

O envolvimento de sistema nervoso central ocorre com grande freqüência em prematuros que desenvolvem candidemia. Nesta população, a investigação de meningite em caso

de candidemia é prioritária. Em adultos, a meningite por *Candida* ssp é geralmente decorrente de contaminação durante procedimento neurocirúrgico, sendo poucas vezes documentadas como complicação de candidemia. Entretanto, segundo dados obtidos em série de necropsias, pacientes com sepse por *Cândida* ssp que evoluem para óbito apresentam lesões fúngicas no sistema nervoso central em até 20% dos casos (FILLER & KULLBERG, 2003).

A antibioticoterapia prolongada e a quimioterapia podem causar modificações na microbiota das mucosas, além de diminuir o número de leucócitos circulantes levando à proliferação de *C. albicans* (HUBE, 2004; DAVIES et al., 2006). Os corticoterápicos promovem modificações na rede de citocinas podendo afetar polimorfonucleares (PMN), macrófagos e as principais atividades das células T prejudicando assim, a atividade antifúngica (NOHMI et al., 1994; DAVIES et al., 2006).

O cateterismo pode causar lesões no tegumento e promover um substrato para o desenvolvimento do fungo. Uma vez dentro do vaso sanguíneo o patógeno pode ser rapidamente recoberto por fibronectina, plaquetas e outros constituintes do sangue. Estes fatores se constituem em suporte para a colonização e proliferação do microorganismo, podendo ainda formar biofilmes sobre superfícies plásticas como próteses dentárias, cateteres e sondas urinárias, impedindo a ação dos antifúngicos (SENNET, 1997, COLOMBO et al., 2006; PHALLER & DIEKEMA, 2007), além de dificultar o reconhecimento do fungo pelo sistema imune inato (STICKLER & McLEAN, 1995).

1.2 RESPOSTA IMUNE A CANDIDÍASE

1.2.1 Imunidade Inata

Os mecanismos de defesa do hospedeiro podem influenciar tanto na manifestação, como na severidade das infecções fúngicas. Deste modo, a forma clínica da doença dependerá da resposta imune do paciente. Os mecanismos e a capacidade de defesa dos organismos multicelulares contra o fungo evoluíram de sistema mais simples (imunidade inata),

até mecanismos mais sofisticados (imunidade adaptativa) de defesa dos hospedeiros vertebrados (ROMANI, 2004).

As defesas antifúngicas inatas dos mamíferos são mediadas por células, receptores celulares e vários fatores humorais. Fagócitos profissionais como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas possuem papel fundamental nesta defesa. Porém células NK, linfócitos T e células não hematopoiéticas, tais como células endoteliais e epiteliais, também participam no combate ao fungo (ROMANI et al., 2002). Esta resposta possui dois papéis principais: ação antifúngica efetora levando a destruição do patógeno, por uma resposta imediata às partículas fúngicas ingeridas, ou secreção de mediadores pró-inflamatórios, influenciando a resposta imune adaptativa (VILLAMÓN et al., 2004). A atividade das células do sistema imune inato pode ser ampliada através das de quimiocinas e citocinas ou anticorpos (ROMANI, 2004; AKIRA et al.; 2006).

1.2.2 Receptores da resposta imune inata

Os mecanismos de defesa do hospedeiro são ativados após a infecção, e sua ativação depende de um grupo de moléculas expressas constitutivamente pelo patógeno, que são reconhecidos por um grupo de receptores que fazem o reconhecimento de moléculas padrões e incluem os receptores de manose, receptores tipo “Toll” e receptores Dectina-1 (ROMANI, 2004, BROWN, 2006). Após as interações com as moléculas padrões do patógeno, as células do sistema imune do hospedeiro iniciam um amplo espectro de mecanismos de defesa tais como a produção de peptídeos antimicrobianos e a produção de uma rede de citocinas e quimiocinas, o que resulta no desenvolvimento de uma resposta inflamatória e na resistência à infecção (AKIRA et al., 2006).

Receptores de manose reconhecem grande variedade de carboidratos (manose, fucose, N-acetilglucosamina e glucose) presentes na superfície de microrganismos. Estes receptores são expressos principalmente em macrófagos e células dendríticas, sendo especialmente importante na fagocitose de *C. albicans* e promovem uma ligação entre as respostas imune inata e adaptativa. A expressão aumentada de receptores de manose ocorre

devido ao fator estimulador de colônia-macrófago (M-CSF) (KARBASSI et al., 1987) e interferon- γ (IFN- γ) (MARÓDI & JOHNSTON, 1993), o que tem melhorado a capacidade fagocítica e candidacida de macrófagos (APOSTOLOPOULOS & McKENZIE, 2001). Yamamoto et al. (1997) demonstraram que a fagocitose de levedura de *C. albicans* através do receptor de manose resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), degradação do fungo e estímulo de moléculas co-estimulatórias, moléculas do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC II) e ativação de resposta celular protetora Th1.

Os receptores TLR-2 (receptor para fosfolipomanana) e TLR-4 (receptor para lipopolissacarídeo e manana) são proteínas de membrana expressas na superfície de muitas células (ATHMAN e PHILPOTT, 2004), sendo os principais receptores envolvidos na defesa antifúngica (LEVITZ, 2004; POULAIN & JOUAULT, 2004; VILLAMÓN et al., 2005). Durante a fagocitose os receptores TLR-2 e TLR-4 são ativados, através da sua ligação com componentes das paredes celulares dos microrganismos, e recrutados para os fagossomos (UNDERHILL et al., 1999; BLANDER & MEDZHITOV, 2006). A maturação do endossomo é mediada por sinais gerados por receptores TLR, e transmitido ao núcleo do fagócito através da proteína adaptadora MyD88 e da proteína mitógena Kinase (MAPK) p38, que resultam na ativação do fator NF- κ B e subsequente transcrição de genes de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (GIL e GOZALBO, 2006).

A diferença no padrão de citocinas sintetizadas pode ser explicada através da falha no envolvimento do receptor Dectina-1 para o reconhecimento de hifa, uma vez que a β -glucana encontra-se encoberta na forma filamentosa, enquanto que na forma leveduriforme devido à cicatriz deixada exposta pelo brotamento, que é rica em β -glucana, ocorre a interação com Dectina-1 (GANTNER et al., 2005). A cooperação entre receptores para β -glucanas (Dectina-1) e resíduos manosilados pelo receptor TLR-2, é responsável pela síntese de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ (NETEA et al., 2006). O receptor Dectina-1 é expresso principalmente em células de linhagem mielóide e reconhece especificamente resíduos de β -glucana (BROWN & GORDON, 2001; BROWN, 2002; TAYLOR et al., 2002).

1.3 CÉLULAS EFETORAS

1.3.1 Células Dendríticas

A localização estratégica das células dendríticas nos tecidos, superfície de mucosas e pele sugere que estas células são as primeiras a iniciar uma resposta protetora contra *C. albicans*. Estas células possuem uma atividade de apresentação de antígenos maior que as do macrófago (NEWMAN & HOLLY, 2001). Quando imaturas, capturam uma molécula estranha e migram ao órgão linfóide secundário mais próximo onde fazem a apresentação do antígeno ao linfócito específico, influenciando na diferenciação de células precursoras em linfócitos Th1 (AUSTYN, 1992; ROMANI, 2004).

As células dendríticas possuem a capacidade de internalizar diferentes tipos morfológicos de fungos, tanto a forma leveduriforme como filamentosa de *C. albicans*. O reconhecimento e fagocitose de leveduras ocorrem principalmente por meio de receptores de manose (MR), DC-SIGN e em parte CR3. Por outro lado a fagocitose de hifas ocorre de um modo mais convencional (tipo zíper) e envolve a ação cooperativa de FcγR e CR3 (ROMANI et al., 2002; ROMANI, 2004). A fagocitose de ambas as formas pelas células dendríticas não requer TLR-2, TLR-4, TLR-9 ou MYD88 (BELLOCCHIO et al., 2004).

A interação de células dendríticas e o fungo através de diferentes receptores resultam em formas diferentes de sinalização e conseqüentemente diferentes perfis de citocinas. O reconhecimento de leveduras de *C. albicans* através de MR promove a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC de classe II. A ligação de células dendríticas com hifas opsonizadas, através de C3b ou anticorpos, leva à produção de citocinas IL-4 e IL-10, aumento da expressão de moléculas MHC II e ativação de células Th2 (ROMANI, 2004).

1.3.2 Neutrófilos

Neutrófilos desempenham um importante papel na prevenção de doenças fúngicas em hospedeiro vertebrados. Alterações nas funções deste fagócito facilitam a disseminação de *C.albicans* (WALSH et al., 1990; FRADIN et al., 2005). Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos invasivos. Porém, *in vivo*, o papel dos reagentes oxidativos produzidos por estes fagócitos não está bem determinado. A mieloperoxidase (MPO) uma enzima produzida por neutrófilos, catalisa reações do peróxido de hidrogênio com o íon cloro para produzir o ácido hipocloroso, que é utilizado pelos fagócitos para matar microrganismos (PHAM, 2006). Animais nocaute em MPO (MPO-KO) apresentaram uma redução significativa na sua atividade candidacida, indicando que o sistema oxidativo dependente da MPO é um importante mecanismo de defesa. Loyola et al. (2002), demonstraram que a adição de catalase, além de degradar H_2O_2 impede a sua utilização pela MPO, diminuindo consideravelmente a capacidade candidacida de neutrófilos e depuração do fungo dos órgãos infectados.

Indivíduos com doença granulomatosa crônica apresentam sinais clínicos precoce de candidíase (ARATANI, 2006). Neutrófilos possuem ainda mecanismos microbicidas não dependentes de oxigênio. Estes mecanismos envolvem as enzimas lisossomais, que são muito importantes nos tecidos onde a concentração de oxigênio é baixa e a cadeia respiratória não pode funcionar efetivamente. Dentre as hidrolases lisossomais podemos citar as peroxidases como a lactoperoxidase (TAYLOR et al., 2005).

Uma importante ação imunoregulatória tem sido atribuída aos neutrófilos, células que estão envolvidas com a produção de citocinas tais como IL-10 e IL-12. Neutrófilos podem produzir IL-12 bioativa, que é capaz de induzir a diferenciação de linfócitos precursores em linfócitos do grupo Th1 com ação antifúngica (CASSONE et al., 1997; MENCACCI et al., 1998 a; CENCI et al., 1998). Estudos demonstraram que a produção de IL-10 ocorre em infecção por cepas virulentas, e a neutralização de IL-10 pode promover aumento na resistência a *C. albicans* (ROMANI, 2004). Gasparoto et al. (2004), demonstraram que a infecção por *C. albicans* (CR1) induziu a apoptose de fagócitos e promoveu aumento nos níveis de IL-10 depois de 24 h de infecção, tempo em que ocorreu o aumento de neutrófilos no exudato peritoneal. O

tratamento de *C. albicans* com pepstatina (inibidor de proteinase) previniu o processo de apoptose e reduziu significativamente a produção de IL-10, sugerindo que o aumento da produção de citocina foi decorrente da ação de enzimas produzidas pelo fungo.

