



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

IVETE CONCHON COSTA

**BAIXA DOSE DE CONCAVALINA-A AUMENTA
A IMUNIDADE INATA E PREVINE INJÚRIA NO
FÍGADO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Candida albicans***

**Londrina
2006**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

IVETE CONCHON COSTA

BAIXA DOSE DE CONCAVALINA-A AUMENTA
A IMUNIDADE INATA E PREVINE INJÚRIA NO
FÍGADO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
Candida albicans

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

Orientadora: Profa. Dra. Ionice
Felipe.

Londrina-Pr

2006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho

Prof. Dra. Ionice Felipe

DEDICO:

Ao meu marido, Carlos Lopes Costa e minhas filhas Ana Carolina, Sarah e Laura por tudo o que passamos juntos e principalmente por tudo o que deixamos de conviver durante este período.

DEDICO:

A meu pai...

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Ionice Felipe por me receber em seu laboratório, pela confiança em mim depositada, pelo exemplo de pesquisadora e de determinação e pelo incentivo e amizade com que orientou o presente trabalho.

À profa. Dr^ª Halha Ostresnky Saridakis, e ao Prof. Dr Phileno Pinge Filho por aceitarem tão prontamente fazer parte da banca de qualificação e defesa e principalmente pela amizade e estímulo constante.

À profa. Dr^ª Terezinha Inez Estivalet Svidzinski e Prof^ª Dr^ª Jacinta Sanches Pelayo, pela disponibilidade em participar da banca desta tese.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Jabur Gaziri, pelas valiosas sugestões, apoio constante e disponibilidade em participar da banca de defesa.

Ao prof. Dr. Emerson J. Venâncio pelo apoio, incentivo e disponibilidade em participar da banca desta tese.

Aos professores da disciplina de Parasitologia, Prof^ª Regina Mitsuka Breganó, Prof^ª Maria Claudia Noronha Dutra de Menezes, e Prof. Francisco José de Abreu Oliveira por permitirem me ausentar de minhas atividades na disciplina, pelo incentivo, pela convivência e, sobretudo pela amizade.

Ao Prof. Jair Aparecido de Oliveira por tão prontamente realizar as dosagens de ALT e AST.

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

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Prof^ª. Dr^ª. Sueli F.Y. Ogata, Prof^ª. Dr^ª. Márcia C. Furlaneto, Prof^ª. Dr^ª. Jacinta S. Pelayo, Prof^ª. Dr^ª. Rosa Elisa C. Linhares, Prof. Dr. Carlos M. Nozawa, Prof. Dr. Galdino A. Filho, pelo apoio.

Ao amigo Wagner Loyola pela longa caminhada juntos, desde a graduação, pela paciência, apoio, companheirismo e, sobretudo pela amizade.

Aos amigos do laboratório, Luiz Antonio Custódio e Eliana de Vito, pelas inúmeras colaborações e principalmente pelo carinho e amizade sincera.

Ao amigo Prof. Jair Tonon, pela sua amizade tão importante em difíceis momentos vividos durante este período.

Ao amigo Pedro S. Raimundo Filho, pela prontidão no auxílio constante, estímulo e amizade.

À Vânia D' Arc de Castro pelo apoio técnico, incentivo e sincera amizade.

Aos docentes temporários da disciplina de parasitologia, Francisco Anaruma Filho, Fabiana Gasparin G. Moreira e Marla Karine Amarante, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos secretários Ana Maria Rodrigues e João Alexandre Lopes, pelo apoio.

Aos demais docentes e funcionários do departamento de Ciências Patológicas pelo apoio e amizade.

À amiga Yara A. R. Imbriani pelo apoio constante, amizade e por tantas idas e vindas.

Ao amigo Alexandre Saito pela constante colaboração na parte gráfica desta tese.

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

Aos colegas do curso de Pós-Graduação de curso de Microbiologia, pelo apoio.

E principalmente a DEUS, que tornou tudo isto possível.

RESUMO

Candida albicans causa infecções desde mucocutâneas à sistêmicas, dependendo das condições imunológicas do hospedeiro. Vários fatores de virulência contribuem para a patogenicidade, como as aspartil proteinases e fosfolipases, as quais degradam queratina, colágeno, lactoferrina, imunoglobulinas, componentes do complemento, além de membranas celulares, possibilitando sua disseminação e colonização. As adesinas são essenciais por permitirem a aderência a células epiteliais e endoteliais e a morfogênese que consiste na transição reversível entre leveduras e formas filamentosas. Macrófagos e neutrófilos são extremamente importantes na defesa não específica, mas a sinalização de ativação ou desativação dos mecanismos fungicidas são mediadas por células Th1 e Th2 dependentes da resposta imune do hospedeiro. Os mecanismos através dos quais *C. albicans* é reconhecida pelas células imunes e como é ativada a defesa do hospedeiro não são completamente elucidadas. Neste estudo, avaliamos o efeito da Concanavalina-A (Con-A) na eliminação de *C. albicans* em camundongos infectados e a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α . Grupos de 5 animais foram pré-tratados com Con-A (250 μ g/ml PBS) e após 96 horas foram infectados intraperitonealmente com 10^7 células de *C. albicans* CR15 (um isolado de paciente HIV+); 30 minutos, 2, 6, 24, 72 horas após a infecção os camundongos foram mortos. A fagocitose de *C. albicans* por macrófagos peritoneais foi maior 30 minutos após a infecção nos camundongos pré-tratados com Con A. O fígado apresentou o maior número de unidades formadoras de colônia, e este número foi reduzido pelo tratamento com Con-A. Animais controle infectados com *C. albicans* apresentaram significativo aumento de alanina aminotransferase plasmática, o que não foi observado em camundongos pré-tratados com Con-A. Após duas horas de infecção a produção de TNF- α no fígado de animais pré-tratados com Con-A foi significativamente aumentada. Estes resultados sugerem que uma única dose de Con-A causou uma ação moduladora benéfica na resposta inflamatória durante a infecção com *C. albicans*.

ABSTRACT

Candida albicans causes several diseases, ranging from mucocutaneous to systemic infection. Various virulence factors contribute to pathogenesis; for example aspartyl proteases and phospholipases play an essential early role in *C. albicans* dissemination and enhance its ability to colonize deep organs. The adhesins allow adherence to epithelial and endothelial cells, and morphogenesis consists of reversible transitions between unicellular yeast cells and the filamentous growth forms. Macrophages and neutrophils are extremely important in nonspecific defences, but signals activating or deactivating fungicidal mechanisms, which are respectively mediated by Th1 or Th2 cells; are host-dependent immune response. The mechanisms through which *Candida albicans* is recognized by immune cells and how it triggers host defence are not completely understood. In this study, we evaluated the effect of Concanavalin-A on the clearance of *C. albicans* by infected mice and their production of proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α). Subgroups of 5 animals were pretreated with Con-A (250 mg mL⁻¹ PBS) and after 96 h were infected intraperitoneally with 10⁷ cells of *C. albicans* CR15 (an isolate from a HIV+ person); 30 min, 2, 6, 24 or 72 h after infection the mice were sacrificed. Phagocytosis of *C. albicans* by peritoneal macrophages increased 30 min after infection in mice pretreated with Con-A. The liver presented the greatest number of CFUs, and this number was reduced by pretreatment with Con-A. Control animals infected with *C. albicans* presented a significant increase in plasmatic alanine aminotransferase, which was not observed in mice treated with Con-A. Two hours after infection the production of TNF- α in the liver of mice pretreated with Con-A was significantly increased. These results suggest that a single dose of Con-A caused a beneficial modulating action of the inflammatory response during infection with *C. albicans*.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	01
1.1. <i>Candida albicans</i> e candidíase.....	01
1.2. Fatores de virulência de <i>Candida albicans</i>	06
1.3. Mecanismos de defesa do hospedeiro.....	11
2. Objetivos.....	24
3. Referências Bibliográficas.....	25
Artigo: Low dose of Concanavalina-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with <i>Candida albicans</i>	37
Abstract.....	2 of 18
Introduction.....	3 of 18
Materials and methods.....	3 of 18
Results and discussion.....	5 of 18
References.....	7 of 18
Fig. 1.....	12 of 18
Fig. 2.....	13 of 18
Fig. 3.....	14 of 18
Fig. 4.....	15 of 18
Fig.5.....	16 of 18
Tab.1.....	17 of 18
Tab. 2.....	18 of 18

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Candida albicans* e Candidíase

C. albicans é um fungo que pertence ao filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales (KURTZMAN & FELL, 1998), diplóide (JONES e cols., 2004) com genoma nuclear contendo aproximadamente $1,6 \times 10^7$ pb distribuídos em oito cromossomos com tamanho variando entre 1,03 e 4,3 Mb (de BACKER et al., 2000).

Esse fungo é dimórfico, apresenta-se com forma de levedura unicelular, denominada blastósporos ou blastoconídios; hifas verdadeiras; pseudohifas e clamidósporos (ou clamidoconídeos). As diferentes formas dependem de diferentes condições ambientais (MOLERO et al., 1998). O dimorfismo é disparado em resposta a certas condições do ambiente, como temperatura, pH, disponibilidade de soro, privação nutricional, altas concentrações de fosfato (KOBAYASHI & CUTLER, 1998; SUDBERY et al., 2004).

A capacidade de mudança entre as diferentes formas está relacionada à virulência. As formas hifa e pseudohifa são invasivas, e esta propriedade pode promover a penetração tecidual durante os estágios de infecção, enquanto a forma de levedura está mais adaptada para disseminação na corrente sanguínea, a forma filamentosa está mais relacionada com a colonização de órgãos (SUDBERY et al., 2004).

Em indivíduos assintomáticos, este fungo pode ser encontrado em superfícies cutâneas e mucosas como comensal, constituindo um membro da microbiota normal e dependendo do método da coleta e os locais pesquisados, pode ser detectado em aproximadamente 70% da população saudável (RUHNKE & MASCHMEYER 2002).

A colonização por *C. albicans* começa no período pós-natal e com base em estudos feitos com mães de recém nascidos, estes são colonizados por cepas de origem materna. Mais de 60% dos indivíduos saudáveis albergam este fungo, que é isolado tanto da cavidade oral como do esôfago e do trato gastrointestinal. A relação de comensal é dependente da manutenção da integridade do tecido do hospedeiro, da microbiota normal assim como do sistema imune intacto. Assim, poucos indivíduos saudáveis desenvolvem sinais

clínicos da doença, que depende de uma mudança no ambiente que finalmente determinará se o fungo permanecerá como comensal ou sofrerá proliferação para invadir os tecidos e causar candidíase (MATHEWS & WITEK-JANUSEK, 2002).

Durante muitos anos, era incerto se os sintomas da candidíase eram devido a um agente infeccioso ou uma condição inata humana. Esta dúvida foi resolvida em 1840, quando lesões orais associadas com “thrush” foram atribuídas ao fungo. Após muitos anos de confusão taxonômica, em 1923 um esquema de classificação foi proposto, sendo esse fungo denominado *Candida albicans*. O nome deriva de *toga candida*, uma expressão em latim para a toga branca que identificava os candidatos para o Senado Romano, e *albicans* uma forma gramatical da cor branca (JOHNSON, 2003).

A incidência de candidíase tem aumentado nos últimos anos e *C. albicans* tem se tornado um significativo patógeno nosocomial, podendo ser responsável por uma variedade de quadros clínicos, desde infecções superficiais de mucosa, como candidíase vulvovaginal (CVV) e orofaríngea (COF), até infecções sistêmicas com disseminação para órgãos parenquimais. Além disso, *C. albicans* pode causar peritonite por inoculação iatrogênica com dispositivos plásticos contaminados durante diálise peritoneal em ambulatórios (CENCI et al., 1995).

O considerável aumento de infecções por *Candida* nas últimas décadas, é certamente ligado à utilização de drogas imunossupressoras, tais como corticosteróides e drogas citotóxicas, aplicadas em pacientes leucêmicos, portadores de linfoma ou outros tumores, assim como uso prolongado e indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro e utilização de técnicas invasivas, como catéteres, que abrem brechas para a invasão do fungo (SENET, 1997, COLOMBO et al., 2000). *C. albicans* é a quarta causa de infecções nosocomial nos Estados Unidos e em outros locais do mundo com mortalidade atribuída de 35% (CALDERONE & FONZI 2001).

Freqüentemente, o tipo de infecção por *Candida* sp está relacionado com uma deficiência específica nas defesas do hospedeiro. Assim, a infecção de mucosa geralmente está associada com a deficiência da imunidade mediada por célula T, enquanto a infecção sistêmica é comum em pacientes neutropênicos (GREENFIELD, 1992).

Doenças que causam imunossupressão, como a AIDS podem levar a manifestação de candidíase, principalmente a orofaríngea (KLEIN et al., 1984). Segundo Fidel (1999), candidíase orofaríngea ocorre em aproximadamente 70% dos pacientes com AIDS.

A candidíase vulvovaginal está entre os principais problemas ginecológicos que afetam mulheres em idade reprodutiva (ADAD, et al., 2001). Estima-se que uma porcentagem significativa de mulheres adultas apresente pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal em sua vida sendo que destas, 40 a 50% vivenciarão novos surtos e 5% atingem o caráter recorrente, ou seja, três ou mais episódios anuais de vaginite por *Candida* sp, (FIDEL & SOBEL, 1996), destes, 80 a 90% são devido a *C. albicans*. Os demais casos de 10 a 20% são devido a outras espécies constituindo o grupo de *Candida* não *albicans* (SOBEL, 1993). Por outro lado, estudos mostraram que 20-25% de mulheres saudáveis e totalmente assintomáticas apresentam culturas positivas para fungos na secreção vaginal (SOBEL, 1990), o mesmo foi verificado no sul do Brasil por Ferrazza et al., 2005, os autores verificaram positividade de 24% para *Candida* spp em mulheres, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente.

Entre as infecções invasivas causadas por espécies deste gênero, vale salientar a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, complicação conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica (COLOMBO E GUIMARÃES, 2003) A ocorrência de casos de candidemia em hospitais terciários aumentou muito nas últimas décadas. Nos Estados Unidos, segundo dados obtidos por Pfaller et al., (1998), 8% dos 4.725 episódios de infecção de corrente sanguínea documentada naquelas instituições eram decorrentes de *Candida* spp, sendo considerada a quarta principal causa de infecção de corrente sanguínea em hospitais terciários americanos, a razão de infecções sanguíneas por esse patógeno tem aumentado 487% nesta década.

