



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PAULA GALDINO CARDIN DE CARVALHO

**EFEITO DE CONCAVALINA-A NO PERFIL DE  
CITOCINAS E ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE *CANDIDA***

PAULA GALDINO CARDIN DE CARVALHO

**EFEITO DE CONCAVALINA-A NO PERFIL DE  
CITOCINAS E ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE *CANDIDA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ionice Felipe  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ivete Conchon  
Costa

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C331e Carvalho, Paula Galdino Cardin de.

Efeito de Concanavalina-A no perfil de citocinas e atividade fagocítica de  
*Candida* / Paula Galdino Cardin de Carvalho. – Londrina, 2011.  
88 f. : il.

Orientador: Ionice Felipe.

Co-orientador: Ivete Conchon Costa.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
2011.

Inclui bibliografia.

1. *Candida albicans* – Teses. 2. Candidíase – Teses. 3. Citocinas – Teses.  
4. Fagocitose – Teses. 5. Resposta imune – Teses. I. Felipe, Ionice. II. Costa,  
Ivete Conchon. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 616.934

PAULA GALDINO CARDIN DE CARVALHO

**EFEITO DE CONCANAVALINA-A NO PERFIL DE CITOCINAS E  
ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE *CANDIDA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ionice Felipe  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Márcia Cristina Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Wagner Loyola  
Embrapa Concórdia - Santa Catarina

Londrina, 18 de Fevereiro de 2011.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Dalva e Homero, meus grandes exemplos  
de vida, perseverança e otimismo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela graça da vida, e por iluminar meu caminho, me dando forças para seguir sempre em frente.

À Profa. Dra. Ionice Felipe, exemplo de determinação e persistência, pela valiosa orientação, paciência, e por ter acreditado em meu potencial. Estes dois anos foram de intenso crescimento pessoal e profissional, e sua orientação e paixão pela pesquisa foram fundamentais neste processo.

À Profa. Dra. Ivete Conchon Costa, por todo incentivo, otimismo e colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pelas sugestões e por gentilmente permitir a identificação de leveduras em seu laboratório.

À Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade pela disponibilidade e auxílio na realização da microscopia eletrônica de varredura, e ao técnico Osvaldo Capello pela instrução e paciência durante este processo.

Aos professores Dr. Wagner Loyola e Dr. Luciano Aparecido Panagio, pelas sugestões e disponibilidade.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos e sabedoria compartilhados.

À minha mãe Dalva Galdino, pelas orações e presença constante, sempre me ajudando a superar os períodos mais difíceis. Seu amor, apoio e confiança foram, sem dúvida, fundamentais para esta conquista.

Ao meu pai Homero Carvalho, que sempre incentivou minhas escolhas e apoiou meus estudos. Mesmo de longe, você está sempre presente na minha vida. Obrigada por sempre acreditar em mim e nas minhas capacidades.

À toda minha família, meu grande tesouro, por todo apoio, carinho e alegrias que me proporcionam.

Ao meu Tio Benjamin Carvalho, que desempenhou papel fundamental na minha vida acadêmica, por todo auxílio e incentivo.

À minha Tia, Profa. Dra. Maria Eugênia, pelas sugestões, estímulo e contribuição intelectual na minha jornada acadêmica.

Aos meus queridos amigos do curso de mestrado, Ana Flávia, Fabiana, Kristie, Eik, Rosana, Lilian, Sílvia, Viviana, Lucilene, Luciana, César, Gilselena, por todo carinho e risadas proporcionadas.

À Thais Herrero, uma grande amiga e profissional, por toda cumplicidade, incentivo, alegria, e que tanto me ensinou e auxiliou durante esse período.

Aos meus amigos e companheiros de Laboratório, Lorena, Kamila, Custódio e Gustavo, pela amizade, alegria, paciência e por desempenharem papel fundamental na realização deste trabalho.

À Daniele Carolina e Cynara Romero, minhas queridas amigas e companheiras constantes, por todo carinho, paciência e incentivo.

Aos colegas do Departamento de Ciências Patológicas e Fisiológicas, pelo apoio, companhia e momentos de descontração.

Aos técnicos de laboratório, Pedro, Zui, Vera, Mari, Val, D. Irene, Claci e Iara, pelo carinho, apoio e por sempre me ajudarem nos momentos necessários.

À CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo financiamento concedidos, tornando possível a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com a realização deste trabalho. Muito obrigada!