A presença de neutrófilos no local da infecção por pré-tratamento de camundongos com Con-A 6 h antes da infecção com *C. albicans*, aumentou a população de neutrófilos peritoneais, resultando em uma maior depuração do fungo na cavidade peritoneal, confirmando a importância desta população de fagócitos na defesa contra infecções fúngicas (LOYOLA et al. 2002).

1.3.3 Macrófagos

As respostas anti fúngicas pelas células efetoras incluem morte e inibição de crescimento do fungo. Em geral as células fagocíticas possuem atividade antifúngica intrínseca que pode ser potencializada por opsoninas (anticorpos, C3b, iC3b) ou citocinas derivadas de células T, o que indica que as respostas imune inata e adaptativa não funcionam de forma independente, mas são reciprocamente reguladas (ROMANI, 2002; HUFFNAGLE, DEEPE, 2003).

A ativação dos macrófagos residentes confere ao hospedeiro maior resistência a infecções. Um macrófago ativado difere do residente em vários aspectos, como mudanças morfológicas, expressão de receptores na superfície celular, com aumento de reagentes oxidativos (H_2O_2 , O_2^- , OH^-) e nitrogenados (NO^-), e conseqüentemente um aumento da atividade microbicida e produção de citocinas. Em geral, macrófagos ativados fagocitam e matam microrganismos mais eficientemente que macrófagos residentes. *In vivo*, a ativação de macrófagos ocorre principalmente através da interação com linfócitos T e é mediado por citocinas tais como interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) que podem estimular outras células ou os próprios macrófagos em uma atividade autócrina (MARÓDI et al., 1991; LANGERMANS et al., 1992; MURPHY et al., 1998).

A citocina IFN- γ é essencial para a resistência a infecções fúngicas. Pode ativar as funções fungicidas de macrófagos, restabelecendo a resposta imune celular em indivíduos imunodeprimidos (VÁSQUEZ-TORRES & BALISH, 1997). Macrófagos e neutrófilos ativados por IFN- γ podem produzir a interleucina 12 (IL-12), que é indicadora da resposta protetora contra infecções fúngicas, além de ser necessária para uma resposta celular eficiente (CENCI et al., 1998; KASHINO et al., 2000). A adição de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ inibiu a produção de NO $^{\cdot}$, diminuindo a atividade anti-fúngica dos macrófagos (ROACH & BLACKWELL, 1992; NASCIMENTO et al., 2002; FILLER et al., 2005).

TNF- α desempenha papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans*. Esta citocina é produzida em resposta a infecções fúngicas, principalmente por macrófagos, e estimula a síntese de quimiocinas e moléculas de adesão por estes fagócitos (as quais são essenciais para o recrutamento de neutrófilos), além de possuir ação estimuladora sobre a atividade candidacida destas células. Em camundongos o aumento na produção de TNF- α ocorre durante as primeiras 12 h após a infecção e está correlacionado ao acúmulo de grande número de leucócitos no sítio da infecção (CANNOM et al., 2002; FILLER et al., 2005). Camundongos deficientes em TNF- α e linfotoxinas desenvolvem uma resposta Th2 para as infecções por *C. albicans* e apresentam altos níveis de IL-4 e IL-10 (MARINO et al., 1997; MENCACCI et al., 1998). A sobrevivência dos animais TNF/LT $^{-/-}$ foi menor e correlacionada a um aumento do fungo nos órgãos (NETEA et al., 1998), enquanto os camundongos heterozigotos (TNF/LT $^{+/-}$) com fenótipo intermediário tiveram uma taxa de mortalidade de 60% em 20 dias de infecção. Em outros estudos a neutralização do TNF- α através da utilização de anticorpos policlonais anti-TNF- α murino causou o crescimento do fungo no rim e baço e acelerou a morte após infecção endovenosa (LOUIE et al., 1994; FILLER et al., 2005).

Conchon-Costa e colaboradores (2007), demonstraram que camundongos pré-tratados com Con-A apresentaram aumento na produção de TNF- α 2 h após a infecção por via intraperitoneal, quando comparado aos animais controle. A elevação precoce na produção de TNF- α demonstra o aumento da capacidade de síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos fagócitos peritoneais tratados com a lectina, fato que aumentou a resistência à infecção fúngica. Esta ativação resultou na taxa de sobrevivência de 100% dos animais pré-tratados em relação aos controles, quando expostos a um inóculo letal e diminuiu a concentração de *C. albicans* nos órgãos (baço fígado e rim) no decorrer da infecção.

A citocina TNF- α pode estimular também a expressão de outras moléculas envolvidas na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans*. Entre estas moléculas incluem-se as moléculas de adesão E-selectinas e VCAM-1, IL-8, fator ativador de plaquetas (PAF) que estão relacionadas à adesão e do recrutamento de leucócitos. IL-8 além de ser um potente fator quimiotático para neutrófilos, que inicia a ativação destes fagócitos aumentando a sua capacidade candidacida (FILLER et al., 2005, OROZCO et al., 2000).

A atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos podem ser estimuladas também pela ação de lectinas de origem vegetal. É o caso da concanavalina A (Con-A), que atua sobre linfócitos aumentando sua secreção de IFN- γ (BERTRAM et al., 1997) e da KM⁺, obtida da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*), que atua diretamente sobre as células fagocíticas aumentando a secreção de IL-12 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

Estudos demonstraram que o pré-tratamento com lectinas aumentou significativamente o número de fagócitos na cavidade peritoneal de camundongos, e da capacidade candidacida dessas células, além da expressão de receptores de manose (FELIPE et al., 1995; GAZIRI et al., 1999; LOYOLA et al., 2002; CONCHON-COSTA et al., 2007). A associação destas ações sobre os fagócitos peritoneais de camundongos pré-tratados com Con-A 96 h antes da infecção resultou na eliminação de 80% do inóculo de *C. albicans* e na expressão máxima dos receptores de manose (LOYOLA et al., 2002). A fagocitose foi inibida em 50% após a adição de manana (50 μ g) e manose (50mM), sugerindo que esta atividade teve a participação dos receptores de manose (GAZIRI et al., 1999).

1.4 IMUNIDADE ADAPTATIVA

A resistência a candidíase está correlacionada com a detecção de resposta imune celular e a presença de hipersensibilidade tardia (DTH). Observações clínicas sugerem que citocinas Th2 podem ser produzidas em resposta a antígenos de *C. albicans* em diferentes estágios da doença, incluindo infecções sintomáticas e doenças imunológicas. Este fato implica que a produção de citocinas do padrão Th1 está associada a indivíduos sadios e portadores de

leveduras saprófitas, enquanto que a produção de citocinas Th2, está correlacionada com a manifestação da doença fúngica.

Os linfócitos com fenótipo 1 (Th1) produzem as citocinas pró-inflamatórias como interleucina 2 (IL-2) e IFN- γ , e os linfócitos com fenótipo 2 (Th2) produzem citocinas antiinflamatórias como interleucinas (IL)-4, 5, 10 e 13. Pacientes com infecção disseminada apresentam uma resposta imune celular diminuída, anergia de DTH e níveis aumentados de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5), IgE IgG4 e IgA e eosinofilia a qual é um marcador característico para micoses disseminadas. As citocinas Th2 como IL-10 possuem uma relação inversa na produção de citocinas Th1 tais como IL-12 e IFN- γ . Altos níveis de IL-10 estão associados com o bloqueio na produção de IFN- γ e aumento na suscetibilidade a candidíase sistêmica (CALICH et al., 1998).

O predomínio de células Th1 pode resultar na produção de citocinas que estimulam a atividade citotóxica das células efectoras, enquanto que as células Th2 produzem citocinas que desativam tais atividades e estimulam a produção de anticorpos. Entretanto, a combinação de citocinas dos diferentes grupos como IFN- γ e IL-4, ou IL-10 e IL-12 é necessária para que ocorra uma proteção eficiente contra a infecção por fungos, indicando a existência de um complexo circuito imunoregulatório (ROMANI et al., 1997; STEVENS, 1998; SPELLBERG & EDWARD Jr, 2001; SU et al., 2007).

1.5 EXTRATO DE SEMENTES DE *Artocarpus integrifolia*

As interações proteína-carboidrato são utilizadas para a comunicação intracelular. As lectinas são proteínas inicialmente identificadas em vegetais, e que se ligam especificamente a uma grande variedade de carboidratos presentes na superfície de células de mamíferos. Devido a esta alta afinidade as lectinas vegetais são utilizadas para identificação, purificação e estimulação de glicoproteínas específicas na superfície de células humanas. A compreensão das bases moleculares da interação lectina-carboidrato e as sinalizações intracelulares envolvidas neste processo prometem o desenvolvimento de novas drogas para o

tratamento de infecções, processos inflamatórios e doenças malignas (SHANMUGHAM et al., 2005).

KM⁺ e jacalina são lectinas extraídas da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*), estruturalmente relacionadas, porém apresentam distintas ações biológicas e especificidade na ligação aos carboidratos. A jacalina liga-se à D-galactose e possui alta afinidade por glicoproteínas que possuam resíduos α -D-galactosil (HORTIN & TRIMP, 1990). KM⁺ liga-se a D-manose e exibem alta afinidade a trissacarídeos presentes no centro de cadeias de oligossacarídeos de glicoproteínas (Man α 1-3[Man α 1-6] Man) (RANI et al., 1999). Rosa et al. (1999) estudaram esta especificidade na ligação a carboidratos apresentada pelas lectinas da semente de *A. integrifolia*, e demonstraram que jacalina e KM⁺ compartilham 52% de homologia. Porém, KM⁺ não sofre clivagem pós-transcricional em duas cadeias, em contraste com a jacalina, conservando um ligante rico em glicina, o qual consegue discriminar a ligação entre manose e galactose. Em termos de ação biológica, jacalina induz a secreção de IL-6 por células monocíticas U937 (TAIMI et al., 1994) e potencializa a resposta humoral a trinitrofenol e *Trypanosoma cruzi* em ratos (ALBUQUERQUE et al., 1999). KM⁺, por sua vez tem sido usado com instrumento para estudar a haptotaxia da migração de neutrófilos em ratos (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994).

A jacalina (JCA) presente no extrato bruto das sementes de *A. integrifolia* possui forte ação mitogênica sobre monócitos e linfócitos T CD4⁺ humanos, porém esta ação não foi observada em células B (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981). Esta lectina é utilizada como diagnóstico e purificação de IgA devido a sua capacidade de ligação específica com cadeias pesadas presentes neste tipo de imunoglobulina (AUCOUTURIER et al., 1981). JCA é uma lectina multimérica capaz de se ligar a moléculas CD4 presentes nas superfícies de células T humanas, sendo que esta ação pode bloquear a ligação do HIV aos linfócitos através da glicoproteína (gp) 120 presente na superfície do vírus (CORBEAU et al., 1990).