Segundo Jarvis (1995), entre janeiro de 1980 a abril de 1990, foram reportados 27.200 infecções fúngicas nosocomiais em 180 hospitais participantes do Sistema Americano Nacional de Infecções Nosocomial Surveillance (NNSS), sendo *C. albicans* responsável por 72,1% dos casos.

No Brasil, Colombo et al., (2006), realizaram pesquisa de candidemia em 11 centros médicos em 9 cidades do Brasil de março de 2003 a dezembro

de 2004, detectaram 712 casos, sendo *C. albicans* a espécie mais comum (40,9%), seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%).

A infecção por *C. albicans* pode ocorrer por via endógena, sendo seu reservatório o trato gastrointestinal, mas também pode ser adquirida por via exógena, através do contato com indivíduos colonizados, por implantes de próteses, sondas, drenos e catéteres e por administração parenteral de soluções contaminadas (LACAZ, 2002).

Um agravante na utilização destes dispositivos é a capacidade de *C. albicans* formar biofilme e resultar em infecções refratárias à terapia antifúngica. A mortalidade nas infecções por *C. albicans* associada a aparelhos médicos é aproximadamente de 30% (KUMAMOTO & VINCES, 2005).

As infecções causadas por *C. albicans* podem ser divididas em duas classes principais: candidíase superficial (cutâneo-mucosa) e candidíase sistêmica (SIDRIM, 1999)

A candidíase de mucosas, freqüentes na cavidade oral (orofaringe – “sapinho” e esôfago – esofagite) e vaginal, caracteriza-se pela presença de placas pseudomembranosas (colônias visíveis do fungo) pontuais ou confluentes, eritema (colônias não visíveis). Ainda podem ocorrer queilite angular, e na vagina, prurido e corrimento (van BURIK & MAGEE, 2001).

A candidíase oral pode ser classificada em quatro tipos clínicos distintos de acordo com Sidrim (1999):

1. Candidíase pseudomembranosa: é a manifestação clássica e mais comum de acometimento por leveduras na cavidade oral. As lesões conhecidas no Brasil como “sapinho”, caracterizada pela presença de placas esbranquiçadas, facilmente removidas, na mucosa oral e língua, quando removida por raspagem deixa uma mucosa eritematosa a vista, sendo conhecida como “thrush”. Ocorre com freqüência em crianças e adultos debilitados, como aqueles que possuem leucemia, linfoma, e, às vezes, em diabéticos e portadores de doenças malignas. Outros fatores também predis põem ao problema tais como: antibióticos, corticosteróide e drogas imunossupressoras.
2. Candidíase atrófica aguda: lesão secundária a um quadro de

candidíase pseudomembranosa. É o único tipo de candidíase oral dolorosa, apresentando uma língua lisa e eritematosa, presença de queilite angular, e poucas vezes, lábios e bochechas inflamadas. Está geralmente associada à antibioticoterapia de amplo espectro. É também conhecido como “antibiotic tongue”.

3. Candidíase atrófica crônica: conhecida como “estomatite por prótese” pela ocorrência de um eritema difuso na mucosa do palato e ser recoberta pela prótese total. Neste caso a prótese predispõe a proliferação do fungo. Normalmente é indolor e está associado a queilite angular. Pode-se apresentar com sintomatologia atenuada progressiva e evolui para um estado crônico.
4. Candidíase crônica hiperplásica: a doença leva ao aparecimento de manchas brancas, firmes e persistentes, que não podem ser raspadas e normalmente afetam a língua, bochechas e lábios, evidenciando-se um contorno eritematoso das placas. Este tipo de lesão pode persistir durante anos e é resistente ao tratamento antimicótico. É também conhecida como candidíase leucoplásica.

As infecções cutâneas geralmente são precedidas por traumas na pele ou em regiões úmidas e quentes do corpo, tais como axilas, virilha, “dobras” inframamárias e interglúteas (candidíase intertriginosa). Nas regiões interdigitais, a frequência de candidíase geralmente está associada a repetidas imersões em água, como ocorre com as lavadeiras e nadadores. A infecção de unhas (onicomicose), em geral, é indolor e apresenta um inchaço ao redor das mesmas (MITCHELL, 1998).

A candidíase sistêmica ou visceral pode localizar-se em um órgão ou disseminar-se. Suas manifestações clínicas são bastante variáveis e em geral específicas. Assim, podemos encontrar quadros com sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, cecal, urinária, ocular e do sistema nervoso central. Os fatores predisponentes relacionados ao hospedeiro nesse tipo de disseminação são os seguintes: portadores de doenças que comprometam o sistema imune, idosos, ruptura de barreiras mecânicas. Os fatores relacionados aos microrganismos são: presença de cepas com alto poder de adesão, produção de pseudo-hifas e pseudomicélio, produção de enzimas proteolíticas (SIDRIM 1999).

1.2. Fatores de virulência de *C. albicans*

Microrganismos oportunistas podem manter uma relação comensal e patogênica com seu hospedeiro. Para o estabelecimento da infecção, sinais específicos presentes no hospedeiro são reconhecidos pelo microrganismo e estes podem estar ausentes durante o estado comensal. Em resposta a essas diferenças, o microrganismo pode expressar genes que codificam os fatores de virulência somente durante a infecção. Além disso, esses genes podem ser diferencialmente expressos dependendo da fase e do tipo de processo infeccioso (HUBE, 2004).

Antes de discutir os fatores de virulência deste microrganismo, é importante observar a versatilidade deste fungo como patógeno. Um componente muito importante desta versatilidade é sua capacidade em sobreviver como um comensal em diferentes locais, cada qual com sua própria pressão. Esta capacidade permite que o espectro de doenças causadas por este fungo exceda a maioria dos outros microrganismos comensais (CALDERONI & FONZI, 2001).

Embora a maioria das infecções por *Candida* spp ocorra em resposta a alterações fisiológicas que afetam, principalmente, os sistemas de defesa do hospedeiro (FERNANDES & MACHADO, 1996; WEIG et al., 1998), o microrganismo expressa vários fatores de virulência envolvidos na patogênese, possibilitando que esse fungo mude da fase de comensal para a patogênica. Um desses fatores é a parede celular que confere proteção contra lise osmótica e física, medeia a interação inicial entre o microrganismo e o hospedeiro. Outro fator de virulência é a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lipases), e ainda a capacidade de transição das formas de levedura para hifas além de alteração fenotípica da colônia (*switching* fenotípico) (CUTLER, 1991).

Vários estudos *in vivo* com *C. albicans* mutantes deletados em genes específicos de virulência tem mostrado que nenhum fator de virulência único pode ser identificado como um determinante dominante na patogênese do fungo, é geralmente aceito que a virulência é um evento multifatorial governado pela capacidade do microrganismo se adaptar com eficiência a mudanças ambientais e finalmente coordenar a expressão de vários genes de virulência (CALDERONI & FONZI, 2001).

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura complexa, 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 (~40% do peso seco), associadas covalentemente a proteínas em ligações N e O glicosídicas. Além disso, as paredes celulares contêm proteínas (6 a 25%) e uma porcentagem de lipídios (1 a 7%) (CANNON & CHAFFIN, 1999).

As manoproteínas constituem componente imunodominante presente na parede celular, determinam as propriedades da superfície celular e têm sido associadas à aderência, modulação e supressão da resposta imune celular (KAPTEYN et al., 2000). β -glucanas solúveis obtidas de *C. albicans* induziram baixa produção de interleucina 6 (IL-6) por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em comparação com a produção estimulada por endotoxinas. Células mononucleares do sangue periférico estimuladas por anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 tiveram a produção de interleucina 2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ) significativamente diminuída na presença de β -glucanas solúveis, indicando um papel imunossupressor deste componente de parede do fungo (NAKAGAWA et al., 2003). Segundo Miyakawa et al. (1992), oligossacarídeos presentes na parede celular de *C. albicans* permitem sua ligação às células epiteliais e macrófagos no baço e nódulos linfáticos.

A aderência às células do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e um passo essencial no estabelecimento de infecções, envolve a combinação de mecanismos específicos (adesinas) e não específicos como forças eletrostáticas, agregação e hidrofobicidade (CANNON & CHAFFIN, 1999; COTTER & KAVANAGH, 2000). 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 plásticos, 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 a superfície mais hidrofóbica que as leveduriformes.

Moléculas protéicas que se ligam a receptores de complemento tipo 3 ("CR3-binding protein") presentes na superfície celular de *C. albicans*

reconhecem a seqüência RGD (L-arginina-L-glicina-L-ácido aspártico) de várias proteínas de mamíferos, tais como laminina e iC3b (CALDERONE & BRAUN, 1991). A importância biológica da ligação de iC3b na superfície celular do fungo ainda é desconhecida. Entretanto, ocorre redução da fagocitose de células de *C. albicans* recobertas com essa molécula (PENDRAK & KLOTZ, 1995).

A capacidade de *C. albicans* diferenciar rapidamente e reversivelmente entre levedura e forma filamentosa interfere na patogenicidade (GANTNER et al., 2005) sendo que o crescimento filamentoso traz vantagens durante a interação com o sistema imune de mamíferos (SAVILLE et al., 2003; CALDERONE & FONZI, 2001). Cepas mutantes incapazes de formar hifas são, no geral, avirulentas em modelos experimentais de candidíase mucosa ou disseminada (GOW et al., 2002)

A diferenciação celular da forma leveduriforme para filamentosa (dimorfismo) de *C. albicans* pode ser induzida *in vitro*. Até o momento, nenhum fator específico indutor da diferenciação celular foi identificado. Alguns fatores ambientais podem favorecer a filamentação em *C. albicans*: temperatura entre 37 a 40 °C; pH ao redor de 7,0, células na fase estacionária de crescimento (AHRENS et al., 1983), meio de cultura suplementado com 10 mM de AMPc (BAHN & SUNDSTROM, 2001) e algumas substâncias químicas como N-acetil-D-glucosamina (CHO et al., 1994), aminoácidos, biotina, compostos sulfidrilas, grupo heme, zinco e o soro. E ainda, altas concentrações de fosfato (superior a 600 mM) induzem o desenvolvimento de pseudohifas, que são observadas em baixa freqüência em culturas "in vitro" (HORNBY, et al., 2004).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que cepas de *C. albicans* capazes de formar hifa escapam do macrófago, enquanto cepas incapazes de realizar esta mudança de forma permanecem dentro do macrófago (de BERNARDIS et al., 1993; LO et al., 1997). Blasi et al., (1995) demonstraram que as formas de levedura e hifa de *C. albicans* diferem em sua suscetibilidade à atividade proteolítica dos macrófagos, os autores mostraram que após o contato com macrófagos as leveduras, mas não as hifas, modificavam profundamente os componentes de sua parede celular, com substancial redução ou desaparecimento de muitas proteínas.

Tavanti et al., (2006) demonstraram que isolados de *C. albicans* da cavidade oral de pacientes saudáveis e HIV+ apresentavam diferença na

resistência à morte intracelular e na capacidade de se replicar dentro dos macrófagos. O isolado denominado cariótipo C era mais resistente, e quando analisado ao microscópio esse isolado apresentava-se predominantemente como hifas dentro dos macrófagos enquanto que o cariótipo B, predominantemente blastoconídio. Embora não seja razoável que a morfogênese por si só possa ser responsável pela resistência à morte intracelular do cariótipo C, evidências suportam que um fator chave para a rápida adaptação de *C. albicans* sobreviver e crescer dentro dos macrófagos está situado no sistema desenvolvido por este microrganismo de transição blastoconídio/hifa.

Além da transição levedura-hifa, *C. albicans* é capaz de sofrer um tipo de mudança morfológica denominada *switching* fenotípico, facilmente visualizado através da morfologia da colônia. Esse fenômeno ocorre estatisticamente em baixa frequência e é hereditária (SOLL, 1992). Pomes et al., (1985) demonstraram que baixas doses de luz U.V. resultavam em *switching* de fenótipos de colônias lisas para rugosa e vice versa em altas frequências. Slutsky et. al., (1985) utilizando uma amostra padrão de laboratório denominada 3152A estendeu essas observações e observou que esse sistema pode formar até sete tipos diferentes de colônias, com predomínio das lisas.

O sistema *white-opaque* é o mais estudado. A amostra WO-1, isolada do sangue de paciente com infecção sistêmica, e o fenótipo da colônia altera-se reversivelmente entre branca lisa e opaca rugosa em uma frequência de 10^{-3} (SLUTSKY et al., 1987). Várias diferenças existem entre esses 2 tipos de colônia: as células da fase branca são mais arredondadas ou elipsóides enquanto as da fase opaca são alongadas, em forma de feijão e o brotamento ocorre de forma angular em um dos pólos ou às vezes é bipolar. A superfície das células opacas apresenta protuberâncias do tipo espinhos, no citoplasma são encontrados vacúolos gigantes, somente nas células brancas ocorre germinação a 37°C e pH 6,7 (SLUTSKY et al., 1987; ANDERSON et. al., 1990).

Soll (1988) e Jones et al., (1994) observaram que cepas isoladas de pacientes com vaginite ou com infecções sistêmicas apresentam altas frequências de *switching*. Segundo Molloy, (2006) o *switch* afeta a virulência de *C. albicans*, as células opacas são muito menos eficientes em estabelecer

infecções sistêmicas do que células brancas e o inverso é verdadeiro para infecções na pele.

Outro fator que contribui para o processo de virulência é a produção de enzimas hidrolíticas (aspartil proteinases secretadas, fosfolipases e lipases) as quais têm papel central na patogênese, sendo as aspartil proteinases secretadas (SAPS) as mais comumente associadas à virulência (NAGLIK et al., 2003).