*Se procurar bem, você acaba encontrando  
não a explicação (duvidosa) da vida,  
mas a poesia (inexplicável) da vida.*

*Carlos Drummond de Andrade*



CARVALHO, Paula Galdino Cardin de **Efeito de Concanavalina-a no perfil de citocinas e atividade fagocítica de *Candida***. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

## RESUMO

*Candida albicans* é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém infecções causadas por espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância. O reconhecimento do fungo invasivo pelo sistema imune inato é o primeiro passo para a ativação de uma resposta imunológica rápida. Em estudo prévio, nosso grupo verificou que 100% dos camundongos sobreviveram à dose letal de *Candida albicans* após pré-tratamento com concanavalina-A (Con-A) por três dias. Neste trabalho verificamos maior índice fagocítico nos macrófagos de camundongos tratados com PBS para *Candida glabrata*. Houve aumento na atividade fagocítica, candidacida e produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A tanto para *Candida albicans* como para espécies não *albicans*. As espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram maior transição para a forma filamentosa. Isto contribui para o conhecimento de características distintas de patogenicidade e a resposta imunológica desenvolvida frente a estes isolados. Este trabalho também propôs investigar se o tratamento pode mediar uma resposta imune adaptativa envolvendo células T<sub>H</sub>17. Um aumento significativo nos níveis de IL-17 6h após infecção com *C. albicans* foi observado e mantido até 18h no grupo Con-A, enquanto em camundongos controle, foi verificada uma redução dessa citocina. Correlacionado à produção de IL-17, no grupo tratado com Con-A, a migração de neutrófilos aumentou 6h após infecção, atingindo o pico as 18h. Níveis de TGF- $\beta$  aumentaram significativamente 2h após infecção em camundongos tratados com Con-A. Macrófagos estão envolvidos no processo, fagocitando maiores números de leveduras, e foram ativados através da produção de TNF- $\alpha$  e interferon-  $\gamma$  em níveis significantes 2 horas após infecção. Deste modo, eles provavelmente são mais capazes de matar e processar antígenos de *Candida*, sinalizando uma resposta imune adaptativa. Macrófagos dos controles não evitam a transição de leveduras em hifas e são parcialmente destruídos, como mostrado em microscopia eletrônica de varredura. Estes resultados sugerem que o tratamento com Con-A facilita o desencadeamento de respostas T<sub>H</sub>17 e T<sub>H</sub>1 via produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ , levando a resolução da infecção por *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Concanavalina-A. *Candida spp.* Citocinas. Resposta imune.

CARVALHO, Paula Galdino Cardin de. **Effect of Concanavalin-A on cytokines profile and phagocytic activity of *Candida***. 2011. 88 f.( Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is the most common pathogen in cutaneous and orofaringeous candidiasis, though infections caused by non-*albicans* species has increased in number and importance. The recognition of invasive fungus by innate immune system is the first step towards activating a fast immunological response. In a previous study, our group verified that 100% of mice survived a lethal dose of *Candida albicans* following pretreatment with concanavalin-A (Con-A) for three days. In this work we verified a higher phagocytic index in PBS treated mice macrophages coincubated with *C. glabrata*. There was an increase in phagocytical and candidacidal activity, and TNF- $\alpha$  production of Con-A pre-treated mice macrophages in the presence of *albicans* and non-*albicans* species. *C. albicans* and *C. tropicalis* presented higher transition to filamentous forms. This contributed to the knowledge of distinct pathogenicity characteristics and the immune response developed under these isolates. Also this work proposed to investigate whether treatment could mediate an adaptative immune response involving T<sub>H</sub>17 cells. A significant increase in IL-17 levels at 6h postinfection was observed and was maintained up to 18h in the Con-A group, whereas in control mice, a reduction in this cytokine was verified. Correlating with IL-17 production, in the Con-A treated group, migration of neutrophils began increasing after 6h postinfection, achieving peak counts at 18h. TGF- $\beta$  levels increased significantly 2h postinfection in Con-A-treated mice. Macrophages were involved in the process, engulfing greater numbers of yeast cells, and were activated through TNF- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  produced at significant levels at 2h postinfection. Thus, they were probably more capable of killing and processing *Candida* antigens, signaling an adaptative immune response. Macrophages from controls did not prevent yeast-to-hyphae transition and were partially destroyed, as shown in scanning microscopy. These results suggest that treatment with Con-A facilitated the triggering of T<sub>H</sub>17 and T<sub>H</sub>1 responses via IL-17 and IFN- $\gamma$  production, leading to the resolution of *C. albicans* infection.