Além da ação bloqueadora da ligação de lectina como JCA e moléculas co-estimulatórias CD4, estudos recentes têm demonstrado que a ligação JCA-CD4 pode disparar a sinalização intracelular levando a síntese de citocinas como a interleucina 6 (IL-6) (LAFONT et al., 1997). Taimi et al. (1994) demonstraram, utilizando linhagens de células promielomonocíticas (U937), que a estimulação destas células por JCA produziu dez vezes mais IL-6, do que a estimulação por lipopolissacarídeos bacterianos.

As lectinas são capazes de se ligar a elementos da matriz extracelular como a laminina. A ligação da KM^+ à laminina promove o processo de haptotaxia em modelo *in vivo*, ou seja, promove a atração de leucócitos da corrente sanguínea para os tecidos. Diferente da quimiotaxia, na qual os sinais que atraem os leucócitos estão na forma solúvel, na haptotaxia estes sinais permanecem ligados à superfície de células endoteliais, membrana basal e tecido conjuntivo. A interação de lectinas com laminina pode contribuir para a formação de um gradiente haptotático requerido para a indução da migração dos neutrófilos (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2006).

Estudos demonstraram que KM^+ exerce ação estimulatória na indução da migração de neutrófilos, através do reconhecimento de resíduos de manose presentes nos receptores para quimiocinas CXCR2, expressos na superfície de neutrófilos e monócitos inflamatórios, porém não em macrófagos residentes. Esta interação resulta na ativação de neutrófilos é demonstrado, pelas mudanças morfológicas destas células, acompanhadas da internalização do complexo KM^+ /ligante. A participação de açúcares como ligantes a receptores na superfície de neutrófilos abre novos caminhos para potencializar ou inibir reações inflamatórias (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2006), induzindo efeitos protetores contra patógenos que são susceptíveis a resposta imune mediada por citocinas Th1 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

Uma complexa cooperação de diversos receptores PRR é necessário para a defesa do hospedeiro contra infecção fúngica, envolvendo diversas moléculas na superfície dos fungos que são reconhecidas por receptores na superfície de células da resposta imune inata e que disparam a produção de citocinas e ativação de linfócitos T. Baseado nos conhecimentos prévios utilizamos o modelo de candidíase experimental, para esclarecimento de mecanismos protetores induzidos por lectinas (KM^+ e jacalina), presentes no extrato de semente de *Artocarpus integrifolia*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Ação de extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* na resposta imune de camundongos Swiss, no curso de infecção com *Candida albicans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Subgrupos de camundongos Swiss tratados com PBS ou extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* foram analisados com relação aos seguintes aspectos:

- 1- Efeito do tempo de tratamento com extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* sobre a atividade fagocítica e candidacida de fagócitos peritoneais;
- 2- Produção de anion superóxido por fagócitos após fagocitose de *C. albicans*;
- 3- Atividade de receptores de manose, complemento e receptor Dectina-1 na fagocitose de *C. albicans* e sinalização para a síntese de TNF- α ;
- 4- Concentração de TNF- α produzida por fagócitos peritoneais em ensaios fagocíticos *in vitro* e no sobrenadante de células da cavidade peritoneal e de fígado no curso da infecção.
- 5- Unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado, baço, rim e exsudato peritoneal no curso da infecção com *C. albicans*;
- 6- Sobrevivência dos animais infectados com dose letal de *C. albicans*;
- 7- Análise de atividade de alanina aminotransferase (ALT) no plasma de animais infectados.

3 CONCLUSÃO

O extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* foi eficiente em ativar macrófagos peritoneais murinos aumentando sua capacidade fagocítica e candidacida, sendo que esta ação foi significativamente aumentada nos macrófagos de animais pré-tratados por 48 a 96 h antes dos ensaios fagocíticos. Este aumento está correlacionado com a expressão dos receptores de manose, Dectina-1 e para frações C3b e iC3b do sistema complemento, indicado pelo aumento da porcentagem de células fagocitantes comparado ao controle. Dentre os receptores estudados o receptor para β -glucana (Dectina-1) foi o mais importante no reconhecimento e na internalização de leveduras, o bloqueio deste receptor resultou na diminuição da produção de TNF- α e na porcentagem de macrófagos fagocitantes. Estes resultados sugerem que o receptor Dectina-1 além de fazer o reconhecimento do patógeno, pode estar também relacionado com a sinalização para a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Além desta ação, os fagócitos peritoneais demonstraram maior capacidade de produzir substâncias microbidas tais como anion superóxido, resultando em menor concentração do fungo nos órgãos tais como fígado, baço, rim além da cavidade peritoneal, o que poderia explicar 90% de sobrevivência destes animais ao inoculo letal de *C. albicans* versus 20% do grupo tratado com PBS. Infecções oportunistas são mais freqüentes em pacientes imunocomprometidos, grupo de indivíduos que vem aumentando muito nos últimos anos. A ativação das células efetoras não só aumenta o reconhecimento e a destruição do patógeno, mas também a síntese de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando uma ação imunoregulatória de macrófagos e neutrófilos, sendo que este grupo de citocinas pode induzir a diferenciação de linfócitos T precursores em células do tipo Th1, o que resultaria no aumento da resistência do hospedeiro às infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.** v.2, p.675-680.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. **Cell.** v.124, p.783-801.
- ALBUQUERQUE, D.A.; MARTINS, G.A.; CAMPOS-NETO, A.; SILVA, J.S. (1999). The adjuvant effect to jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.** v.68, p.375-378.
- ANDRE, D.C.; LOPES, J.D.; FRANCO, M.F.; VAZ, C.A.C.; CALICH, V.L.G. (2004). Binding of lamin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Micr. and Infect.** v.6, n.6, p.549-558.
- APOSTOLOPOULOS, V & MCKENZIE, I.F.C. (2001). Role of the Mannose Receptor in the Immune Response. **Curr. Mol. Med.** v.1, p.469-474.
- ARATANI, Y. (2006). Role of Myeloperoxidase in Host defense against Fungal Infection. **Jpn. J. Med. Mycol.** v.47, n.3, p.195-199.
- ATHMAN, R. & PHILPOTT, D. (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. **Curr. Op. Microb.** v.7, n.1, p.25-32.
- AUCOUTURIER, P.; PINEAU, N.; BRUGIER, J.C.; MIHAESCO, E.; DUARTE, F.; SKVARIL, F.; PREUD'HOMME, J.L. (1981). Jacalin: a new laboratory tool in immunochemistry and cellular immunology. **J. Immunol.** v.127, n.2, p.427-429.
- AUSTYN, J.M. (1992). Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. **Semin. Immunol.**, v.4, p.227-236,.
- BELLOCCHIO, S.; MORETTI, S.; PERRUCCIO, K.; FALLARINO, F.; BOZZA, S.; MONTAGNOLI, C.; MOSCI, P.; LIPFORD, G.B.; PITZURRA, L.; ROMANI, L. (2004). TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. **J Immunol.** v.173, p.7406-7415.

BERTRAM, E.M.; JILBERT, A.R.; KOTLARSKI, I. (1997). 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. **Develop. Comp. Immunol.** v.21, n.3, p. 299-310.

BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. (2006). On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. **Nature.** v.7, n.10, p.1029-1035.

BORG-VON ZEPELIN, M.; BEGGAH, S.; BOGGIAN, F.; SANGLARD, D.; MONOD, M. (1998). The expression of the secreted aspartyl proteinases SAP 4 to SAP6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Mol. Microbiol** v.28, n.3, p.543-554.

BROWN, G.D. & GORDON, S. (2001). A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v.413, p.36-37.

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.J.; GORDON, S. (2003). Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. **J. Exp. Medicine**, v.197, n.9, p.1119-1124.

BROWN, G.D. (2006). Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat. Rev. Immunol.** v.6, n.1, p.33-43.

BUNN-MORENO, M.M.; CAMPOS-NETO, A. (1981). Lectins extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): Potent and selective stimulators of distinct human T and B cell functions. **J. Immunol.** v.127, p.427-429.

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

CORBEAU, P.; HARAN, M.; BINZ, H.; DEVAUX, C. (1990). Jacalin, a lectin with anti-HIV-1 properties, and HIV-1 gp120 envelope protein interact with distinct regions of the CD4 molecule. **Clin Exp Immunol.** v.80, n.3, p.420-425.

CALDERONE, R.A.(2002). *Candida* and Candidiasis. ASM PRESS. Washington DC.

CALICH, V.L.; VAZ, C.A.; BURGER, E. (1998). Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.** v.149, p.407-417.

CANNON, R.R.; FRENCH, S.W.; JOHNSTON, D.; EDWARDS, J.E. JR.; FILLER, S.G. (2002). *Candida albicans* stimulates local expression of leukocyte adhesion molecules and cytokines in vivo. **J Infect Dis.** v.186, p.389–96.

CARLSTEDT, K.; COLS, A.C.; DAHLLOFG, ; ERICSSON, B.; BRAATHEN, G.; MODER, R.T. (2002). Oral carriage of *Candida* species children and adolescents with Down's syndrome. **I. J. Pediatric Dentistry.** v.6, p.95-100.

CASSONE, A.; CHIARI, P.; QUINTI, I.; TOROSANTUCCI, A. (1997). A possible participation of polymorphonuclear cells stimulated by microbial immunomodulators in cytokine dysregulated patterns of AIDS patients. **J. Leuk. Biol.** v.62, p.60–66.

CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; FÉ D'OSTIANI, C.; MOSCI, P.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; KOPF, M.; ROMANI, L. (1998). IFN- γ is required for IL-12 responsiveness in mice with *Candida albicans*. **J. Immunol.** v.161, p.3543-3550.

CLEMONS, K.; STEVENS, D.A. (2001). Overview of host defense mechanisms in systemic mycoses and the basis for immunotherapy. **Semin. Respir. Infect.** v.16, p.60-66.

COLOMBO, A.L. (2000). Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: A Brazilian perspective. **Braz. J. Infect. Dis.** v.4, p.113-118.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. (2003). Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* ssp. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.** v.36, n.5, p.599-607.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; da MATA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. (2006). Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.** v.8, p.2816-2823.

CONCHON-COSTA, I.; LOYOLA, W.; GAZIRI, L.C.J.; CUSTÓDIO, L.A.; FELIPE, I. (2007). Low dose of Concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.49, n.3, p.330–336.

COTTER, J.E. & KAVANAGH, K. (2000). Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **Br. J. Biomed. Sci.** v.57, n.3, p.241-249.

DAVIES, A.N.; BRAILSFORD, S.R.; BEIGHTON, D. (2006). Oral candidosis in patients with advanced cancer. **Oral Oncology**. v.42, p.698-702.