As SAPS de *C. albicans* compõem uma família de pelo menos 10 genes (SAP 1-10), das quais oito são secretadas (Sap1-8) e duas associadas à superfície celular (Sap9 e Sap10) cujas ativação e expressão, ainda não foram totalmente elucidadas. As diferentes Saps parecem exercer diferentes funções em diferentes ambientes (HUBE & NAGLIK, 2001)

A presença da família de genes SAP em *C. albicans* provê o fungo com um sistema proteolítico eficiente e flexível que pode ser vital para o sucesso deste patógeno como oportunista. A produção de Saps é provavelmente um processo bem regulado, ativado em tempos específicos durante a colonização e a infecção para obter o máximo benefício para o fungo (MARDEGAN et al., 2006).

A atividade proteolítica extracelular por SAPS tem importante papel na adesão e invasão por degradar ou distorcer estruturas da superfície das células do hospedeiro, assim como na evasão da resposta imune por destruir células e moléculas do sistema imune do hospedeiro (HUBE & NAGLIK 2001). Sap1 a 6 hidrolisam proteínas do hospedeiro e conseqüentemente causam danos ns tecidos. A aspartil proteinase secretada-2 (Sap2), tem a propriedade de clivar moléculas que protegem a superfície mucosa da célula como mucina e imunoglobulina secretória A (IgA), proteínas da matrix extracelular, além de degradar moléculas importantes na defesa do hospedeiro como lactoferrina, lacotoperoxidase, catepsina D e complemento (NAGLIK et al., 2003; dos SANTOS, 2002).

Sap 4-6 foram detectadas durante a formação de hifas, sendo a Sap5 a primeira a ser secretada durante a formação de hifa, e tiveram suas funções associadas ao desenvolvimento de candidíase disseminada (CHEN et al., 2002). A Sap9 e 10 estão ligadas a processos regulatórios na superfície celular

do fungo que são essenciais durante a interação com tecidos epiteliais (ALBRECHT et al., 2006).

Inibição de Saps com pepstatina-A, uma enzima inibidora de aspartil proteínas inibe a aderência de *C. albicans* às células parênquimais de fígado, baço e pâncreas (KRETSCHMAR et al., 1999) e às células epiteliais de mucosa vaginal (CONSOLARO, et al., 2006) além de prevenir a penetração inicial através da superfície mucosa (NAGLIK et al., 2004).

1.3. Mecanismos de defesa do hospedeiro

Humanos são constantemente expostos aos fungos, mas um número limitado de espécies é capaz de causar severas infecções. A capacidade de provocar danos no organismo hospedeiro, depende não só do patrimônio genético do fungo, mas das condições dos mecanismos de defesa do hospedeiro em se contraporem a infectividade do fungo em diferentes sítios do corpo (ROMANI, 2004).

Os mecanismos de defesa contra infecções fúngicas são numerosos, e abrangem desde mecanismos protetores inespecíficos, que se originaram a partir de organismos multicelulares durante a evolução das espécies (resposta inata), até mecanismos sofisticados, os quais são especificamente ativados durante a infecção e doença (resposta adaptativa) (ROMANI, 2004).

A imunidade está presente em indivíduos adultos imunocompetentes resultado do comensalismo do fungo nas mucosas gastrintestinal do hospedeiro (ROMANI et al., 1996). Como um comensal, *C. albicans* assintomaticamente coloniza a superfície epitelial aparentemente na forma de blastoconídio. Como resultado desta exposição muitos indivíduos saudáveis desenvolvem imunidade específica a *C. albicans* detectável através de testes cutâneos e resposta de linfócitos do sangue periférico contra seus antígenos, assim como anticorpos específicos no soro e secreção mucosa (ODDS, 1988).

A contenção da invasão do patógeno no hospedeiro exige uma resposta rápida, geralmente promovida pelo sistema imune inato, o qual desenvolve prontamente e precede a expansão clonal de linfócitos antígeno específico. O sistema imune inato consiste de células NK, complemento, proteínas plasmáticas e células fagocíticas (ISMAIL et al., 2002) e serve para dois

propósitos principais, um efeito direto antifúngico pela destruição do patógeno e uma função instrutiva nas células do sistema imune adaptativo, através da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, indução de atividades co-estimulatórias e apresentação de antígeno (ROMANI 2004).

Assim, a permanência do fungo como comensal se deve a vários fatores como a pele intacta, que é protegida por células queratinizadas, na superfície mucosa, a presença de mucinas, IgA, numerosas bactérias fazem proteção se alojando ao redor do fungo, impedindo sua adesão, além de que, compartilham nutrientes com outros organismos comensais (SENET, 1997). Modificações nestas barreiras naturais, como aquelas causadas por antibioticoterapia, corticoterapia, quimioterapia, cirurgias, cateterismos, sondas e cateteres, podem disparar a invasão do fungo e o processo patogênico.

Após a infecção muitos mecanismos de defesa são induzidos. A cooperação de células do sistema imune e de seus produtos é necessário para a eliminação da infecção por *C. albicans*. Não há evidências que anticorpos e o sistema complemento possam mediar a lise de *C. albicans*, desta maneira os fagócitos são provavelmente as primeiras células efetoras na resistência a candidíase (VASQUEZ-TORRES & BALISH, 1997). Pacientes com deficiência na imunidade inata como doença granulomatosa crônica ou neutropenia, são extremamente sensíveis a uma variedade de infecções, entre elas as fúngicas (LORENZ & FINK, 2002).

Imunidade inata e a imunidade adaptativa (celular e humoral), estão envolvidas na proteção contra infecção por *C. albicans*. Embora cada uma possa contribuir diferentemente nos diferentes sítios de infecção, a imunidade inata através de macrófagos e neutrófilos domina a proteção contra candidemia, enquanto a imunidade celular ativada, predominantemente por citocinas das células T CD4+ protege as mucosas da infecção. Com relação a imunidade humoral existem controvérsias com dados discordantes entre estudos clínicos e modelos em animais (FIDEL, 2002).

Pacientes com candidíase disseminada podem apresentar anticorpos específicos no soro (ODDS 1988). Além disso, estudos em camundongos com transferência passiva de anticorpos falharam na proteção (BANERJEE et al., 1984). Contudo, contrariamente ao exposto acima, outros estudos têm

mostrado que anticorpos podem aumentar a resistência nas infecções com *C. albicans*. Administração de manana do fungo, encapsulada em lipossomos, resultou na produção de anticorpos que confere resistência a candidíase disseminada (HAN & CUTLER 1995). No soro de pacientes recuperados de candidíase disseminada foi encontrado anticorpos contra proteína hsp90 de *C. albicans* (MATHEWS et al., 1991; MATHEWS & BURNIE, 1992) e esses anticorpos protegeram camundongos contra a doença disseminada. Segundo Lee et al., (2003) na defesa do hospedeiro contra *C. albicans*, o desenvolvimento da resposta Th1 é crítica e a presença de anticorpos específicos pode aumentar esse mecanismo de defesa por opsonizar o patógeno e facilitar a fagocitose. A resposta humoral, decorrente da resposta Th2 pode se contraproduzida uma vez que compete com a indução inicial da resposta Th1 e não porque leva a produção de anticorpos que são inúteis para a resistência, uma vez que autores têm demonstrado que a transferência passiva de anticorpos pode beneficiar o hospedeiro contra candidíase.

O reconhecimento do fungo invasivo pelo sistema imune inato é o primeiro passo na ativação da resposta imunológica rápida e assegura a sobrevivência após a infecção, confere rápido reconhecimento de um amplo espectro de patógenos, por reconhecer componentes de padrões moleculares típicos de microrganismos (PAMPs), usando limitado repertório de proteínas codificadas na fase germinativa, os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (GIL & GOZALBO 2006), como receptores de manose, receptores "Toll-like" (TLRs), receptores de varredura e receptor dectin-1 (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). Fagócitos expressam também receptores para complemento (CR) e anticorpos (FcR), e vários pesquisadores tem demonstrado que a fagocitose de *C. albicans* por fagócitos mononuclear é aumentada quando as leveduras estão opsonizadas com soro normal (VASQUEZ-TORRES & BALISH 1997; GAZIRI et al., 1999; dos SANTOS et al., 2002).

Receptores de manose presentes na superfície de macrófagos reconhecem superfície rica em manana, sendo especialmente importante na fagocitose de *C. albicans*. A expressão aumentada de receptores de manose devido a M-CSF (KARBASSI et al., 1987); INF- γ (MARODI & JOHNSTON, 1993), Concanavalina-A (LOYOLA et al., 2002) tem melhorado a capacidade

fagocítica de macrófagos. Yamamoto et al., 1997 demonstraram que a fagocitose de levedura através do receptor de manose resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, degradação do fungo e estímulo de moléculas co-estimulatórias, moléculas de MHC classe II e ativação de resposta celular protetora Th1.

Estudos recentes tem demonstrado o envolvimento crucial dos TLRs no reconhecimento de *C. albicans*, sendo que TLR2 e TLR4 são os principais TLRs envolvidos no reconhecimento deste fungo (NETEA et al., 2002; NETEA et al., 2004; VILLAMÓN et al., 2004; GIL & GOZALBO, 2006).

Villamón et al., (2004) demonstraram que camundongos *knockout* TLR2^{-/-} sobreviviam menos à infecção com *C. albicans* do que camundongos normais, apresentando baixa produção de TNF- α e de quimiocina MIP-2 e camundongos *knockout* em TLR4^{-/-} também se mostraram mais suscetíveis à infecção por *C. albicans*, contudo nestes a suscetibilidade estava relacionada à baixa expressão de quimiocinas e falha no recrutamento de neutrófilos.

A ligação de distintos receptores para levedura e para hifa define a natureza da resposta efetora, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a co-estimulação (ROMANI et al., 2002; NETEA et al., 2006). Quando hifas ou leveduras opsonizadas são fagocitadas com envolvimento do receptor CR3 em associação com receptor Fc γ , resulta no aumento de moléculas co-estimulatórias e MHC II e produção de IL-4 e/ou IL-10 e ativação de células Th2 (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

van de Graaf et al., (2005) demonstraram que blastoconídios e hifas de *C. albicans* diferem no estímulo da resposta no hospedeiro, sendo que blastoconídios estimulam ambos receptores TLR2 e 4 sendo o último responsável pela grande produção de INF- γ por monócitos e de TNF- α por macrófagos peritoneais, enquanto hifas não foram reconhecidas por TLR4, e induziram grande produção de IL-10 através do TLR2, mas não a produção de INF- γ .

Brown & Gordon (2001) identificaram em macrófagos o receptor dectin-1 para β -glucana. Recentemente foi demonstrado que quando macrófagos são incubados com blastoconídio de *C. albicans* ocorre fagocitose dos blastoconídios, a secreção de TNF- α , IFN- γ , aumento na produção de

superóxido e da capacidade fungicida, com envolvimento de dectin-1, TLR2 e 4. No entanto, na fagocitose de hifas o receptor dectin-1 não está envolvido, resultando em uma resposta antiinflamatória, como a produção de citocinas como IL-10, reduzida produção de superóxido e capacidade fagocítica diminuída (GANTNER et al., 2005).

Macrófagos são geralmente as primeiras células a interagir com corpos estranhos, por estarem presentes nas portas de entrada do organismo. Dependendo do receptor utilizado e do estágio de diferenciação estas células podem produzir vários produtos secretórios, incluindo citocinas e quimiocinas que mobilizam outras células para o tecido (GORDON, 1998).

Farah et al., (2001), demonstraram em modelo experimental de candidíase oral, que a inativação de macrófagos por carragenina causava aumento na severidade da infecção nos primeiros oito dias. Do mesmo modo, a eliminação de macrófagos esplênicos murinos, através da administração intravenosa da droga difosfato de diclorometileno, aumentou a suscetibilidade a infecções disseminadas por *C. albicans*, e redução do tempo de sobrevivência destes animais (QIAN et al., 1994).

Macrófagos nem sempre tem sua capacidade fagocítica associada a sua capacidade de destruir microrganismos invasores. A fagocitose de *C. albicans*, quando não acompanhada de morte do fungo, pode favorecer a disseminação deste patógeno, pois os macrófagos não ativados, além de servir como veículos para a sua disseminação protege o fungo de outros mecanismos de resposta imune inata (VASQUES-TORRES & BALISH, 1997).

A atividade candidicida de macrófagos contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* foi estudada usando-se fagócitos residentes peritoneais, estimulados com injeção de lipopolissacarídeos (LPS) ou obtidos de animais infectados pelo bacilo de Calmete-Guerin (BCG). Os macrófagos residentes mataram em torno de duas a três vezes menos *C. albicans* do que aqueles ativados por LPS ou BCG (SASADA & JOHNSTON 1980). As glicanas presentes na parede celular de *C. albicans*, estimulam a produção de ânion superóxido (O_2^-) e peroxinitrito pelos macrófagos do exsudato peritoneal (VASQUES-TORRES et al., 1996).

A ativação dos macrófagos confere ao hospedeiro maior resistência à infecção, pelo aumento de sua capacidade fungicida, seja pelo aumento de

receptores em sua superfície ou pela produção de substâncias de ação microbicida, sendo considerados como principais células efetoras contra infecção por patógenos intracelulares facultativo. Macrófagos ativados aumentam a produção de reagentes oxidativos intermediários (ROI) e reagentes nitrogenados intermediários (RNI), aumentando a atividade microbicida, além de apresentar um aumento na produção de citocinas, como interleucina 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).

A ativação de macrófagos pode ocorrer também pela ação de lectinas de origem vegetal, tais como Concanavalina-A (Con-A) e Jacalina (JCA). Camundongos tratados previamente com Con-A ou JCA apresentaram aumento da atividade fagocítica e candidacida nos macrófagos da cavidade peritoneal e tinham sua capacidade de depurar o inóculo de *C. albicans* da cavidade peritoneal, diminuindo a disseminação do patógeno nas vísceras, este efeito foi atribuído à ativação não específica de imunidade mediada por célula (FELIPE et al., 1995; GAZIRI, et al., 1999; MORESCO et al., 2002; LOYOLA et al., 2002). O mesmo efeito protetor foi verificado em camundongos previamente tratados com Con-A e inoculados intraperitonealmente com *Serratia marcescens*, (ARRAES et al., 1997), quando os macrófagos foram eficientes em fagocitar e destruir este patógeno. Segundo Bertram et al., 1997, a Con-A se liga diretamente a carboidratos na região constante na molécula MHC e no receptor TCR das células T auxiliares e induz a ativação policlonal dos linfócitos, estimula, entre outras citocinas, a liberação de IFN- γ . Quando este mitógeno é administrado pela veia da calda de camundongos induz no fígado a expressão de mRNA de IL-2, IFN- γ e TNF- α (OKAMOTO & KOBAYASHI 1997). Contudo, Tagawa et al., (1997) e Trautwein et al., (1998), demonstraram que altas doses de Con-A causavam exacerbação da resposta Th1 e injúria no fígado pelo excesso de produção de IFN- γ e TNF- α , os quais induzem destruição dos hepatócitos por apoptose.