De ANDRADE, G.M. & FELIPE, I. (1992). Evidence for the participation of proteinase released by *Candida albicans* in the early killing of peritoneal macrophages *in vitro*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.25, n.2, p.167-174.

DE BERNARDIS, F.; ARANCIA, S.; MORELI, L.; HUBE, B.; SANGLARD, D.; SHAFER, W.; CASSONE, A. (1999). Evidence that members of the secretory aspartyl secretorie genes family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. **J. Infect. Dis.** v.179, n.1, p.201-208.

DIGNANI, M.C. (2002). Epidemiology and pathogenesis of sytemics fungal infections in the immunocompromised host. **J. Antimicrob. Chemother.** v.28, p.1-16.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANISSE, E. (2003). *Candida*, In: ANAISSE, E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A. (eds). **Vet. Medical Micology**, 1^a ed., Churchill Devingstone, Filadélfia, p.195-239.

Dos SANTOS, A.A.; de SÁ, E.A.C.; GAZIRI, L.C.J.; FELIPE, I. (2002). Treatment of serum with supernatants from cultures of *Candida albicans* reduces its serum-dependent phagocytosis. **Braz. J. Microbiol.** v.33, p. 79-83.

FELIPE, I.; BIM, S.; SOMENSI, C.C. (1995). Increased clearence of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pré-treated with concanavalin-A or jacalin. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.28, p.477-483.

FILLER, S.G. & KULLBERG, B.J. Dup-seated *Candida* infections. In: ANAISSEI, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M.A. (eds) (2003). **Rev. Medical Mycology**, 1^a ed., Churchill Livingstone, Filadélfia, p.341-348.

FILLER, S.G.; YEAMAN, M.R.; SHEPPARD, D.C. (2005). Tumor Necrosis Factor Inhibition and Invasive Fungal Infections. **Clin. Infect. Dis.** v.41, p.208–212.

FRADIN, C.; DE GROOT, P.; MacCALLUN, D.; SCHALLER, M.; KILS, F.; ODDS, F.C.; HUBE, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Mol. Microbiol.** v.56, p.397-415.

GANTNER, B.N.; SIMMONS R.M.; UNDERHILL D.M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **EMBO J.** v.24, p.1277-1286.

GASPAROTO, T.H.; GAZIRI, L.C.; BURGER, E.; DE ALMEIDA, R.S.; FELIPE, I. (2004). Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.42, n.2, p.219-24.

GAZIRI, G.; GAZIRI, L.C.J.; KIKUCHI, R.; SCANAVACCA, J.; FELIPE, I. (1999). Phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalina-A activated peritoneal macrophages. **Med. Mycol.** v.37, p.195-200.

GIL, M.L. & GOZALBO, D. (2006). TLR2, but no TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeast and hyphae. **Microb. Infect.** v.8, n.8, p.2299-2304.

HORTIN, G.L.; TRIMPE B.L. (1990). Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: application of jacalin agarose. **Anal. Biochem.** v.188, p.271-277.

HUBE, B. & NAGLIK, J.R. (2001). Possible role of secreted proteinase in *Candida albicans* infections. **Rev. Iberoam. Micol.** v.15, p.65-68

HUBE, B. (2004). From commensal to pathogen: stage-and tissue- specific gene expression of *Candida albicans*. **Current. Op. Microbiol.** v.7, p.336-341.

HUFFNAGLE, G. B. & DEEPE JR, G. S. (2003). Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Current. Op. Microbiol.**, v.6, n.4, p.344-350.

JOHNSON, A. (2003). The biology of matting in *Candida albicans*. **Nat. Rev. Microbiol.** v.1, n.2, p.106-116.

KARBASSI, A.; BECKER, J.M.; FOSTER, J.S.; MOORE, R.N. (1987). Enhanced killing of *Candida albicans* by murine macrophages treated with macrophage colony-stimulating factor: evidence for augmented expression of mannose receptors. **J. Immunol.** v.139, n.2, p.417-421.

KASHINO, S.S., FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L.G. (2000). Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential TH1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- α production. **J. Interf. Cyt. Res.** v.20, n.1, p.89-97.

KOELSCH, G.; TANG, J.; LOY, J.A.; MONOD, M.; JACKSON, K.; FOUNDLING, S.I.; LIN, X. (2000). Enzymic characteristic of aspartic secreted proteases of *Candida albicans*. **Biochim. et Biophys. Acta.** v.1480, n.1-2, p.117-131.

LAFONT, V.; HIVROZ, C.; CARAYON, P.; DORNAND, J.; FAVERO, J. (1997). The Lectin Jacalin Specifically Triggers Cell Signaling in CD4 T Lymphocytes. **Cell. Immunol.** v.181, p.23-29.

LANGERMANS, J.A.M.; NIBBERING, P.H.; VAN DER HULST, M.E.B.; VAN FURTH R. 1992. Macrophage activation by recombinant cytokines. In: Van Furth, R., **Mononuclear Phagocytes.** 1 ed. Kluwer Academic Publishers, p.602-617.

LEVITZ, S.M. (2004). Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes Infect.** v.6, p.1351-1355.

LOUIE, A.; BALCH, A.L.; SMITH, R.P. (1994). Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. **Infect. Immun.** v.62, p.2761-2772.

LOYOLA, W.; GAZIRI, D.; GAZIRI, L.C.J.; FELIPE, I. (2002). Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.33, p.201-208.

MARINO, M.W.; DUNN, A.; GRAIL, D. (1997). Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** v.94, p.8093-8098.

MARÓDI, L.; FOREHAND, J.R.; JOHNSTON Jr., R.B. (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. II. Biochemical basis for the killing of *Candida* by mononuclear phagocytes. **J. Immunol.** v.146, p.2790-2794.

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

MARTINEZ-SANCHEZ; PÉREZ-MARTÍN, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens; *Candida albicans* and *Ustilago maydis* similar inputs, different outputs. **Curr. Opin. Microbiol.** v.4, p.214-221.

MASUOKA, J.; GUANGPIN, W.; GLEE, P.M.; HAZEN, C.K. (1999). Inhibition of *Candida albicans* attachment to extracellular matrix by antibodies which recognize hydrophobic cell wall proteins. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.24, p.421-429.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; DEL SERO, G.; FE` D'OSTIANI, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; TRINCHIERI, G.; ADORINI, L.; ROMANI, L. (1998a). IL-10 is required for development of protective CD41 T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. **J. Immunol.** v.161, p.6228-6237.

MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; CENCI, E.; FE D'OSTIANI, C.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; KOPF, M.; ROMANI, L. (1998b) IL-4 is required for development of protective CD41 T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. **J. Exp. Med.** v.187, p.307-317.

MITCHELL, A.P. (1998). Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. **Current. Opin. Microbiol.** v.1, n.6, p. 687-692.

MURPHY, G.M.; YANG, L.; CORDELL, B. (1998). Macrophage Colony-stimulating Factor Augments β -Amyloid-induced Interleukin-1, Interleukin-6, and Nitric Oxide Production by Microglial Cells. **J. Biol. Chem.** v.273, n.33, p. 20967-20971.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.67, n.3, p. 400-28.

NASCIMENTO, F.R.F.; CALICH, V.L.G.; RODRIGUÉZ, D.; RUSSO, M. (2002). Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: Essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.** v.168, p.4593-4600.

NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W. (1998). Lipopolysaccharide-induced production of tumour necrosis factor and interleukin-1 is differentially regulated at the receptor level: the role of CD14-dependent and CD14-independent pathway. **Immunol.** v.94, n.3, p.340-344.

NETEA, M.G.; GOW, N.A.R.; MUNRO, C.A.; BATES, S.; COLLINS, C.; FERWERDA, G.; HOBSON, R.P.; BERTRAM, G.; HUGHES, H.B.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; BUURMAN, E.T.; GIJZEN, K.; WILLIAMS, D.L.; TORENSMA, R.; McKINNON, A.; MacCALLUM, D.M.; ODDS, F.C.; van DER MEER, J.W.M.; BROWN, A.J.P.; KULBERG, B.J. (2006). 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.

NEWMAN, S.L. & HOLLY, A. (2001). *Candida albicans* Is Phagocytosed, Killed, and Processed for Antigen Presentation by Human Dendritic Cells. **Infect. Immun.** v.69, n.11, p.6813-6822.

NOHMI, T.; ABE, S.; DOBASHI, K.; TANSO, S.; YAMAGUSHI, H. (1994). Suppression of anti-*Candida* activity of murine and human neutrophils by glucocorticoids. **Microbiol. Immunol.** v.38, n.12, p.977-982.

ODDS, F.C. (1988). ***Candida and candidosis***. 2nd ed. London: Bailliere Tindall.

ODDS, F.C. (1994). Presential address: *Candida albicans*, the life and times of pathogenic yeast. **J. Med. Vet. Mycol.** v.32, n.1, p.1-6.

OROZCO, A.S.; ZHOU, X.; FILLER, S.G. (2000). Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. **Infect. Immun.** v.68, p.1134-1141.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S. (2001). KM⁺, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiol.** v.11, n.12, p.1035-1042.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; MORENO, A.N.; MARQUES, F.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. (2006). Neutrophil activation induced by the lectin KM⁺ involves binding to CXCR2. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1760, n.1, p.86-94.

PAUL, M.; NIELSEN, A. D.; GOLDBERG, E.; ANDREASSEN, S.; TACCONELLI, E.; ALMANASREH, N.; FRANK, U.; CAUDA, R.; LEIBOVICI, L. (2007). Prediction of specific pathogens in patients with sepsis: evaluation of TREAT, a computerized decision support system. **J. Antimicrob. Chemoth.** v.59, p.1204–1207.

PFALLER, M. A. & DIEKEMA, D. J. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clin. Microbiol. Rev.** v.20, n.1, p.133-163.

PHAM, C.T.N. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature.** v.6, p.541-550.

POULAIN, D. & JOUAULT, T. (2004). *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. **Curr. Opin. Microbiol.** v.7, p.342-349.

RANI, P.G.; BACHHAWAT, K.; MISQUITH, S.; SUROLIA, A. (1999). Thermo-dynamic studies of saccharide binding to artocarpin, a B cell mitogen, reveals the extended nature of its interaction with mannotriose [3,6-Di-O-(alpha-D-mannopyranosyl)-D-mannose]. **J. Biol. Chem.** v.274, p.29694-29698.

RIBEIRO, E.L.; CAMPOS, C.C.C.; CRESPO, A.M.C.C.; CASTRO, J.S.; ROCHA, F.P.; ALVES, M.; GOULART, M.S.; CARDOSO, C.; FERREIRA, W.; NAVES, P.L.; SOARES, A.J.; RIBEIRO, S.M.; PIMENTA, F.C. (2002). Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. **Act. Méd. Port.** v.3, p.171-174.

ROACH, T.I.A. & BLACKWELL, J.M. (1992). Priming activation of macrophages for antileishmanial activity: Role of TNF- α and nitric oxide in killing of *Leishmania donovani*. In: Van Furth, R. **Mononuclear Phagocytes**. 1 ed. Kluwer Academic Publishers, p.523-527.

ROILIDES, E.; LYMAN, C.A.; SEIN, T.; GONZALEZ, C.; WLASH, T.J. (1999). Antifungal activity of splenic, liver and pulmonary macrophages against *Candida albicans* and effects of macrophages colony-stimulating-factor. **Med. Mycol.** v.38, p.161-168.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; DEL SERO, G.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. (1997a). An immunoregulatory role for neutrophils in CD41 T helper subset selection in mice with candidiasis. **J. Immunol.** v.158, p.2356–2362.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; DEL SERO, G.; NICOLETTI, I.; TRINCHIERI, G.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. (1997b) Neutrophils production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. **J. Immunol.** v.158, p.5349– 5356.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. (2002). Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Tren. Microbiol.** V.10, n.11, p.508-514.

ROMANI, L. (2004). Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol.** v.4, p.1-23.

ROMANI, L.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; PERRUCCIO, K.; SPRECA, A.; ALLAVENA, P.; VERBEEK, S.; CALDERONE, R.A.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. (2004). The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. **Int Immunol.** v.16, p.149-161.

RONCARIO, A.M.; RODRIGUES, A.B.; ELIAS, M.S. (2002). Síndrome de Down e Odontologia. **Rev. Invest.** v.6, p.70-74.

ROSA, J.C.; OLIVEIRA, P.S.L.; GARRAT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. (1999). KM⁺, a mannose-specific lectin of *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition and analysis of the beta-prism fold. **Protein. Sci.** v.8, p.13-24.

ROTSTEIN, D.; PARODO, J.; TANEJA, R.; MARSHALL, J.C. (2000). Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. **Shock.** v.14, p.278-283.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.; BELTRAMINI, L.; ROQUE-BARREIRA, M.C. (1994). A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J. Immunol.** v.153, p.1798-1807.

SAVILL, J.S.; WYLLIE, A.H.; HENSON, J.E.; WALPORT, M.J.; HENSON, P.M.; HASLETT, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation programmed cell death in the neutrophil leads to recognition by macrophages. **J Clin Invest** v.83, p.865-75.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C.; SCHAFER, W.; BASTERT, J.; CHEN, W.; HUBE, B. (1999). Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Mol. Microbiol.** v.34, n.1, p.169-180.

SENET, J.M. (1997). Risk factors and physiopathology of candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.** v.14, n.6, p.6-13.

SHANMUGHAM, B.; KARP, J.; DRAYER, R.; REYNOLDS III, C.F.; ALEXOPOULOS, G. (2005). Evidence-Based Pharmacologic Interventions for Geriatric Depression. **Psych. Clin. Nort. Amer.** v.28, n.4, p.821-835.

SOBEL, J.D. (1988). Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. **Ann. NY Acad. Sci.** v.544, p.547-557.

SOBEL, J.D. (1992). Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clin. Infect. Dis.** v.14 , n.1, p.8148-8153.

STICKLER, D.J. & McLEAN, R.J.C. (1995). Biomaterials associated infections: the scale of the problem. **Cell Mater.** v.5, p.167-182.

SWEENEY, J.F.; NGUYEN, P.K.; OMANN, G.M.; HINSHAW, D.B. (1998). Autocrine-paracrine modulation of polymorphonuclear leukocyte survival after exposure to *Candida albicans*. **Shock.** v.9, p.146–152.

TAIMI, M.; DORNAND, J.; NICOLAS, M.; MARTI, J.; FAVERO, J. (1994). Involvement of CD4 in interleukin-6 secretion by U937 monocytic cells stimulated with the lectin jacalin. **J. Leuk. Biol.** v.55, n.2, p.214-220.

TAYLOR, P.R.; BROWN, G.D.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S.; WONG, S.Y. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J Immunol.** v.169, p.3876-3882.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H-H; BROWN, G.D.; GORDON, S. (2005). Macrophage Receptors and Immune Recognition. **Annu. Rev. Immunol.** v.23, p.901-944.

UNDERHILL, D.M.; BASSETTI M.; RUDENSKY, A.; ADEREM, A., 1999. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. **J Exp Med.** v.190, p.1909-1914.

VÁSQUEZ-TORRES, A. & BALISH, E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.61, p.170-192.

VILLAMÓN, E.; GOZALBO, D.; ROIG, P.; O'CONNOR, J.E.; FERRANDIZ, M.L.; FRADELIZI, D.; GIL, M.L. (2004). Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. **Micr. Infect.** v.6, n.6, p.542-548.

VILLAMÓN, E.; ROIG, P.; GIL, M.L.; GOZALBO, D. (2005). Toll-like receptor-2 mediates prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*. **Microbil.** v.156, n.1, p.115-118.

VONK, A.G.; WIELAND, C.W.; NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J. (2002). Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* blastoconidia by neutrophils and macrophages: a comparison of different microbiological test systems. **J. Microbiol. Methods.** v.49, p.55–62.

WALSH, T.J.; LEE, J.; AOKI, S.; MECHINAUD, F.; BACHER, J.; LECCIONES, J.; THOMAS, V.; RUBIN, M.; PIZZO, P.A. (1990). Experimental basis for use of fluconazole for preventive or early treatment of disseminated candidiasis in granulocytopenic host. **Rev. Infect. Dis.** v.12, n.3, p.307-S317.

WATTS, H.J.; CHEAH, F.S.; HUBE, B.; SANGLARD, D.; GOW, N.A. (1998). Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. **FEMS Microbiol. Let.** v.159, n.1, p.129-135.

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

ARTIGO

Protection against *Candida albicans* infection by an extract of *Artocarpus integrifolia* seeds through enhanced phagocyte functions.

Wagner Loyola^a, Ivete Conchon-Costa^a, Jean Alcantara Freitas^a, Luis Carlos Jabur Gaziri^b, Auro Nomizo^c, João Santana Silva^c, Ionice Felipe^{a*}. Departments of Pathological Sciences^a and Physiological Sciences^b, Londrina State University, São Paulo State University^c, Brazil.

Abstract

Macrophage activation by an *Artocarpus integrifolia* seed extract protected mice against experimental *Candida albicans* infection. Regarding this protective effect, the receptors for phagocytosis and candidacidal mechanisms was investigated. Peritoneal macrophages were coincubated with *C. albicans* (yeast) for 30 min. Phagocytosis efficiency by macrophages from mice pretreated for three days with jack extract was significantly enhanced, achieving 68% in presence of serum. Phagocytosis in absence of serum was reduced from 52% to 34% ($P < 0.05$) in the presence of mannose plus mannan and from 52% to 16% ($P < 0.01$) in the presence of dectin-1 inhibitor, laminarin, whereas only 20% of control macrophages phagocytosed yeast cells. TNF- α production was significantly greater both *in vitro* and *in vivo* in mice pretreated with jack extract, in relation to assays conducted in the presence of laminarin or controls. *C. albicans* clearance was faster in mice pretreated with jack extract and 90% of these mice survived an otherwise lethal inoculum of this fungus. These data indicate that jack extract enhanced macrophage functions, as shown by the greater participation of complement, dectin-1 and mannose receptors on phagocytosis, the improved capacity to kill the pathogen by triggering TNF- α production and superoxide anion secretion and reducing the fungal burden in organs.

Key words: *Artocarpus integrifolia*, *Candida albicans*, lectin receptors, phagocytosis, TNF α .

Correspondence: Ionice Felipe, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, 86051-990. Tel:+51 43 3371-4267; e-mail:ionice@uel.br

Introduction

Candida albicans causes infection ranging from mucocutaneous to systemic infection in immunocompromised hosts and in patients who undergo major surgical procedures (Garber, 2001). Under such conditions, *C. albicans* express several virulence factors that contribute to pathogenesis, such as adherence to host cells, the ability to form germ-tubes and hyphae, secreted aspartyl proteases and phospholipases and phenotypic switching (Soll, 2002; Calderone & Fonzi, 2001; Vargas et al., 2000).

Neutrophils are extremely important against systemic infection caused by *C. albicans*, as shown by the fact that neutropenic patients are highly susceptible to fungal infection; macrophages also play an important role in the cellular defenses against candidiasis (Lilic et al., 2003; Roilides & Walsh, 2004). Strategies that promote an increase in phagocytic functions have been used. Thus, GM-CSF increases the fungicidal activity of human neutrophils against pseudohyphae and of human monocytes against *C. albicans* blastoconidia and has been used in patients presenting neutropenia after chemotherapy for acute myelogenous leukemia (Buchner et al., 1991). Several proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ are produced by neutrophils, monocytes and macrophages after recognition of molecular patterns on the surface of *C. albicans*. It has been suggested that mannan from *C. albicans* can be recognized by mannose receptors or by TLR4 and that phospholipomannan interacts with TLR2, whereas β -glucans are recognized by a complex of dectin-1 and TLR2, which triggers the induction of microbial killing and constitutes the first step in the activation of the innate immune response (Brown & Gordon, 2003; Gantner et al., 2003; Netea et al., 2006)

Certain biological response modifiers, such as plant lectins, induce cytokine production, among these are those related to the Th1 response, such as interferon- γ (IFN- γ) (Panunto-Castelo et al., 2001) and IL-12 (Muraille et al., 1999). The authors previously observed that pretreatment with concanavalin-A (Con-A) protected the experimental animals against a lethal *C. albicans* inoculum by increasing phagocytosis through complement and mannose receptors (Gaziri et al., 1999; Moresco et al., 2002; Loyola et al., 2002). This process of macrophage activation was dependent on Th1 cells releasing IFN- γ , because Con-A binds directly to carbohydrates in MHC molecules and T cell receptors on T helper cells (Bertranm et al 1997) and presents no direct action on macrophages. TNF- α production was observed after infection with *C. albicans* in the peritoneal cavity, liver and spleen and correlated with decreased fungal burden in the organs, a finding not observed in control mice. Moreover, 100% of mice infected three days posttreatment survived versus 20% of the control group (Conchon-Costa et al., 2007).

In contrast, information concerning immune system activation by an *A. integrifolia* extract is not completely understood. *A. integrifolia* extract is known to contain two lectins, jacalin and KM+. Jacalin induces IL-6 secretion by U937 monocytic cells (Taimi et al., 1994) and potentiates mouse humoral immune response to *Trypanosoma cruzi* (Albuquerque et al., 1999). KM+ has been reported as tool for multiple biomedical applications, including the induction of neutrophil migration (Pereira da Silva et al., 2006) and the induction of IL-12 production by macrophages, which then stimulate IFN- γ by lymphocytes (Panunto-Castelo et al., 2001). However, advances in these studies are often limited by the difficulty in obtaining sufficient quantities of jacalin-free KM+ through direct seed extraction. Studies regarding cDNA cloning and the functional expression of KM+ are in progress. In this work, the protective mechanisms of jack extract against a lethal infection with *C. albicans* was investigated by analyzing receptors for phagocytosis, fungicidal mechanisms, TNF- α production and *Candida* clearance from mouse organs.