Neutrófilos constituem um dos principais mecanismos de defesa contra candidíase invasiva disseminada, atuando tanto em blastoconídios intracelularmente, como em hifas extracelularmente (ROILIDES et al., 1992).

Segundo Mencacci et al., (1999), a capacidade de *C. albicans* estabelecer uma infecção disseminada no hospedeiro envolve a neutropenia como fator predisponente principal, enquanto a capacidade do fungo para persistir no organismo envolve, principalmente, depressão da imunidade celular adaptativa no hospedeiro.

Estas células são capazes de fagocitar microorganismos, incorporando-os em seus fagolisossomos e destruindo-os intracelularmente. São células que ao lado de outros polimorfonucleares, produzem grandes quantidades de produtos tóxicos derivados de oxigênio (ROI), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e anion superóxido (O_2^-) via sistema NADPH-oxidase, que destroem os microrganismos através de diversos mecanismos, como liperoxidação de membrana e danos irreversíveis ao DNA (MARÓDI et al., 1998).

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, a “horseradish” peroxidase (HRS) e a mieloperoxidase (MPO) que converte o H_2O_2 em ácido hipocloroso (HOCL). A reação do HOCL com aminas primárias ou outros compostos contendo nitrogênio resulta na produção de monoclaramina, outro poderoso agente oxidante gerado pelo sistema MPO- H_2O_2 (MARÓDI et al., 1998).

Na depleção de neutrófilos, em modelos de candidíase oral, a doença se agravou nos primeiros dias da infecção, mostrando a importância dessas células na defesa inicial do hospedeiro contra *C. albicans* (FARAH et al., 2001).

Loyola et al., (2002) demonstraram que a chegada precoce de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos, observada 6 horas após administração de Concanavalina-A (Con-A), foi importante para a redução do inóculo dos animais infectados com *C. albicans*. Os autores demonstraram também que a catalase, administrada junto com *C. albicans* inibia a redução do inóculo, sugerindo que a formação do ácido hipocloroso constitui um

mecanismo muito importante na morte do fungo, e que dentre os vários mecanismos candidíaca empregados este era o mais importante. Para a formação do ácido hipocloroso é necessária a produção de mieloperoxidase por neutrófilos a qual necessita do substrato H_2O_2 e cloro para a síntese deste composto.

As células dendríticas são capazes de reconhecer e internalizar ambos, blastoconídios e hifas de *C. albicans*. Estas células expressam vários receptores, incluindo receptores para vários componentes do sistema complemento (CR), receptores para Fc ($Fc\gamma R$) e receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os TLRs e RM. São as principais células conectoras da resposta imune inata e adaptativa (ROMANI et al., 2002). O reconhecimento das formas em levedura envolve a cooperação dos receptores de manose e receptor CR3, enquanto a fagocitose de hifas envolve a cooperação dos receptores CR3 e $Fc\gamma$. Uma vez dentro dos fagócitos ocorre a degradação das leveduras enquanto as hifas podem ser encontradas livres no citoplasma (ROMANI, 2004). Contudo, as leveduras podem sobreviver dentro do fagossoma se forem internalizadas via CR3. Jouault et al., (1998) haviam demonstrado que *C. albicans* possui moléculas que medeiam a interação via CR3, mas não ocorria produção de óxido nítrico, quando a levedura era fagocitada por esta via, possibilitando a sobrevivência do fungo, enquanto a entrada da levedura pelo receptor de manose resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-12, degradação do fungo e aumento de moléculas coestimulatórias (ROMANI et al., 2002).

Embora, no geral, fagócitos apresentem atividade antifúngica intrínseca, esta atividade pode ser melhorada por opsoninas e citocinas inflamatórias em particular $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, as quais por sua vez podem ser moduladas por *C. albicans*.

Os níveis locais de citocinas são grandemente derivados de células T, assim, a resistência a candidíase requer a ação coordenada da defesa imune inata com a adaptativa (MARÓDI et al., 1991; GIL & GOZALBO, 2006). Dois grupos diferentes de células T $CD4^+$ foram descritos (Th1 e Th2) e apresentam funções antagonistas. Células Th1 ativam os fagócitos para um estado fungicida enquanto aquelas produzidas por células Th2 exacerbam a doença

por desativarem propriedades protetoras das células fagocíticas contra os fungos (ROMANI 2004).

Células Th1 e Th2 se desenvolvem a partir de um precursor comum célula T CD4+ “naive”, cuja diferenciação na candidíase murina depende de vários fatores como: cepa de *C. albicans*; resistência ou suscetibilidade do hospedeiro; via de infecção; produção de moléculas coestimuladoras; presença de citocinas no local (MENCACCI et al., 2000).

Camundongos geneticamente modificados suscetíveis (BDA/2 Cr) e resistentes (BALB/cCr) a *C. albicans* foram utilizados para a avaliação do desenvolvimento de respostas Th1 e Th2. Estes animais foram inoculados com cepas de baixa e alta virulência, os animais resistentes desenvolveram hipersensibilidade do tipo tardia (HTT), juntamente com produção de citocinas IL-2 e INF- γ , baixa produção de anticorpos IgA, IgG1 e IgE, ausência de eosinofilia e alta taxa de sobrevivência em comparação aos animais suscetíveis. Animais suscetíveis possuíam células T com alta produção de citocinas ligadas a um padrão tipo Th2, IL-4 e IL-10 e presença de eosinofilia após poucos dias de infecção (ROMANI et al., 1993).

A função crucial de citocinas pró-inflamatórias na defesa contra *C. albicans* tem sido demonstrada pelo aumento de suscetibilidade de camundongos “knockout” para IL-2 e INF- γ (KÁPOSZTA et al., 1998; NETEA et al., 1999). Em contraste, citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 tem efeito imunossupressivo (TONNETII et al., 1995). Após a ativação de populações de leucócitos pela *C. albicans*, a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e INF- γ , é o primeiro passo para a ativação da resposta imune anticandidíase. Citocinas pró-inflamatórias ativam macrófagos e neutrófilos a fagocitar o fungo e a liberar radicais tóxicos de oxigênio e nitrogênio, eliminando então o patógeno invasor (KULBERG et al., 1993).

TNF- α é uma citocina de 17-kDa produzida em resposta a infecção fúngica na fase inicial da infecção estimulada por *C. albicans* (VECCHIARELLI et al., 1991). Macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos T e B secretam TNF- α , contudo, os macrófagos são as principais fontes de TNF- α *in vivo*. Esta citocina exerce várias atividades biológicas

incluindo proliferação e diferenciação celular, apoptose, citotoxicidade, inflamação e imunomodulação (DEROUCHE-GUERGOUR et al., 2001).

Estudos *in vitro* demonstraram que o TNF- α pode ativar macrófagos e neutrófilos, levando ao aumento do “burst oxidativo”, da fagocitose e da atividade fungicida (DJEU et al., 1986, FERRANTE, 1989; JUPIN et al., 1989; SHALABY et al., 1985). TNF- α também estimula a expressão ou medeia a atividade de várias outras moléculas envolvidas na defesa contra *C. albicans*, por exemplo, células endoteliais respondem a infecção *in vitro* com *C. albicans* expressando E-selectina, molécula de adesão vascular celular (VCAM-1), molécula de adesão intercelular (ICAM-1), e secretando IL-8 e fator ativador de plaquetas (PAF), que participam no recrutamento de leucócitos no local da infecção (OROZCO et al., 2000; IM et al., 1997).

A função do TNF- α na proteção do hospedeiro, em candidíase disseminada, tem sido demonstrada por estudos com camundongos cujas cópias do gene de TNF- α tem sido deletado. Quando desafiados intravenosamente, com *C. albicans*, todos os camundongos TNF- $\alpha^{-/-}$ morreram, enquanto todos os camundongos tipo selvagem sobreviveram (MARINO et al., 1997). Na candidíase orofaríngea, Farah et al., (2006) verificaram, em infecção experimental oral, que camundongos TNF- $\alpha^{-/-}$, apresentaram aumento na severidade da infecção.

Em outro estudo, a neutralização de TNF- α por anticorpos anti TNF- α aumentou a severidade no curso de infecção experimental, rins e baço se apresentavam densamente colonizados e os animais apresentavam menos tempo de sobrevivência após a infecção (LOUIE, et al., 1994).

TNF- α induz ainda a produção de outras citocinas como IL-6 e IL-1, que podem participar na resposta do hospedeiro no curso da infecção sistêmica por *C. albicans*. A administração de TNF- α exógeno aumenta a resistência à infecção, enquanto a inibição desta citocina endógena diminui a resistência (LOUIE et al., 1994)

A liberação de TNF- α por macrófagos, durante a fase inicial da resposta inflamatória ao fungo, atrai e ativa neutrófilos para um estado efetor antifúngico (DIAMOND et al., 1991). Mencacci et al., 1998 demonstraram que TNF- α

também era requerido para a expressão ótima de moléculas coestimulatórias nas células fagocíticas e para a resposta a IL-12 nas células CD4+. Contudo, durante a fase mais tardia da infecção, quando o fungo prolifera rapidamente, níveis muito elevados de TNF- α afetam negativamente a rede de citocinas, resultando, às vezes, em choque séptico (WALLEY et al., 1996).

Ohmura et al., (2001) em modelo experimental de infecção intraperitoneal verificaram que camundongos previamente estimulados com um polissacarídeo ligado à proteína (PSK), apresentavam maior taxa de sobrevivência contra infecção letal por *C. albicans*, sendo que o mecanismo protetor era devido principalmente à produção de TNF- α .

Entre as citocinas do tipo Th1, IFN- γ é um potente ativador de fagócitos (NETEA et al., 1999). Neutrófilos tratados com IFN- γ aumentam significativamente a explosão metabólica oxidativa em resposta a pseudo-hifas e hifas de *C. albicans* opsonizadas ou não e a blastoconídios opsonizados, aumentando a produção de peróxido de hidrogênio (STEVENHAGEN & van FURTH et al., 1993) e induzindo a produção de óxido nítrico por macrófagos (CENCI et al., 1993), influenciada na sobrevivência de camundongos na candidíase invasiva (KÁPOSZTA et al., 1998; YAMAMOTO et al., 1997), contudo a produção dessa citocina por tempo prolongado pode levar à superprodução de TNF- α (VAZQUES-TORRES & BALISH, 1997).

INF- γ atua também na diferenciação das células Th. Romani et al., (1992) verificaram que a neutralização de INF- γ impediu o desenvolvimento da resposta protetora Th1. A citocina IL-12, segundo Romani et al., (1994a), também tem um papel essencial na expansão preferencial de células protetoras Th1. Os autores verificaram que transcritos de IL-12 eram constantemente expressos em macrófagos de camundongos resistentes, mas não de camundongos suscetíveis a *C. albicans*. Utilizando anticorpos neutralizadores de IL-12, Romani et al., (1994b) verificaram que camundongos resistentes perdiam a capacidade de desenvolver uma resposta protetora Th1 com produção de citocinas Th2 como IL-4.

Outras citocinas como IL-1, IL-8 estão envolvidas na resposta a *C. albicans*, Van't Wout et al.,(1988) demonstraram que o tratamento profilático de camundongos com IL-1 β aumenta o número de neutrófilos no tecido infectado,

aumenta a resistência na candidíase sistêmica, e ainda a administração de IL-1 β e IL-1 α protege camundongos neutropênicos da infecção letal de *C. albicans*.

Citocinas do tipo Th2 como IL-4 e IL-10 estão relacionadas à progressão e exacerbação da candidíase (CENCI et al., 1993). A IL 10 foi primeiramente descrita como uma citocina que apresentava potente atividade anti-inflamatória (MOSMANN, 1994), sendo o principal inibidor da resposta inata e inflamatória e um imunoregulador do desenvolvimento de células Th. Vários autores tem demonstrado que a exposição de fagócitos a essa citocina inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a liberação de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio. Fiorentino et al., (1991) e Bogdan et al., (1991) demonstraram que IL-10 exerce função na resposta inflamatória aguda, os autores verificaram que macrófagos estimulados com LPS e/ou INF- γ diminuíram significativamente a produção das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α . Camundongos susceptíveis (BDA/2) inoculados com uma cepa atenuada de *C. albicans* apresentaram altos níveis de produção de IL-10, inibição de morte do fungo via NO e desenvolvimento de resposta Th2, quando esta citocina era neutralizada ocorria aumento na produção de ON (ROMANI et al., 1994c).

Ding & Shevach (1992) demonstraram que esta citocina não promove diretamente o desenvolvimento de Th2, mas atua nas células indiretamente por reduzir a expressão de moléculas coestimuladoras e produção de citocinas por células da imunidade inata, como a inibição da produção de IL-12 durante o estímulo antigênico primário, o que por sua vez inibe a secreção de IFN- γ prevenindo subsequente o desenvolvimento de resposta imune mediada por Th1. Del Sero et al., (1999) em experimentos com camundongos deficientes em IL-10 demonstraram ser estes mais resistentes a infecção por *C. albicans* do que os camundongos selvagem. O aumento na resistência estava associado com a regulação da resposta antifúngica inata e Th1, com um aumento na produção de IL-12, ON, TNF- α e de IFN- γ por células T CD4+.

Contudo, a produção de níveis fisiológicos de IL-10 é necessária para proteção ideal da resposta a *C. albicans*, uma vez que inibe a síntese excessiva de citocinas pró-inflamatórias por células inflamatórias (DAÍ et al., 1997).

Células T CD8+ não são consideradas efetivas no mecanismo de defesa contra *C. albicans*. Contudo, Beno et al., (1995) demonstraram que essas células obtidas de camundongos “naive” estimuladas com IL-2 possuíam a capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans in vitro*.