Materials and Methods

Candida albicans culture

C. albicans strain CR15 was isolated from the oral mucosa of an HIV-infected individual at the Londrina State University hospital and maintained on Sabouraud dextrose agar; the isolate was used after two serial animal passages. After growth in Sabouraud dextrose broth for 24h at 28°C, *C. albicans* yeast cells were cytospun, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended at 2×10^6 , 10^7 or 10^8 cells ml⁻¹ RPMI 1640 (Sigma, Saint Louis, MO, USA). The yeast cells were also inactivated by heating for 1 h at 60°C, for evaluation of TNF- α in phagocytic assays.

Extract from *Artocarpus integrifolia* seeds

A. integrifolia aqueous extract was prepared in the following manner: the seeds of jackfruit were collected, washed in water, and dried for 24 h at 37°C. Five hundred grams of dried seeds were ground and added to five liters of phosphate

buffered saline (PBS) 0.01M, pH 7.2. The mixture was incubated for 24 h at 4°C, followed by centrifugation at 2000x G for 20 min in a Sorvall RC2B centrifuge. The supernatant was collected and dialysed against several changes of PBS for 48 h. This crude extract that contains the lectins (jacalin and artocarpin/KM+) was sterilized by Millipore filtration and stored in aliquots in a -70°C freezer. The protein concentration was measured by Bradford method using bovine serum albumin as standard.

Treatment and infection of mice

Subgroups of four male Swiss mice, each weighing 28-32g, received extract from *A. integrifolia* seeds (jack extract) containing 500 µg protein ml⁻¹ PBS intraperitoneally (ip) or PBS only and after 6 to 72 h were sacrificed to obtain peritoneal phagocytic cells. Mice (10 per group) received jack extract or PBS ip and the survival of mice postinfection with a lethal dose of *C. albicans* (10⁸ ml⁻¹ PBS) ip was observed for a follow-up period of 28 days.

Phagocytosis assays

Mice were sacrificed after pretreatment with jack extract or PBS and the exudate cells were immediately diluted to 4 x 10⁵ cells ml⁻¹ in RPMI containing 5% fetal calf serum and 70µg of gentamicin (CM) and incubated on coverslips for 1h at 37°C. After washing the cells to remove nonadherent cells, 2 X 10⁵ ml⁻¹ phagocytes in CM were coincubated with 2 X 10⁶ ml⁻¹ *C. albicans* in CM for 30min at 37°C. Opsonization was performed by adding 2.5% of fresh nonimmune mice serum to *C. albicans* for 5 min at 37°C before coincubation with phagocytes. A total of 200 phagocytes were analyzed for each preparation and the percentage of phagocytes that phagocytosed *Candida* were counted after staining the cells with May-Grunwald-Giemsa.

Quantification of superoxide anion (O₂⁻) production

Superoxide generation by phagocytes was quantified by SOD-inhibitable reduction of ferrocytochrome c (type III; Sigma) as previously described by Schnur & Newman (1990). Phagocytes (2 X 10⁶) were incubated for 1h at 37°C with opsonized or nonopsonized *Candida* cells 1:1, in Krebs Ringer phosphate buffer with 0.2% dextrose containing 80 µM cytochrome c. Control wells contained cytochrome c without *Candida* (resting cells) or *Candida* plus 40 µg of SOD/ml. The supernatants were collected by centrifugation at 4°C at the end of incubation. Absorbance of the supernatants at 550nm was measured in a Varian spectrophotometer, and the background absorbance in control tubes containing only buffer and cytochrome was subtracted. All experiments were performed in triplicate and the results were calculated as nanomoles of O₂⁻ using $E_{550} = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The results are expressed as nanomoles of reduced cytochrome c per 2x10⁶ cells per hour.

Candidacidal assays

Phagocyte candidacidal activity was assayed as previously described by Loyola et al. (2002). Briefly, 4 X 10⁵ exudate cells were plated (0.2ml /well) for 1h at 37°C and coincubated with 2 X 10⁶ yeast cells in 0.8ml of CM for 30 min at 37°C. Sterilized double-distilled water (1ml) containing 0.5% triton X 100 (Pharmacia) was added to the wells for 10 min. Serial 10-fold dilutions from each well were realized in PBS. Aliquots (100µl) were plated on Sabouraud agar and the number of colony forming units (CFUs) was determined 24h after incubation at 37°C. The percentage of CFU reduction (mean ± S.D.) was determined as follows: percentage of CFU reduction = 100- (CFUs experimental group/CFUs control cultures) x 100. *C. albicans* incubated with no effector cells were used as controls. The results represent the average of four independent experiments and two replicates per mouse.

Receptor analysis

To study dectin-1, a receptor that binds β-glucans from yeast cell bud scars, the method used by Gantner et al. (2003) was followed; peritoneal macrophages were preincubated with laminarin (Sigma) 1mg ml⁻¹ CM for 30min. To study mannose receptors, the macrophages were preincubated with 9µg mannose plus 100µg mannan (Loyola et al., 2002). The inhibitors were maintained in the medium and 2 X 10⁶ *C. albicans* were added for 30min at 37°C. A total of 200 phagocytes were analyzed for each preparation and the percentage of phagocytes that presented phagocytosed *Candida* were counted after staining the cells with May-Grunwald-Giemsa. The mice received 500µg ml⁻¹ jack extract in PBS or PBS alone 72 h before phagocytic assays.

Quantification of viable *C. albicans* in exudate and organs

The liver, spleen, and kidneys of infected mice were each homogenized with 10, 5 and 5 ml of PBS respectively. Samples (100 μ l) were collected after dilutions for each organ or exudate and were plated on Sabouraud dextrose agar plates (Conchon-Costa et al., 2007). The colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C and CFUs were calculated per organ or milliliter of exudate.

TNF- α assays

Supernatants from peritoneal exudate and homogenized organs were collected by centrifugation of samples from each mouse from all groups and submitted to capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using purified antimouse TNF- α (IF3F3D4, from Bioscience). The cytokine concentration was determined with reference to a standard curve for serial two-fold dilutions of mouse recombinant TNF- α ; optical absorbance was measured at 492nm.

Determination of alanine aminotransferase

Alanine aminotransferase (ALT) activity was determined with the kinetic UV test recommended by the International Federation of Clinical Chemistry. The test was first described by Bergmeyer et al. (1978). ALT activity was determined with the Dade Flex cassette System (Dade Behring Inc, Newark, USA) using a Dade Behring Dimension Clinical Chemistry System.

Statistical analysis

Statistical differences were determined using the Student t test. Survival rates were estimated by Kaplan-Meier curves and analyzed by the log rank test. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of jack extract administration on the activities of phagocytic cells

The percentage of peritoneal macrophages phagocytosing *C. albicans* through complement receptors increased from day 2 to day 4 posttreatment (ip) with jack extract and returned to near control values afterwards (Fig. 1A). In the absence of added serum, the percentage of phagocytosing macrophages was also greater, suggesting that jack extract increased both opsonic and lectin-like receptor activities (Fig. 1A).

The migration of phagocytes to the peritoneal cavity and the efficiency in killing *Candida* was time-dependent on treatment. A predominance of neutrophils (58.7 \pm 8.1 %) occurred after 6 h, these cells were able to kill the pathogen, and a predominance of macrophages (96.0 \pm 4.5 %) between days 2 and 4. The macrophages were considered activated due to greater spreading and the ability to ingest and to kill yeast compared to control macrophages (Fig. 1B).

Opsonized yeast cells stimulated significantly greater quantities of superoxide anion by macrophages 72 h posttreatment with jack extract compared to nonopsonized yeast or by control phagocytes (**P<0.01). Moreover, macrophages from mice pretreated with jack extract released significant quantities of superoxide anion compared to controls (*P<0.05). In the presence of SOD, the quantity of superoxide anion was reduced (P<0.05; Fig. 2).

The influence of jack extract on the activities of dectin-1 and mannose receptors and TNF- α production

Only 20% of control macrophages phagocytosed *C. albicans*, whereas 52% of macrophages collected after treatment with jack extract were able to ingest *C. albicans* (Fig. 3A). The addition of mannan plus mannose to assays reduced phagocytosis from 52% to 34% (P<0.05). In presence of dectin-1 inhibitor, laminarin phagocytosis was reduced from 52% to 16% (P<0.001).

Fig. 3B shows significantly greater TNF- α production after phagocytosis of *C. albicans* by activated macrophages and this increase was inhibited in presence of laminarin (Fig. 3C).

Effect of jack extract on TNF- α levels and *C. albicans* clearance

A significant increase in the content of TNF- α in supernatants from peritoneal exudate cells and from liver cells of mice pretreated with jack extract for three days was observed 2 h postinfection with *C. albicans* (Fig. 4A). To correlate TNF- α production with *C. albicans* clearance, samples of homogenized organs were plated in Sabouraud dextrose agar; CFUs were significantly reduced in all the organs studied and in the peritoneal cavity (Fig. 4B).

Influence of jack extract on liver injury and the survival of mice infected with *C. albicans*

Jack extract prevented liver injury, as confirmed by normal alanine aminotransferase activity (48.0 ± 15.2), in contrast with the control group (239.3 ± 80.5) one day after inoculum of 5×10^7 yeast cells (Table 1). *C. albicans* CR15 was highly pathogenic and 60% of mice that received 1×10^8 blastoconidia ip died 6 days postinfection; this increased to 80% after 14 days of the course of infection; whereas 100% of mice pretreated for 72h with jack extract survived for 14 days and 10% died due to the inoculum during the follow-up period of 28 days (Fig. 5).

Discussion

The present study showed that jack extract was able to increase the migration of phagocytes to the peritoneal cavity with increased phagocytic and candidacidal activities and these processes depended on the time of administration. Phagocytosis mediated by complement receptors and by mannose receptors or by dectin-1 receptors was increased three days posttreatment, as shown by specific inhibitors. Thus, mannan plus mannose reduced phagocytosis from 52% to 34%. The enhanced phagocytosis was also strongly inhibited by soluble β -glucans (laminarin), with the reduction in phagocytosis diminishing from 52% to 16%. According to Gantner et al. (2003), microbial components are directly recognized by both dectin-1 and TLRs and these receptors trigger independent and cooperative inflammatory responses. In this study, it was shown that macrophages from mice pretreated for three days with jack extract were able to produce the inflammatory cytokine TNF- α *in vitro* after 2 h of incubation with *C. albicans* killed by heating; a process inhibited in the presence of laminarin (Fig. 3). These macrophages were also effective at producing significant quantities of superoxide anion in the presence of opsonized or nonopsonized *C. albicans* compared to controls. Corroborating these results, after binding with particulate β -glucans, such as zymozan, dectin-1 can induce the production of various cytokines and chemokines, including TNF- α and CXC-chemokine ligand 2; it can also induce a respiratory burst, as reported by Brown (2006).

However, experimental infection with *Candida* is more complex than *in vitro* assays. Whereas jack extract stimulated the migration of neutrophils and macrophages and these were coincubated with *C. albicans* *in vitro* to study the receptors involved in phagocytosis and TNF- α release, the outcome of experimental infection is influenced by multiple mechanisms, including pattern recognition and the production of several cytokines, as well as pathogen virulence factors. Interestingly, peritoneal and liver cells from mice pretreated with jack extract and challenged by an intraperitoneal inoculum of *C. albicans* presented a significant increase in TNF- α production and these mice cleared the fungal infection faster than control mice (Fig. 4). The authors previously demonstrated similar results by administration of Con-A (Conchon-Costa et al., 2007). The proinflammatory cytokine TNF- α mediates a variety of biological responses, among them improved phagocyte functions (Netea et al., 1999; Ohmura et al., 2001; Gantner et al., 2005; Filler, 2006; Murciano et al., 2007; Conchon-Costa et al., 2007), which suggest that TNF- α secretion might be related to the onset of protective immunity.

As expected, due to the increase in TNF- α production and the increase in phagocytic and candidacidal activities of phagocytes through of stimulation with jack extract, 90% of mice pretreated with jack extract for three days survived to the lethal *C. albicans* inoculum. In contrast, only 20% of the control group survived the 28 day follow-up period. The effective protection afforded by jack extract was confirmed by measuring the activity of alanine aminotransferase (ALT) in the plasma of mice infected with *C. albicans*. An inoculum of 5×10^7 yeast cells caused a significant increase in ALT activity in control mice. In contrast, mice pretreated with jack extract for three days and receiving the same *Candida* inoculum presented unaltered ALT activity, suggesting that jack extract protected the mice against *C. albicans* infection and that jack extract alone was not toxic for mice.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Jair Aparecido Oliveira of the Londrina State University hospital, for his technical assistance during the kinetic UV test. This work was funded by grants from the CNPq, CAPES and Fundação Araucária.

References

- Albuquerque DA, Martins GA, Campos-Neto A & Silva JS (1999). The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi* Immunol Lett. **68**: 375-381.
- Bergmeyer HU, Scheibe P, & Wahlefeld AW (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem **24** : 58-73.
- Bertram EM, Jilbert AR & Kotlarski L (1997). 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 **21**:299-310.
- Brown G & Gordon S (2003). fungal β -Glucans and mammalian immunity. Immun **19**:311-315.
- Brown G (2006). Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. Nature Reviews/Immunol **6**:33-41.
- Buchner T, Hiddemann W, Koenigsmann M, et al. (1991). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia at higher age or after relapse. Blood **78** : 1190-1197.
- Calderone RA & Fonzi WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans* Trends Microbiol. **9**: 327-335.
- Conchon-Costa I, Loyola W, Gaziri LCJ, Custodio LA & Felipe I (2007). Low dose of concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol **49** :330-336.
- Filler SG, (2006) *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. Curr Opin Microbiol **9**: 1-7
- Gantner BN, Simmons RM & Underhill DM (2005). Dectin-1 mediates macrophages recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. Embo J **24** : 1277-1286
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. J Exp Med **197**:1107-1117.
- Garber G (2001). An overview of fungal infection. Drugs **61** (Suppl.1): 1-12.
- Gaziri G, Gaziri LCJ, Kikuchi R, Scanavacca J & Felipe I (1999). Phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalin-A activated peritoneal macrophages. Med Mycol **37**: 195-200.
- Lilic D, Gravenor I, Robson N, Lammas DA, Drysdale P, Calvert JE, cant AJ, & Abinum M.(2003). Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. Infect Immun **71**: 5690-5699.
- Loyola W, Gaziri DA, Gaziri LCJ, Felipe I (2002). Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol **33** : 201-208.
- Moresco TR, Gaziri LCJ, Yasumoto Y, Felipe I (2002). Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A. Med Mycol **40**: 393-397.
- Muraille E, Pajak B, Urbain J & Leo O (1999). Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and non mitogenic lectins. Cell Immunol **191**:1-9.
- Murciano C, Yanez A, Gil ML & Gozalbo D (2007). Both viable and killed *Candida albicans* cells induce *in vitro* production of TNF-alpha and IFN-gamma in murine cells through a TLR2-dependent signaling. Eur Cytokine Netw **18**: 38-43.
- Netea MG, van Tits LJH, Curfs JHAJ, Amito F, Meiss JFGM, van der Meer JWM & Kullberg BJ (1999). Increased susceptibility of TNF- α lymphotoxin- α double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. J Immunol **163**: 1498-1505.
- Netea MG, Gow MAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Fewerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes B et al. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. J Clin Invest **16**:1642-1650.
- Ohmura Y, Matsunaga K, Motokawa I, Sakurai K & Ando T (2001). Protective effects of a protein-bound polysaccharide, PKS, on *Candida albicans* infection in mice via tumor necrosis factor- α induction. Internat Immunopharmacol **1**: 1797-1811.
- Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira, MC & Silva JS (2001). KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. Glycobiology **11**:1035-1042.
- Pereira-da-Silva G, Moreno AN, Marques F, Oliver C, Jamur MC, Panunto-Castelo A & Roque-Barreira MC (2006). Neutrophil activation induced by lectin KM+ involves binding to CXCR2. Biochem Biophys Acta **1760**: 86-94.
- Roilides E & Walsh T (2004). Recombinant cytokines in augmentation and immunomodulation of host defenses against *Candida* spp. Med Mycol **42**: 1-13.
- Schnur RA & Newman S (1990). The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. J Immunol **144**: 4765-4772.

- Soll DR (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* **81**: 101-110.
- Taimi M, Dornand J, Nicolas M, Marti J & Favero J (1994). Involvement of CD4 in Interleukin-6 secretion by U937 monocytic cells stimulated with the lectin jacalin. *J Leukoc Biol* **55**: 214-220.
- Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lochart R, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR (2000). Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* **38**: 3595-3607.

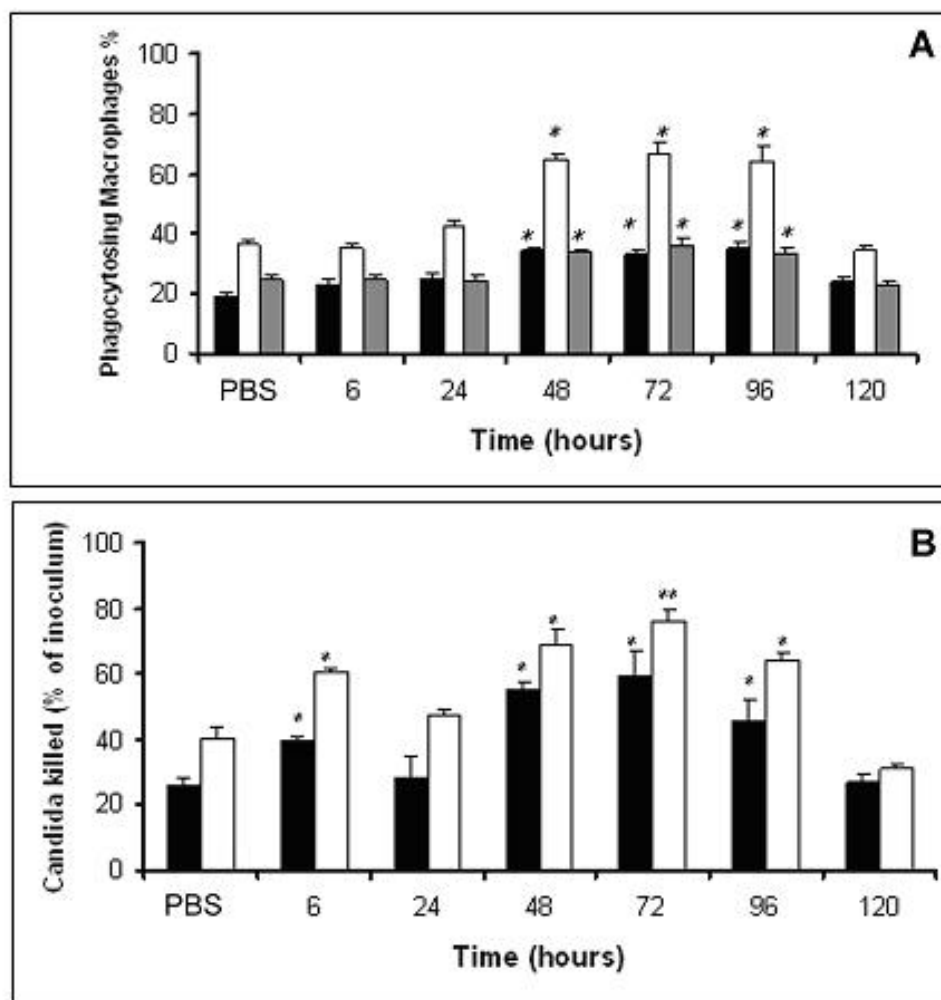


Figure 1. Effect of jack extract administration on phagocytosis and candidacidal activities. The phagocytes are from mice pretreated with PBS only (control) or jack extract. A. Percentage of macrophages phagocytosing in absence of serum (closed); in the presence of nonimmune mouse serum (open); in the presence of heat-inactivated serum (shadowed) B. Percentage of *C. albicans* killed by phagocytes in absence of serum (closed); in the presence of nonimmune mouse serum (open). * $P < 0.05$ for jack extract vs. PBS group.