Um claro entendimento dos diferentes mecanismos de defesa envolvidos na infecção por *C. albicans* é essencial para o desenvolvimento de estratégias tanto em prevenção e controle como tratamento das infecções por este fungo. Conforme o exposto, mecanismos da resposta imune inata e adquirida formam um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual numerosas células e moléculas funcionam coletivamente. A resposta imune inata é de suma importância na resolução da doença além de influenciar o tipo de resposta específica que se desenvolverá subsequente. Igualmente a resposta imune adquirida pode intervir durante a imunidade inata, uma vez que citocinas produzidas por células Th modulam a ação de células efetoras. Os fagócitos participam em ambas as interações e foi relatado que a utilização de moduladores da resposta imune produzem efeitos anti infecciosos por modificar a resposta do hospedeiro a microorganismos patogênicos (OHMURA et al., 2001, FELIPE et al., 1995; GAZIRI, et al., 1999; MORESCO et al., 2002; LOYOLA et al., 2002). Neste trabalho, com base no exposto, o imunomodulador de escolha foi a concanavalina-A e a análise da produção de TNF- α , o potencial fagocítico e a capacidade de depuração do patógeno foram realizados no curso inicial da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL: Avaliar o efeito do imunomodulador Concanavalina-A no modelo experimental em camundongos na infecção intraperitoneal do isolado CR15 de *Candida albicans*.

2.2. ESPECÍFICOS: - Avaliar o efeito da Con-A na sobrevivência dos camundongos após infecção intraperitoneal com *C. albicans*,

- Determinar a atividade de alanina transferase no plasma de camundongos infectados com *C. albicans* após pré tratamento com Con-A,

- Avaliar a capacidade fagocítica e candidacida dos macrófagos peritoneais infectados com *C. albicans* previamente tratados com Con-A,

- Quantificar a recuperação de *C. albicans* do exsudado, baço, fígado e rins no curso inicial da infecção,

- Estimar a concentração da citocina TNF- α liberada no exsudato peritoneal, baço e fígado durante o curso da infecção.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAD, S.J., DE LIMA, R.V., SAWAN, Z.T.E., SILVA, M.L.G., SOUZA, M.A.H., SALDANHA, J.C., FALCO, V.A.A., DA CUNHA, A.H., MURTA, E.F.C. (2001) Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. **São Paulo Med. J.**, 119(6): 200-205

ADEREM, A. & UNDERHILL, D.M. (1999). Mecanismos of phagocytosis in macrophages. **Ann. Rev. Immunol.**, 17: 593-623.

AHRENS, J.C., PRICE, M.R., DANEO-MOORE, L., BUCKEY, H.R. (1983). Effect of culture density on the kinetics of germ tube formation in *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, 129: 3001-3006.

ALBRECHT, A., FELK, A., PICHOVA, I., NAGLIK, J.R., SCHALLER, M., de GROOT, P., MAcCALLUN, D., ODDS, F.C., SCHAFE, W., KLIS, F., MONOD, M., HUBE, B. (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **J. Biol. Chem.**, 281(2): 688–694.

ANDERSON, J., MIHALIK, R., SOLL, D.R. (1990). Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. **J. Bacteriol.**, 172(1): 224-235.

ARRAES, S.M.A.A., GAZIRI, L.C.J., VIDOTTO, M.C., SARIDAKIS, H.O., FELIPE, I. (1997). Pre-treatment with concanavalin-A increases resistance of mice to peritoneal infection by *Serratia marcescens*. **J. Med. Microbiol.**, 46: 251-255.

BAHN, Y.S. & SUNDSTROM, P. (2001). CAP1, an adenylate cyclase associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. **J Bacteriol.**, 183: 3211–3223.

BANERJEE, U., MOHAPATRA, L.N., KUMAR, R. (1984). Role of antibody against candidiasis. **Indian J. Med. Res.**, 79: 760-765.

BENO, A.G., STOVER, A.G., MATHEWS H.L. (1995). Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes. **J. Immunol.**, 154: 5273-5281.

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. **Developmental & Comparative Immunology**, 21(3): 299-310.

- BLASI, E., PITZURRA, L., PULITI, M., CHIMIENTI, A.R., MAZZOLLA, R., BARLUZZI, R., BISTONI, F. (1995). Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds **Infect. Immun.** 63(5): 1806-1809.
- BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. (1991). Macrophage deactivation by Interleukin 10. **J. Exp. Med.** 175: 1547-1555.
- BROWN, G.D. & GORDON, S. (2001). A new receptor for beta-glucans. **Nature**, 413:36-37.
- CALDERONE, R.A. & BRAUN, P.C. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, 55(1): 1-20.
- CALDERONE, R.A. & FONZI, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, 9(7): 327-335.
- CANNON, R.D. & CHAFFIN, W.L. (1999). Oral colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, 10: 359-383.
- CENCI, E., MENCACCI, A., SPACCAPELLO, R., TONNETTI, L., MOSCI, P., ENSSLE, K.H., PUCCHETTI, P., ROMANI, L., BISTONI, F. (1995). T helper cell type 1 (Th1) and Th2 like responses are present in mice with gastric candidiasis but protective immunity is associated with Th1 development. **J. Infect. Dis.**, 171: 1279-1288.
- CENCI, E., ROMANI, L., MENCACCI, A., SPACCAPELO, R., SCHIAFFELLA, E., PUCCHETTI, P., BISTONI, F. (1993). Interleukin-4 an inerleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. **Eur. J. Immunol.**, 23: 1034-1038.
- CHEN, Y., WU, C., CHUNG, W. LEE, F.S. (2002). Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. **Microbiology**, 148: 3743-3754.
- CHO, T., HAMATAKE, H., KAMINISHI, H., WATANABE, K. (1994). The relationship between the upatke glucose system and growth cessation in *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, 32: 461-466.
- COLOMBO, A.L. & GUIMARÃES, T. (2003). Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36 (5): 599-607.
- COLOMBO, A.L. (2000). Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Braz. J. Infect. Dis.**, 4: 113-118.
- 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.**, 8: 2816-2823.
- CONSOLARO, M.E.L., GASPARETTO, A., SVIDZINSKI, T.I.E., PERALTA, R.M. (2006). Effect of pepstatin A on the virulence factors of *Candida albicans*

strains isolated from vaginal environment of patients in three different clinical conditions. **Mycopathol.**, 162: 75-82.

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

CUTLER, J.E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annu. Rev. Microbiol.**, 45: 187-218.

DAÍ, W., KOHLER, G., BROMBACHER, F. (1997). Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10-deficient mice. **J. Immunol.**, 158: 2259-2267.

de BACKER, M.D.; MAGEE, P.T., PLA, J. (2000). Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. **Ann. Rev. Microbiol.**, 54: 463-498.

de BERNARDIS, F., CASSONE, A., STURTEVANT, J., CALDERONE, R. (1993). Expression of *Candida albicans* SAP1 e SAP2 in experimental vaginitis. **Infection and Immunity**, 63(5): 1887-1892.

DEL SERO, G., MENCACCI, A., CENCI, E., d' OSTIANI, C.F., MONTAGNOLI, C., BACCI, A., MOSCI, P., KOPF, M., ROMANI, L. (1999). Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. **Microbes and Infection**, 1: 1169-1180.

DEROUICH-GUERGOUR, D., BRENIER-PINCHART, M., AMBROISE-THOMAS, P., PELLOUX, H. (2001). Tumor necrosis factor α receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. **Intern. J. Parasitol.**, 31: 763-769.

DIAMOND, R.D., LYMAN, C.A., WYSONG, D.R. (1991). Disparate effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on early neutrophil respiratory burst and fungicidal response to *Candida albicans* hyphae in vitro. **J. Clin. Invest.**, 87: 711-720.

DING, L. & SHEVACH, E.M. (1992). IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. **J. Immunol.**, 148 (10): 3133-3139.

DJEU, J.Y., BLANCHARD, D.K., HALKIAS, D., FRIEDMAN, H. (1986). Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, 137 (9): 2980-2984.

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.**, 33: 79-83.

FARAH, C.S., ELAH, S., PANG, G., GOTJAMANOS, T., SEYMOUR, G.J., CLANCY, R.L., ASHAMN, R.B.T. (2001). T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. **Infect. Immun.**, 69: 6110-6118.

FARAH, C.S., HU, Y., RIMINTON, S., ASHMAN, R.B. (2006) **Oral Microbiology Immunology**, 21: 252-255.

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

FERNANDES, C.E. & MACHADO, R.B. (1996). Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. **Rev. Bras. Medicina – GO**, 7:100-104.

FERRANTE, A. (1989). Tumor necrosis factor alfa potentiates neutrophil antimicrobial activity: Increased fungicidal activity against *Touloopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release. **Infect. Immun.**, 57(7): 2115-2122.

FERRAZZA, M.H.S.H; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L.; SHINOBU, C.S., SVIDZINSKI, T.I.E.; BATISTA, M.R. (2005). Characterization of yeasts isolated from the vagina and their association with vulvovaginal candidíasis in two cities of the South of Brazil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, 27(2): 58-63.

FIDEL Jr., P.L & SOBEL, J.D. (1996). Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 9(3): 335-348.

FIDEL Jr., P.L. (1999). Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site-specific differences. **Rev. Iberoam. Micol.**, 16: 8-15.

FIDEL Jr, P.L. (2002). The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal model. **Int. Rev. Immunol.**, 21(6): 515-548.

FIORENTINO D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M., O'GARRA, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, 147(11): 3815-3822.

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

GAZIRI, G., GAZIRI, L.C.J., KIKUCHI, R., SCANAVACCA, J., FELIPE, I. (1999). Phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalin-A activated peritoneal macrophages. **Medical Mycology**, 37: 195-200.

GIL, M.L. & GOZALBO, D. (2006). TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. **Microbes and Infection**, 1-6.

GORDON, S. (1998). The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunol.**, 149(7-8): 685-6888.

GOW, N.A.R.; BROWN, A.J.P., ODDS, F.C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. **Curr. Opin. Microbiol.**, 5: 366-371.

GREENFIELD, R.A. (1992). Host defense system interactions with *Candida*. **J. Med. Vet. Mycol.**, 30(2): 89–104.

HAN, Y. & CUTLER, J.E. (1995). Antibody response that protects against disseminated candidiasis. **J. Biol. Chem.**, 63: 2714-2719.

HORNBY, J.M.; DUMITRU, R., NICKERSON, K.W. (2004). High phosphate (up to 600 mM) induces pseudohyphal development in five wild type *Candida albicans*. **J. Microbiol. Meth.**, 56: 119-124.

HUBE, B. & NAGLIK, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, 147:1997-2005.

HUBE, B. (2004). From comensal to pathogen: stage- and tissue specific gene expression of *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, 7: 336-341.

IM, S.Y., CHOI, J.H., KO, H.M. (1997). A protective role of platelet-activating factor murine candidiasis. **Infect. Immun.**, 65: 1321-6.

ISMAIL, N., OLANO, J.P., FENG, H., WALKER, D.H. (2002). Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**. 207: 111-120.

JARVIS, W.R. (1995). Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. [Clin Infect Dis.](#), 20(6): 1526-1530.

JOHNSON, A (2003). The biology of mating in *Candida albicans*. [Nat Rev Microbiol.](#), 1(2): 106-116.

JONES, S., WHITE, G., HUNTER, P.R. (1994). Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. **J. Clin. Microbiol.**, 32(11): 2869-2870.

JONES, T., FEDERSPIEL, N.A., CHIBANA, H., DUNGAN, J., KALMAN, S., MAGEE, B.B., NEWPORT, G., THORSTENSON, Y.R., AGABIAN, N., MAGEE, P.T., DAVIS, R.W., SCHERER, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101(19): 7329-7334.

JOUAULT, T., FRADIN, C., TRINEL, P.A., BERNIGAUD, A., POULAIN, D. (1998). Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. **J. Infect. Dis.**, 178(3): 792-802.

JUPIN, C., PARANT, M., CHEDIDS, L. (1989). Involvement of reactive oxygen metabolites in the candidacidal activity of human neutrophils stimulated by muramyl dipeptide or tumor necrosis factor. **Immunobiology**, 180(1): 68-79.

KÁPOSZTA, R., TREE, P., MARÓDI, L., GORDON, S. (1998). Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4- deficient mice: role of macrophage in host defense against *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, 66: 1708-1717.

KAPTEYN, J.C., HOYER, L.L., HECHT, J.E., MUÉLLER, W.H., ANDEL, A., VERKLEIJ, A.J., MAKAROW, M., ENDE, H.V., KLIS, F.M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. **Molecular Microbiology**, 35(3): 601-611.

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.**, 139(2): 417-421.

KLEIN, R.S., HARRIS, C.A., SMALL, B., MOLL, B., LESSER, M., FRIEDLAND, G.F. (1984). Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 311: 354-357.

KOBAYASHI, S.D. & CUTLER, J.E. (1998). *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? **Trends in Microbiol.** 6(3): 92-94.

KRETSCHMAR, M., HUBE, B., BERSTSCH, T., SANGLARD, D., MERKER, R., SCHRÖDER, M., HOF, H., NICHTERLEIN, T. (1999). Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infect. Immun.**, 67(12): 6637-6642.

KULBERG, B.J., VAN'T WOUT, J.W., HOOGSTRAATEN, C., van FURTH, R. (1993). Recombinant interferon-g enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. **J. Infect. Dis.**, 168: 436-443.

KUMAMOTO, C.A. & VINCES, M.D. (2005). Alternative *Candida albicans* Lifestyles: Growth on Surfaces. **Ann. Rev. Microbiol.**, 59:113-133.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. (1998). In: The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

LACAZ, C. S. (2002). Tratado de micologia médica: LACAZ. São Paulo: Editora Sarvier.

LANGERMANS, J.A.M., VANDERHULST, M.E.B., NIBBERING, P.H., HIEMSTRA, P.S., FRANSEN, L., van FURTH, R (1992). IFN-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . **J. Immunol.**, 148: 568-574.

LEE, S.J., ZHENG, N., CLAVIJO, M., NUSSENZWEIG, M.C. (2003). Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. **Infect. Immun.**, 71(1): 437-445.

LO, H.J.; KOHLER, J.R.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A., FINK, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, 90: 939-949.

LORENZ, M.C. & FINK, G.R. (2002). Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. **Eukaryotic Cell**, 1(5): 657-662.

LOUIE, A., BALTCH, A.L.; SMITH, R.P. (1994). Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. **Infect. Immun.**, 62: 2761-72.

LOYOLA, W., GAZIRI, D.A., GAZIRI, L.C.J., FELIPE, I. (2002). Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **Fems Immunology and Medical Microbiology**. 33: 201-208.

MARDEGAN, R. de C., FOGLIO, M.A., GONÇALVES, R.B. HÖFLING, F.J.F. (2006). *Candida albicans* proteinases. **Braz. J. Oral**, 5(16): 944-952.

MARINO, M.W., DUNN, A., GRAIL, D. (1997). Characterization of Tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94: 8093-8

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

MARÓDI, I., KORCHAK, H.M., JOHNSTON Jr., R.B. (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. **J. Immunol.**, 146: 2783-9;

MARÓDI, L., TOURNAY, C., KÁPOSZTA, R., JOHNSTON Jr., R.B., MOGUILEVSKY, N. (1998). Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Infect. Immun.**, 66: 2750-2754.

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 Immunology and Medical Microbiology** 24: 421-429.

MATHEWS & WITEK-JANUSEK, 2002 *In*: *Candida and Candidiasis*. Richard Calderone, 2002. ASM Press, Washington D.C.

MATHEWS, R. & BURNIE, J. (1992). The role of hsp 90 in fungal infection. **Immunol. Today**, 13: 345-348.

MATHEWS, R.C., BURNIE, J.P., HOWAT, D., ROWLAND, T., WALTON, F. (1991). Auto-antibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. **Immunology**, 74: 20-24.

MENCACCI, A., CENCI, E., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., BISTONI, F., ROMANI, L. (2000). Cytokines in candidiasis and aspergillosis. **Curr. Pharmaceut. Biotechnol.**, 1: 235-251.

MENCACCI, A., CENCI, E., DEL SERO, G., d'OSTIANI, C.F., MONTAGNOLI, C., BACCI, A., BISTONI, F. (1999). Innate and adaptive immunity to *Candida albicans*: A new view of an old paradigm. **Rev. Iberoam. Micol.**, 16: 4-7.

MENCACCI, A., CENCI, E., DEL SERO, G., d'OSTIANI, C.F., MOSCI, P., TRINCHIERI, G., ADORINI, L., ROMANI, L. (1998). IL-10 is required for

development of protective Th1 responses in IL-12 deficient mice upon *Candida albicans* infection. **J. Immunol.**, 161: 6228-6237.

MITCHELL, T.G. (1998). Medical mycology. In: Jawetz, Melnick E Adelberg's Medical Microbiology. Brooks, G.F.; Butel, J.S. & Morse, S.A. ed., 21st ed. Appleton & Lange, Connecticut, USA.

MIYAKAWA, Y., KURIBAYASHI, T., KAGAYA, K., SUZUKI, M., NAKASE, T., FUKAZAWA, Y., (1992). Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. **Infect Immun.**, 60(6): 2493–2499.

MOLERO, G., DÍEZ-OREJAS, R., NAVARRO-GARCÍA, F., MONTEOLIVA, L., PLA, J., GIL, C., SÁNCHEZ-PÉREZ, M., NOMBELA, C. (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **Int. Microbiol.**, 1: 95–106.

MOLLOY, S. (2006). Fungal Genetics. **Nature** 4: 721.

MORESCO, T.R., GAZIRI, L.C.J., YASUMOTO, Y., FELIPE, I. (2002). Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A. **Medical Mycology**, 40: 393-397.

MOSMANN, T.R. (1994). Properties and functions of interleukin-10. **Adv. Immunol.** 56: 1-26.

NAGLIK, J., ALBRECHT, A., BADER, O., HUBE, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**. 6(10): 915-926.

NAGLIK, J.R., RODGERS, C. A., SHIRLAW, P.J., DOBBIE, J.L., FERNANDES-NAGLIK, L.L., GREESNPAN, D., AGABIAN, N., CHALLACOMBE, S.J. (2003). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **J. Infect. Dis.**, 188: 469-479.

NAKAGAWA, Y., OHNO, N., MURAI, T. (2003). Suppression by *Candida albicans* β -Glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. **J. Infect. Dis.**, 187: 710-713.

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.**, 116: 1642-1650.

NETEA, M.G., SUTMULLER, R., HERMANN, C., van DER GRAAF, C.A.A., van DER MEER, J.W.M., van KRIEKE, J.H., HARTUNG, T., ADEMA, G., KULBERG, B.J. (2004). Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J. Immunol.** 172: 3712-3718.

NETEA, M.G., van DER GRAAF, C.A.A., VONK, A.G., VERSCHUEREN, I., van DER MEER, J.W.M., KULLBERG, B.J. (2002). The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 in the host defense against disseminated candidiasis. **J. Infect. Dis.**, 185: 1483-1489.

NETEA, M.G., van TITS, L.H.J., CURFS, J.A.H.J., AMITO, F., MEIS, J.F.G.M., van DER MEER, J.W.M., KULLBERG, B.J. (1999). Increased susceptibility of TNF- α LT α double knockout mice to systemic candidiasis through defective recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. **J. Immunol.**, 163:1498-1505.

ODDS, F.C. (1988). *Candida* and Candidosis. London: Bailliere Tindall.

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. **International Immunopharmacol.**, 1: 1797-1811.

OKAMOTO, T. & KOBAYASHI, T. (1997). Effects of concanavali-A on cytokine mRNA expression in mouse liver. **Jpn. J. Pharmacol.** 75: 199-201.

OROZCO, A.S., ZHOU, X., FILLER, S.G. (2000) Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. **Infect. Immun.** 68(3): 1134-1141.

PENDRAK, M.L. & KLOTZ, S.A. (1995). Adherence of *Candida albicans* to host cells. **FEMS Microbiol. Let.**, 129: 103-114.

PFALLER, M.A, JONES, R.N., MESSER, S.A., EDMOND, M.B., WENZEL, R.P (1998). National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, 31: 327-332

POMES, R., GIL, C., NOMBELA, C. (1985). Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. **J. Gen. Microbiol.**, 131(8): 2107-2113.

QIAN, Q., JUTILA, M.A., ROOIJEN, N.V., CUTLER, J.E. (1994). Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. **J. Immunol.** 152: 5000-5008.

ROILIDES, F., UHLIG, K., VENZON, D., PIZZO, P.A., WALSH, T.J. (1992). Neutrophil oxidative burst in response to blastoconidia and pseudohyphae of *Candida albicans*: augmentation by granulocyte colony-stimulating factor and interferon-gamma. **J. Infect. Dis.**, 166(3): 668-673.

ROMANI, L. (2004), Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.**, 4: 1-13.

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

ROMANI, L., CENCI, E., MENCACCI, A., SPACCAPELO, R., GROHMANN, U., PUC CETTI, P., BISTONI, F. (1992). Gamma interferon modifies CD4⁺ subset expression in murine candidiasis. **Infect Immun.** 60(11): 4950-4952.

ROMANI, L., MENCACCI, A., CENCI, E., SPACCAPELO, R., MOSCI, P., PUC CETTI, P., BISTONI, F. (1993). CD4⁺ subset expression in murine candidiasis. **J. Immunol.**, 150(3): 925-931

ROMANI, L., MENCACCI, A., TONNETTI, L., SPACCAPELO, R., CENCI, E., WOLF, S., PUC CETTI, P., BISTONI, F. (1994a). Interleukin-12 but not interferon- γ production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis. **Eur. J. Immunol.**, 24: 909-915.

ROMANI, L., MENCACCI, A., TONNETTI, L., SPACCAPELO, R., CENCI, E., WOLF, S., PUC CETTI, P., WOLF, S.F., BISTONI, F. (1994b). IL-12 is both requires and prognostic in vivo for T heper type I differentiation in murine candidiasis. **J. Immunol.**, 152: 5167-5175.

ROMANI, L., PUC CETTI, P., BISTONI, F. (1996). Biological role of Th cell subsets in candidiasis. **Chemical Immunology**, 63: 115-137.

ROMANI, L., PUC CETTI, P., MENCACCI, A., CENCI, E., SPACCAPELO, R., TONNETTI, L., GROHMAN, U., BISTONI, F. (1994c). Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. **J. Immunol.**, 152: 3514-3521.

RUHNKE, M., MASCHMEYER, G. (2002). Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer – Review of the literature. **Eur. J. Med. Res.** 7: 227-235.

SASADA, M. & JOHNSTON Jr., R.B. (1980). Macrophage microbicidal activity correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. **J. Exp. Med.** 152: 85-98

SAVILLE, S.T., LAZZELL, A.L., MONTEAGUDO, C., LOPEZ-RIBOT, J.L. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryotic Cell.** 2(5): 1053–1060.

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

SHALABY, M.R., AGGARWAL, B.B., RINDERKNECHT, E., SVEDERSKY, L.P., FINKLE, B.S., PALLADINO JR., M.A. (1985). Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. **J. Immunol.**, 135: 2069-2073.

SIDRIM, J.J.C. Micoses Oportunistas (1999). In: SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 171-182.

- SLUTSKY, B., BUFFO, J., SOIL, D.R. (1985). High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, 230: 666- 669.
- SLUTSKY, B., STAEBELL, M., ANDERSON, J., RISEN, L., PFALLER, M. SOLL, D.R. (1987). "White-opaque" transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **J. Bacteriol.**, 169(1): 189-197.
- SOBEL, J.D. (1990). Vaginal infections in adult women. **Sex. Transm. Dis.**74: 1573–1601.
- SOBEL, J.D. (1993). Candidal vulvovaginitis **Clin. Obstet. Gynecol.**, 36(1): 153-165.
- SOLL, D.R. (1988). High frequency switching in *Candida albicans* and its relations to vaginal candidiasis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**,. 158: 997–1001.
- SOLL, D.R. (1992). High-Frequency Switching in *Candida albicans*. **Clin. Microb. Rev.** 5(2): 183-203.
- STEVENHAGEN, A. & van FURTH, R. (1993). Interferon-gama activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. **Clin. Exp. Immun.**,. 91: 170-175.
- SUDBERY, P., GOW, N., BERMAN, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, 12(7): 317-324.
- TAGAWA, Y., SEKIKAWA, K., IWAKURA, Y. (1997). Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN- γ ^{-/-} mice, but not in TNF- α ^{-/-} mice. **J. Immunol.**, 159: 1418-1428.
- TAVANTI, A., CAMPA, D., BERTOZZI, A., PARDINI, G., NAGLIK, J.R., BARALE, R., SENESI, S. (2006). *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. **Microbes and Infection**, 8: 791-800.
- TONNETII, L., SPACCAPELO, R., CENCEI, E., MENCACCI, A., PUC CETTI, P., COFFMAN, R.L., BISTONI, F., ROMANI, L. (1995). Interleukin-4 and 10 exacerbate candidiasis in mice. **Eur. J. Immunol.** 25: 1559-1565.
- TRAUTWEIN, C., RAKEMANN, T., MALEK, N.P., PLIIMPE, J., TIEGS, G., MANNS, M.P. (1998). Concanavalin A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. **J. Clin. Invest.** 101(9): 1960-1969.
- UNDERHILL, D.M. & OZINSKY, A. (2002). Toll-like receptor: key mediators of microbe detection. **Curr. Opin. Immunol.** 14: 103-110.
- van BURIK, J-A. H. & MAGEE, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. **Ann. Rev. Microbiol.**, 55: 743-772.
- van DE GRAAF, C.A., NETEA, M.G., VERSCHUEREN, I., van DER MEER, J.W.M., KULBERG, B.J. (2005). Differential cytokine production and toll-like

receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae, **Infect. Immun.**, 73: 7458-7464.

VAN'T WOUT, J.W., LINDE, L., LEIJ, P.C.J., van FURTH, R. (1988). Contribution of granulocytes and monocytes to resistance against experimental disseminated *C. albicans* infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 7: 736-741.

VASQUES-TORRES, A., JONES-CARSON, J., BALISH, E. (1996). Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. **Infect. Immun.**, 64(8): 3127-3133.

VASQUEZ-TORRES, A & BALISH, E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. **Microbiol. and Molecular Biology Reviews**. 61(3): 170-192.

VECCHIARELLI, A., PULITI, M., TOROSANTUCCI, A., CASSONE, A., BISTONI, F. (1991). In vitro production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. **Cel Immunol.**, 134: 65-76.

VILLAMÓN, E., GOZALBO, D., ROIG, P., O'CONNOR, J.E., FRADELIZI, D., GIL, M.L. (2004). Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. **Microb. Infect.**, 6: 1-7.

WALLEY K.R., LUKACS, N.W., STANDIFORD, T.J., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L. (1996). Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect. Immun.**, 64: 4733-4738.

WEIG, M., GROB, U., MÜHLSCHLEGEL, F. (1998). Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. **Trends Microbiol.**, 6(12): 468-470.

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 chemokine macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β), MIP-2, and KC response, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophage. **Infect. Immun.**, 65: 1077-82.

Low dose of Concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*

I. Conchon-Costa¹, W. Loyola¹, L. C. J. Gaziri², L. A. Custódio¹ & I. Felipe¹

¹Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; and ²Department of Physiological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

Correspondence: Ionice Felipe, Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, 86051-990. Tel.: +51 43 337 14267; e-mail: ionice@uel.br

Received 31 July 2006; revised 21 November 2006; accepted 27 November 2006.
First published online 29 January 2007.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2006.00201.x

Editor: Artur Ulmer

Keywords

Candida albicans; Concanavalin-A; innate immune response; TNF- α .