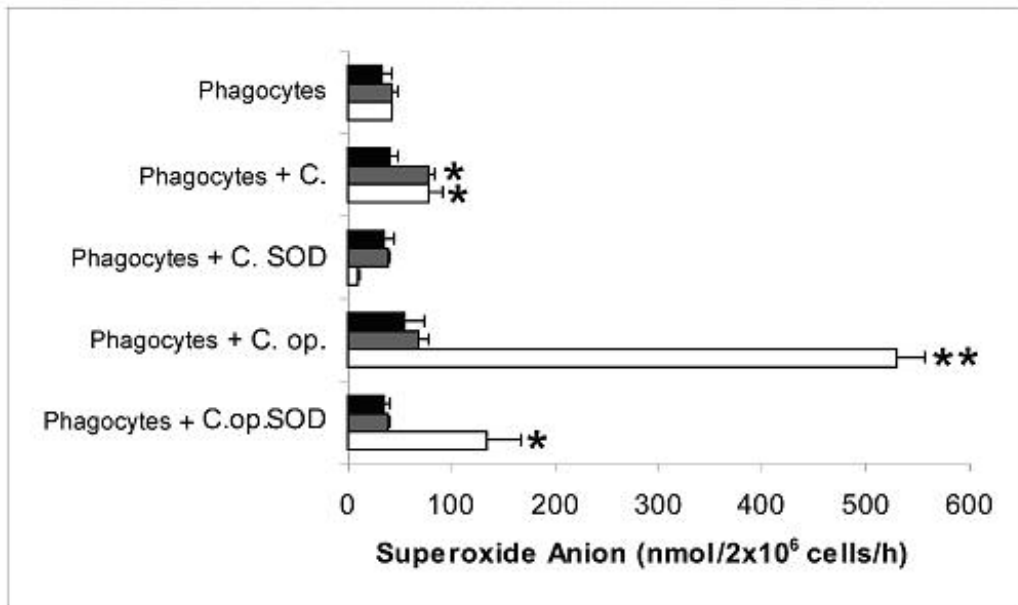


Figure 2. Influence of jack extract on the phagocytes to superoxide anion production.

Superoxide generation by phagocytes was quantified by SOD-inhibitable reduction of ferrocytochrome c. Macrophages (2×10^6) were co-incubated with opsonized (op) or unopsonized *Candida* (1×10^7) either in the absence or presence of SOD ($50 \mu\text{g/ml}$). Control (closed), jack extract 6-h (shadow) and jack extract 72h before assays (open). The data are means \pm SEM of 6 experiments.

** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ compared to control.

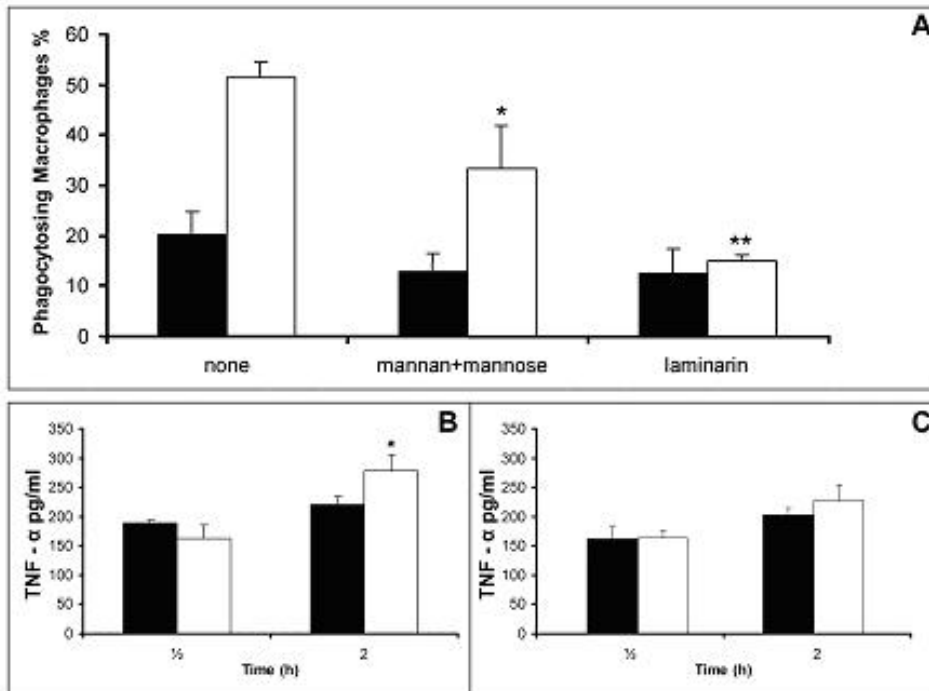


Figure 3. Mannose receptors and dectin-1 activities and TNF- α production.

Control macrophages (closed) or macrophages from mice pretreated with jack extract for 3 days (open) were preincubated with inhibitors (mannan plus mannose) or laminarin, or medium only, for 30 min and then *C. albicans* was added for 30 min at 37°C (A). The supernatants were collected, and TNF- α was determined by ELISA. Production of TNF- α in the absence (B) or presence of laminarin (C).

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to control.

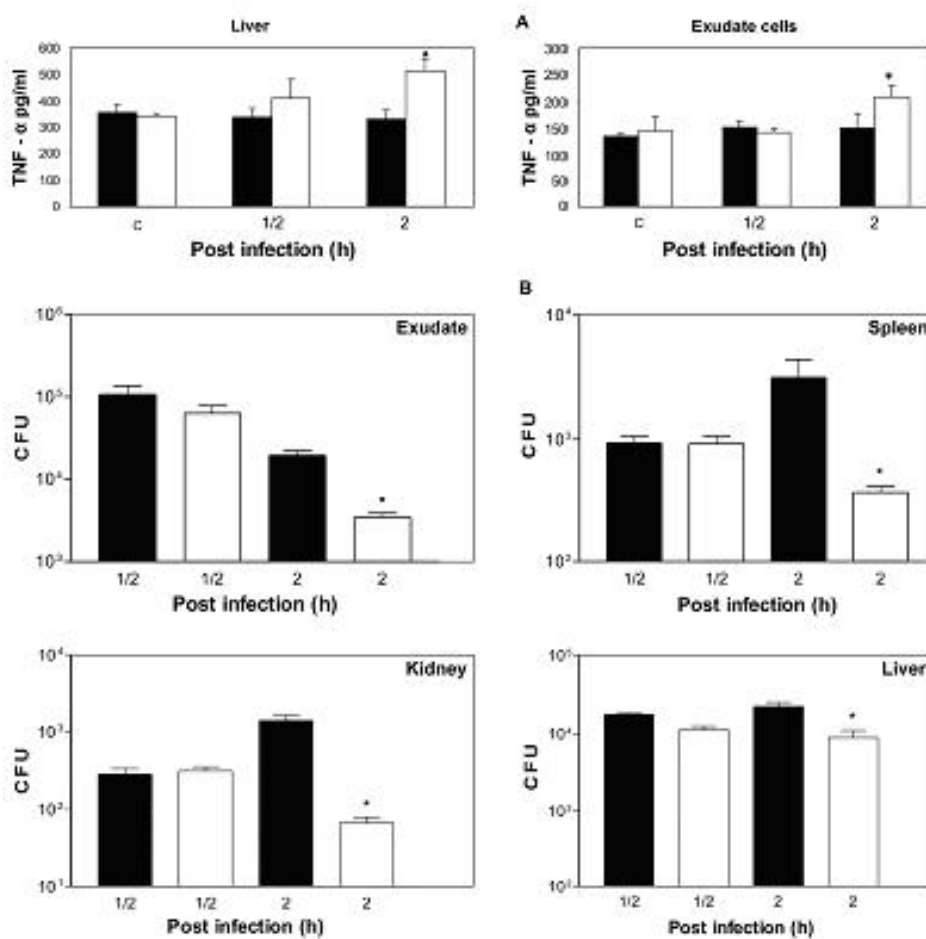


Figure 4. TNF- α production and *C. albicans* clearance postinfection. Mice were pretreated with PBS (closed bars) or jack extract (open bars) 3 days before inoculation ip with 10^7 *C. albicans*. A. TNF- α production in supernatants from exudate peritoneal cells and liver. B. CFU (log) from organs infected. Data are reported from 4 experiments. * $P < 0.05$ for jack extract vs. PBS group.

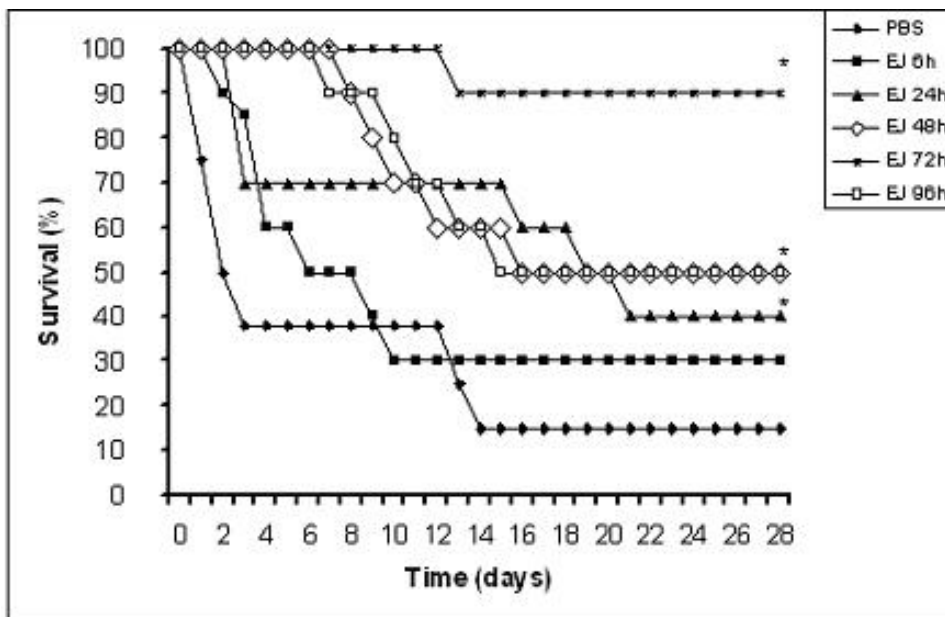


Figure 5. Effect of jack extract on the survival of mice after infection with *C. albicans*.

Mice (10 per group) received jack extract (500 μ g) or PBS before ip infection with 10^8 *C. albicans*. * $P < 0.05$ (vs. PBS group) in log-rank test for survival rates

Table 1: Determination of plasma alanine aminotransferase activities (IU L⁻¹) from mice infected with *C. albicans* after pretreatment with Jack extract (JE).

		Alanine aminotransferase activity (IUL ⁻¹)		
		Inoculum		
Treatment	Control	1x10 ⁷	5x10 ⁷	
		24h	24h	72h
PBS	52.3 ± 19.6	48.8 ± 18.4	239.3 ± 80.5*	369.75 ± 51.1*
JE 6h	46.0 ± 11.9	30.0 ± 4.6	55.8 ± 11.7	139.5 ± 33.9*
JE 72h	47.7 ± 6.6	38.5 ± 10.4	48.0 ± 15.2	43.0 ± 7.5

JE 500µg ml⁻¹ PBS or PBS alone were administered i.p. 6h or 72h before infection with *C. albicans*. Values are reported as means ± S.D. for 6 mice in each group. * Statistically significant at P < 0.05 for PBS vs. JE.

Table 1. Determination of plasma alanine transferase activities (IUL⁻¹) from mice infected with *Candida albicans* after pretreatment with jack extract.

Jack extract 500µg mL⁻¹ PBS or PBS only was administered ip 6 h or 3 days before infection with 10⁸ *C. albicans*. Values are reported as means ± SD for 6 mice in each group. * Statistically significant at P < 0.05 for PBS vs. jack extract.