Abstract

The mechanisms through which *Candida albicans* is recognized by immune cells and how it triggers host defence are not completely understood. In this study, we evaluated the effect of Concanavalin-A on the clearance of *C. albicans* by infected mice and their production of proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α). Subgroups of 5 animals were pretreated with Con-A (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBS) and after 96 h were infected intraperitoneally with 10^7 cells of *C. albicans* CR15 (an isolate from a HIV+ person); 30 min, 2, 6, 24 or 72 h after infection the mice were sacrificed. Phagocytosis of *C. albicans* by peritoneal macrophages increased 30 min after infection in mice pretreated with Con-A. The liver presented the greatest number of CFUs, and this number was reduced by pretreatment with Con-A. Control animals infected with *C. albicans* presented a significant increase in plasmatic alanine aminotransferase, which was not observed in mice treated with Con-A. Two hours after infection the production of TNF- α in the liver of mice pretreated with Con-A was significantly increased. These results suggest that a single dose of Con-A caused a beneficial modulating action of the inflammatory response during infection with *C. albicans*.

Introduction

Candida albicans causes several diseases, ranging from mucocutaneous to systemic infection. Various virulence factors contribute to pathogenesis; for example aspartyl proteases and phospholipases play an essential early role in *C. albicans* dissemination and enhance its ability to colonize deep organs (Fallow *et al.*, 1997; Calderone & Fonzi, 2001), adhesins allow adherence to epithelial and endothelial cells (Naglik *et al.*, 2003), and morphogenesis consists of reversible transitions between unicellular yeast cells and the filamentous growth forms that are present in clinical lesions (Kobayashi & Cutler, 1998; Romani *et al.*, 2003; Consolaro *et al.*, 2005). It has been demonstrated that Th cell reactivity plays a central role in regulating the immune response to *C. albicans*, Th1 reactivity being responsible for resistance and Th2 reactivity being associated with susceptibility (Nomi *et al.*, 1994; Kaposzta *et al.*, 1998; Romani, 1999).

Macrophages and neutrophils are extremely important in nonspecific defences, but signals activating or deactivating fungicidal mechanisms, which are respectively mediated by Th1 or Th2 cells, are host-dependent immune responses (Qian *et al.*, 1994; Felipe *et al.*, 1995; Gaziri *et al.*, 1999). We

previously observed that, 4 days after administration of a single dose of Concanavalin-A (Con-A) to mice, there was a predominance of activated macrophages in their peritoneal exudate (Loyola *et al.*, 2002; Moresco *et al.*, 2002). In this study, we analysed the effect of Con-A on the clearance of *C. albicans* by infected mice and correlated it with the production of TNF- α .

Materials and methods

Candida albicans culture

Candida albicans CR15 was isolated from the oral mucosa of an HIV-infected individual at the Universidade Estadual de Londrina hospital, and maintained on Sabouraud dextrose agar; the isolate was used after two serial animal passages. After growth in Sabouraud dextrose broth for 24 h at 28 °C, *C. albicans* yeast cells were cytospun, washed with PBS, and resuspended at 10^7 , 5×10^7 and 10^8 cells mL^{-1} RPMI 1640.

Treatment and infection of mice

Subgroups of 5 male Swiss mice, each weighing 28–32 g, received 250 μg Con-A mL^{-1} PBS intraperitoneally (i.p.) or

PBS only, and after 96 h were infected (i.p.) with 10^7 yeast cells mL^{-1} RPMI 1640. One group of 5 non-infected mice was used as a control.

Evaluation of peritoneal phagocytic cells

The animals were sacrificed 30 min, 2, 6, 24 or 72 h after infection, and exudate cells were collected by rinsing the peritoneal cavity with 2 mL of RPMI-albumin medium. After centrifugation, the pellet was resuspended in 1 mL of RPMI-albumin medium, distributed on coverslips (0.2 mL per coverslip) and incubated for 30 min at 37 °C. The cells were stained by May–Grumwald–Giemsa and analysed by light microscopy by counting 10 fields to evaluate the population of phagocytes and phagocytosing cells.

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

Liver, spleen and kidneys of infected mice were homogenized with 10, 5 and 5 mL PBS, respectively. Samples were collected from each homogenate and from the peritoneal exudates (0.1 mL), serially diluted in PBS, and plated on Sabouraud dextrose agar plates. The colonies were counted after 24 h of incubation at 37 °C, and CFUs were calculated per organ or millilitre of exudate.

Assays of TNF- α

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 (1F3F3D4) from Bioscience. The concentration of cytokine was determined with reference to a standard curve for serial two-fold dilutions of mouse recombinant TNF- α ; optical absorption was measured at 492 nm.

Statistical analysis

Survival rates were estimated by Kaplan–Meier curves and analysed by the log-rank method. All other statistical comparisons were made with Student's *t*-test. A *P*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results and discussion

This study showed that Con-A exerted a protective effect against infection with an otherwise lethal dose of *C. albicans*. Protection afforded by Con-A was time-dependent, because 100% of the mice infected 3 days posttreatment survived, whereas animals infected one day after treatment, or more than 4 days thereafter presented a significantly lower survival rate (Fig. 1). In contrast, only 20% of the control group

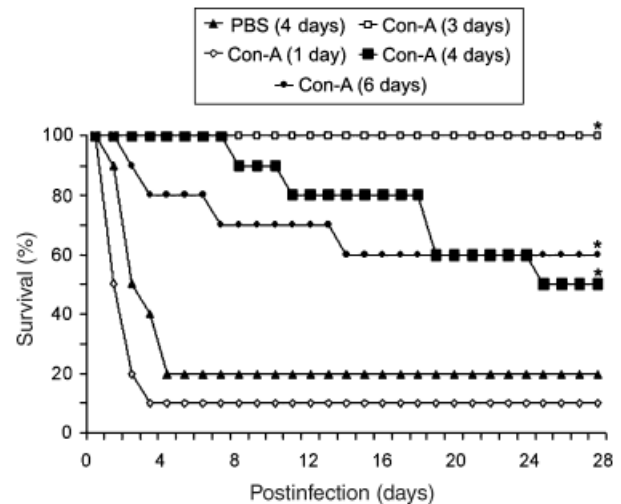


Fig. 1. Effect of Con-A on the survival of mice after infection with *Candida albicans*. Mice (10 per group) received a single dose i.p. of Con-A (250 μg) 1, 3, 4 and 6 days, or of PBS 4 days before i.p. infection with 10^8 *C. albicans*. Statistically significant at $*P < 0.05$ (vs. PBS group) in log-rank test for survival rates.

survived for a follow-up period of 28 days. Suckling mice were also protected by treatment with Con-A by intraperitoneal route 4 days before inoculation of *C. albicans* (Moresco *et al.*, 2002), which suggests that the activation by Con-A of both the immature and the adult immune systems is effected by similar mechanisms. Because Con-A binds directly to carbohydrates in the constant region of major histocompatibility complex (MHC) molecules and T cell receptor (TCR) receptors on T helper cells (Bertram *et al.*, 1997), activation of Th1 cells could explain the above results. According to Cenci *et al.* (1995), protection in experimental models of candidiasis correlates with the generation of Th1 cells producing interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ).

Administration of Con-A by tail vein induced expression of IL-2, IFN- γ and TNF- α mRNA in the liver (Okamoto & Kobayashi 1997; Tagawa *et al.*, 1997). Exacerbation of the Th1 response by a high dose of Con-A by intravenous route caused liver injury by excessive production of IFN- γ and TNF- α , which induced destruction of hepatocytes by apoptosis and constitutes a model for the study of hepatitis (Trautwein *et al.*, 1998). However, in this study administration of Con-A in a single low dose by intraperitoneal route was beneficial, as inferred from the survival rate of mice infected with *C. albicans*. In order to correlate the liver lesion possibly caused by Con-A and infection with *C. albicans*, we measured the activity of alanine aminotransferase (ALT) in the plasma of mice pretreated with Con-A and infected with *C. albicans*. Control mice that received an inoculum of 10^7 blastoconidia maintained unaltered activity of ALT at 24 and 72 h postinfection and survived, whereas an inoculum of 5×10^7 blastoconidia caused a significant increase in the

Table 1. Determination of plasma alanine transferase activities (IU L⁻¹) from mice infected with *Candida albicans* after pretreatment with Con-A

Alanine aminotransferase activity (IU L ⁻¹)		Inoculum			
		1 × 10 ⁷		5 × 10 ⁷	
Treatment	Control	24 h	72 h	24 h	72 h
PBS	46.8 ± 7.1	36.8 ± 3.8	50.6 ± 6.9	329.3 ± 45.3*	†
Con-A	44.5 ± 4.5	45.9 ± 4.2	42.8 ± 3.5	49.0 ± 6.4	32.8 ± 3.4

Con-A 250 g mL⁻¹ PBS or PBS alone were administered i.p. 4 days 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. Con-A.

†None survived.

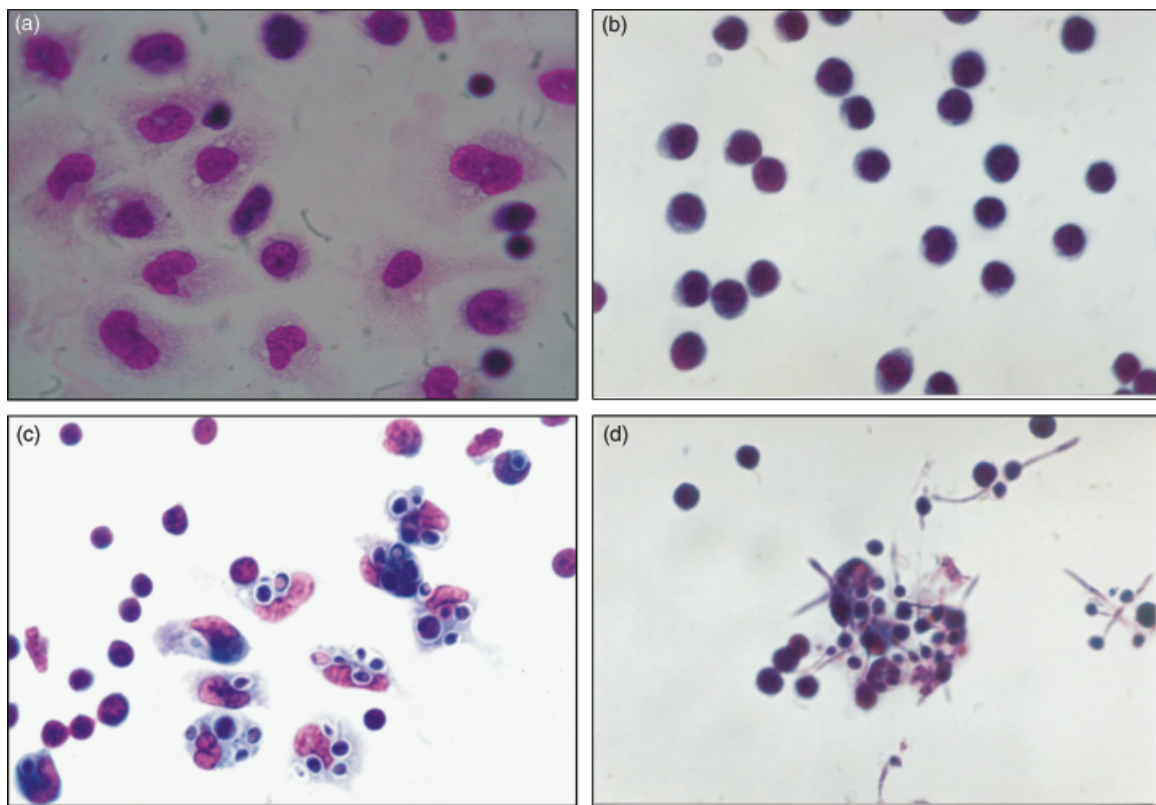


Fig. 2. Influence of treatment with Con-A on phagocytosis by peritoneal macrophages. Macrophages from noninfected mice were pretreated for 4 days with (a) Con-A or (b) PBS, and macrophages from mice pretreated with (c) Con-A or (d) PBS received an inoculum i.p. with 10⁷ *Candida albicans*. The macrophages were collected at 30-min postinfection and adhered to coverslips for 30 min.

activity of ALT and all of these mice died (Table 1). However, mice that were pretreated with Con-A and received an inoculum of 5 × 10⁷ blastoconidia presented unaltered ALT activity and survived. This corroborates the contention that Con-A protects mice against an infection by *C. albicans*.

Phagocytosis *in vivo* of *C. albicans* by Con-A-activated macrophages was more effective than that by control macrophages at 30-min postinfection (Table 2). Macrophages activated by Con-A present greater spreading and

larger size (Fig. 2a) than control ones (Fig. 2b). Unicellular yeast cells (blastopores) can be seen inside activated macrophages (Fig. 2c), whereas the smaller macrophages from the control group show fewer ingested *Candida* cells, many of which show filamentous growth (Fig. 2d). These observations suggest that activated macrophages not only ingest more yeast cells, but also that they are capable of repressing the transition from yeast cells to filamentous forms, whose growth ultimately leads to macrophage death.

Table 2. Percentage of macrophages and neutrophils containing *Candida albicans* on the course of infection

Conditions	Time post infection (hours)									
	Macrophages					Neutrophils				
	1/2	2	6	24	72	1/2	2	6	24	72
PBS	11.9 ± 1.52	3.78 ± 0.7	0.8 ± 0.47	0.3 ± 0.21	0.1 ± 0.08	20.8 ± 1.65	2.6 ± 0.54	0.7 ± 0.04	0.4 ± 0.4	0 ± 0
Con-A	29.7 ± 3.6	4.4 ± 0.32	2.3 ± 0.7	0.8 ± 0.29	0.4 ± 0.22	27.7 ± 8.06	2.6 ± 0.99	1.1 ± 0.09	0.3 ± 0.11	0 ± 0

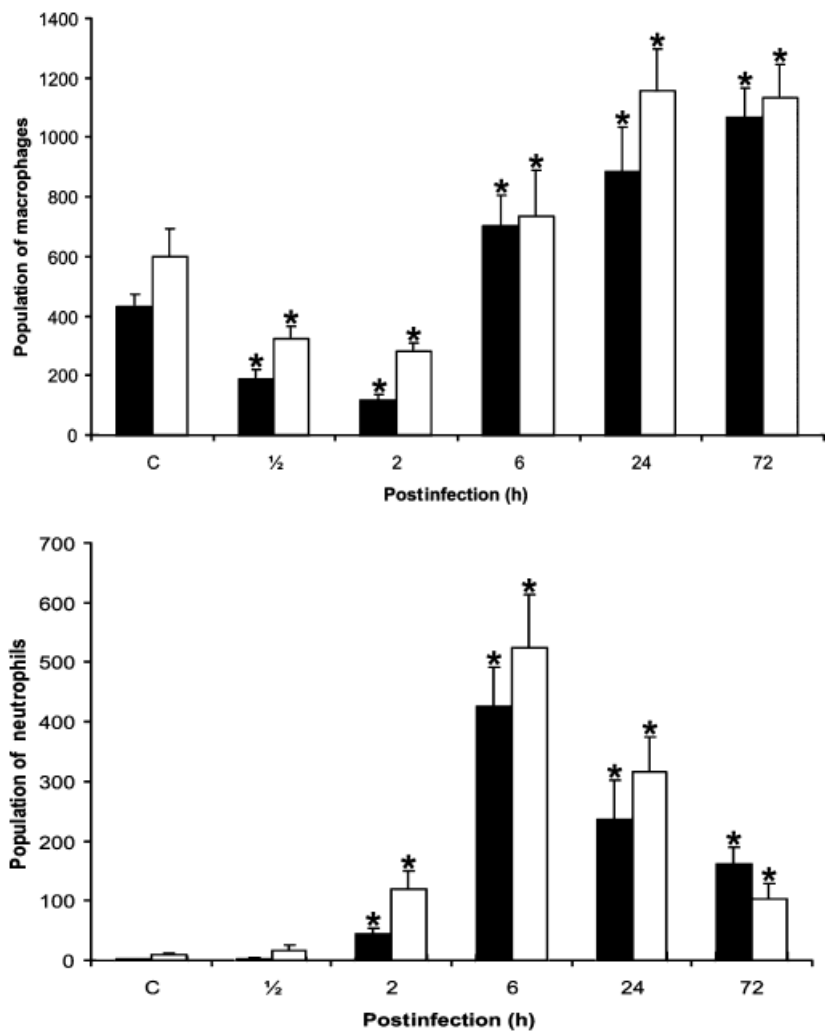


Fig. 3. Populations of phagocytic cells in the peritoneal exudate over the course of infection. Mice were pretreated with PBS (closed bars) or Con-A (open bars) 4 days before inoculation i.p. with 10^7 *Candida albicans*. Results represent the mean values \pm SE for five experiments. Statistically significant at $*P < 0.05$ compared with noninfected mice (bars C; control).

Activation of macrophages by Con-A cannot be attributed to a direct action on those cells, because macrophages incubated in different media containing Con-A did not present increased phagocytosis or killing of *C. albicans* (data not shown).

The number of phagocytes present in the peritoneal exudate during the first 72 h of infection did not differ between Con-A pretreated and control mice, although during the first 2 h there was a significant reduction in their

number in the control group (Fig. 3). A significant increase in the number of macrophages was detected between 6- and 72-h postinfection, whereas the number of neutrophils was low during the first 2 h after infection and increased thereafter (Fig. 3). The presence of dead macrophages was evaluated by means of staining with propidium iodide (data not shown).

The proinflammatory cytokine TNF- α mediates a variety of biological responses, among them improved phagocyte

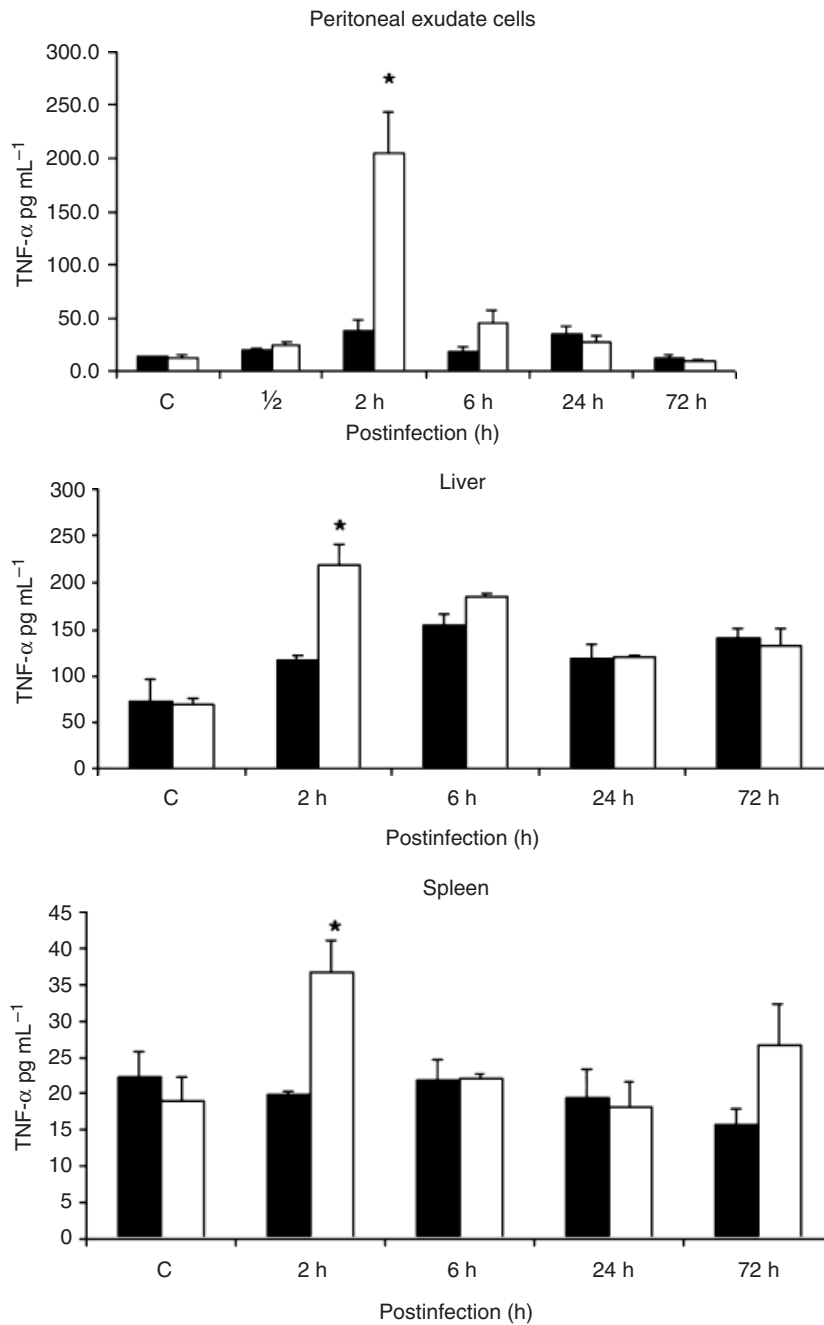


Fig. 4. TNF- α production by peritoneal exudate cells, liver and spleen over the course of infection with *Candida albicans*. Mice were pretreated with PBS (closed bars) or Con-A (open bars) 4 days before inoculation i.p. with 10^7 *Candida albicans*. Results for noninfected mice are given in bars C (control). The supernatants from peritoneal exudates, liver and spleen were collected, and TNF- α was determined by ELISA. Statistically significant at $*P < 0.05$ for Con-A vs. PBS group.

functions (Vecchiarelli *et al.*, 1991; Steinshamn *et al.*, 1996; Netea *et al.*, 1999; Ohumura *et al.*, 2001; Gantner *et al.*, 2005; Filler, 2006), which suggests that TNF- α secretion might be related to the onset of protective immunity. As expected, during the early stage of infection we found significantly more TNF- α in supernatants from peritoneal exudate cells of Con-A-treated mice than in those from control ones (Fig. 4). Some variation in the concentration of TNF- α in supernatants from peritoneal cells of control mice (Fig. 4) can

perhaps be attributed to stimulation by mannan and mannoproteins from the *C. albicans* cell wall (Vecchiarelli *et al.*, 1991).

In the liver and spleen, the kinetics of TNF- α production were similar to those observed in supernatants from cells of the peritoneal cavity, the amount of TNF- α being significantly greater in the Con-A group 2-h postinfection (Fig. 4). In blood plasma, the level of this cytokine was not detectable during the course of infection, which suggests that TNF- α

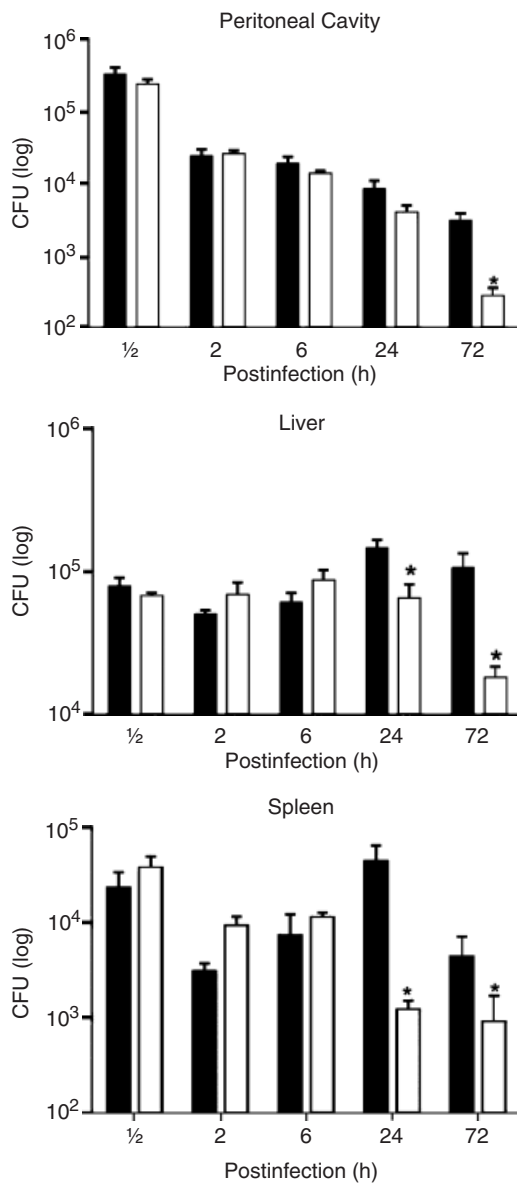


Fig. 5. Effect of Con-A on the recovery of *Candida albicans* from peritoneal cavity, liver and spleen over the course of infection. Mice were pretreated with PBS (closed bars) or Con-A (open bars) 4 days before inoculation i.p. with 10^7 *C. albicans*. Data are reported as means of CFU \pm SE per organ from five experiments. Statistically significant at $*P < 0.05$ for Con-A vs. PBS group.

was produced in physiological levels at all anatomical sites studied. The clearance of *C. albicans* was significantly increased in Con-A group mice, as observed by reduced CFU in the peritoneal cavity exudate 72-h postinfection, and reduced CFU in the liver and spleen 24-h postinfection (Fig. 5). In conclusion, despite some similarities between control and experimental groups in their response against *C. albicans*, protection by Con-A was evidenced by a higher rate of survival, normal ALT, activation of macrophages,

physiological production of TNF- α , and increased clearance of this pathogen.

Acknowledgements

This work was funded by grants from CNPq, CAPES, and Fundação Araucária. We thank Alexandre Saito for helping in the preparation of graphics.

References

- 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.
- Calderone RA & Fonzi WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 327–335.
- Cenci E, Mencacci A, Spaccapelo R, Tonnetti L, Mosci P, Enssle KH, Puccetti P, Romani L & Bistoni F. (1995) T helper type1 (Th1) and Th2-like responses are present in mice with gastric candidiasis but protective immunity is associated with Th1 development. *J Infect Dis* **171**: 1279–1288.
- Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta RM & Svidzinski TIE (2005) Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia* **159**: 501–507.
- Fallow K, Bausch K, Noonan J, Hugueneel E & Tamburini P (1997) Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* **65**: 551–556.
- Felipe I, Bim S & Somensi CC (1995) Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin-A or jacalin. *Braz J Med Biol Res* **28**: 477–483.
- 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.
- 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.
- Kaposzta R, Tree P, Marodi L & Gordon S (1998) Characterization of invasive candidiasis in gamma interferon and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**: 1708–1717.
- Kobayashi SD & Cutler JE (1998) *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? *Trends Microbiol* **6**: 92–94.
- 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.
- Naglik JR, Challacombe S & Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400–428.
- Netea MG, van Tits LJH, Curfs JHAJ, Amiot F, Meis 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.
- Nomi T, Abe S, Tanscho S & Yamaguschi H (1994) Suppression of anti-candida activity of murine and human neutrophils by glucocorticoids. *Microbiol Immunol* **38**: 977–982.
- Ohumura Y, Matsunaga K, Motokawa I, Sakurai K & Ando T (2001) Protective effects of a protein-bound polysaccharide, PSK, on *Candida albicans* infection in mice via tumor necrosis factor- α induction. *Int Immunopharmacol* **1**: 1797–1811.
- Okamoto T & Kobayashi T (1997) Effects of concanavalin-A on cytokine mRNA expression in mouse liver. *JPN J Pharmacol* **75**: 199–201.
- Puccetti P, Romani L & Bistoni F (1995) A Th1-Th2-like switch in candidiasis; new perspectives for therapy. *Trends Microbiol* **3**: 237–240.
- Qian Q, Jutila MA, Roijen NV & Cutler JE (1994) Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* **152**: 5000–5008.
- Romani L (1999) Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Curr Opin Microbiol* **2**: 363–367.
- Romani L, Bistoni F & Puccetti P (2003) Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Immunol* **6**: 338–343.
- Steinshamn S, Bemelmans MHA, van Tits LJH, Bergh K, Buurman WA & Waage A (1996) TNF receptors in murine *Candida albicans* infection. *J Immunol* **157**: 2155–2159.
- Tagawa Y, Sakikama K & Iwakura Y (1997) Suppression of concanavalin-A induced hepatitis in IFN- γ $-/-$ mice, but not in TNF- α $-/-$ mice. *J Immunol* **159**: 1418–1428.
- Trautwein C, Rakeman T, Malek NP, Plümpe J, Tiegs G & Manns MP (1998) Concanavalin-A induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* **101**: 1960–1969.
- Vecchiarelli A, Puliti M, Torosantucci A, Cassone A & Bistoni F (1991) In vitro production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. *Cell Immunol* **134**: 65–76.