**Keywords:** Concanavalin-A. *Candida* spp. Citocines. Immune response.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de <i>Candida spp.</i> .....	33
<b>Tabela 2</b> – Identificação das leveduras isoladas por métodos bioquímicos e PCR.....	39
<b>Tabela 3</b> – Efeito inibitório de manana e laminarina na fagocitose <i>Candida</i> .....	45
<b>Tabela 4</b> – Transição para formas filamentosas durante coincubação de <i>Candida ssp</i> com macrófagos.....	47
<b>Tabela 5</b> – Porcentagem de macrófagos e neutrófilos fagocitando <i>Candida albicans</i> durante infecção .....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Eletromicrografia das quatro espécies de <i>Cândida</i> .....	40
<b>Figura 2 –</b>	Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de espécies de <i>Candida</i> .....	41
<b>Figura 3 –</b>	Macrófagos pré-tratados com concanavalina-A e PBS por 72 horas .....	42
<b>Figura 4 –</b>	Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de <i>C. albicans</i> .....	42
<b>Figura 5 –</b>	Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de <i>C. glabrata</i> .....	43
<b>Figura 6 –</b>	Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de <i>C. krusei</i> .....	43
<b>Figura 7 –</b>	Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de <i>C. tropicalis</i> .....	44
<b>Figura 8 –</b>	Efeito de concanavalina-A na atividade candidacida de macrófagos .....	46
<b>Figura 9 –</b>	Efeito de Con-A na produção <i>in vitro</i> de TNF- $\alpha$ .....	47
<b>Figura 10 –</b>	População de células fagocíticas no exsudado peritoneal durante o curso de infecção por <i>C. albicans</i> .....	48
<b>Figura 11 –</b>	Efeito de concanavalina-A na recuperação de <i>Candida albicans</i> da cavidade peritoneal durante o curso da infecção .....	49
<b>Figura 12 –</b>	Efeito de Con-A na produção <i>in vivo</i> de IL-17.....	50
<b>Figura 13 –</b>	Efeito de Con-A na produção <i>in vivo</i> de TGF- $\beta$ .....	51
<b>Figura 14 –</b>	Efeito de Con-A na produção <i>in vivo</i> de INF- $\gamma$ .....	51
<b>Figura 15 –</b>	Efeito de Con-A na produção <i>in vivo</i> de TNF- $\alpha$ .....	52
<b>Figura 16 –</b>	Efeito de Con-A na produção <i>in vivo</i> de IL-12.....	52

### Legends

**Figure 1 –** Effect of pretreatment with concanavalin-A on IL-17 production over the course of *C. albicans* infection. Mice were pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before

	inoculation i.p. with $10^7$ <i>C. albicans</i> . The results from noninfected mice are shown in C. The supernatants from peritoneal exudates were collected and IL-17 was determined by ELISA. Statistically significant at *P < 0.05 for Con-A versus PBS group.....	85
<b>Figure 2 –</b>	TGF- $\beta$ production over the course of infection with <i>C. albicans</i> . Mice pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days were inoculated with $10^7$ <i>C. albicans</i> . The amount TGF- $\beta$ in the supernatants from peritoneal exudates was determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate and the results represent the mean $\pm$ SEM of 5 independent experiments. *P < 0.05 Con-A versus PBS group .....	85
<b>Figure3 –</b>	Populations of phagocytic cells in the peritoneal exudate over the course of infection. Mice were pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with $10^7$ <i>C. albicans</i> . The results represent the means values $\pm$ SEM for 5 experiments. Statistically significant at *P < 0.05 compared to noninfected mice (C) .....	86
<b>Figure 4 –</b>	Effect of Con-A on the recovery of <i>Candida albicans</i> from peritoneal cavity. Mice were pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with $10^7$ <i>C. albicans</i> . The results are reported as the mean of CFUs $\pm$ SEM per ml of peritoneal exudates from 5 experiments. Statistically significant at *P < 0.05 for Con-A versus PBS group .....	87
<b>Figure 5 –</b>	Contrasting features of peritoneal macrophages from mice pretreated with PBS for 3 days (A); or Con-A (B); PBS-macrophages infected with <i>C. albicans</i> (C); Con-A-activated macrophages infected with <i>C. albicans</i> (D).....	87
<b>Figure 6 –</b>	Effect of Con-A on IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ production over <i>C. albicans</i> infection. Mice pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days were inoculated with $10^7$ <i>C. albicans</i> . The amount of IFN- $\gamma$ (A) and TNF- $\alpha$ (B) in the	

supernatants from peritoneal exudates was determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate and the results represent the mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*P< 0.05 Con-A versus PBS group.....88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg</b>	Microgramas
<b>µl</b>	Microlitro
<b>6-CFDA</b>	6-Carboxifluoresceína diacetato
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ALT</b>	Atividade de alanina transaminase
<b>CMC</b>	Candidíase crônica mucocutânea
<b>Con-A</b>	Concanavalina-A
<b>COV</b>	Candidíase orofaríngea
<b>CR</b>	Receptor de complemento
<b>CVV</b>	candidíase vulvovaginal
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático de captura
<b>Fig</b>	Figura
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
<b>H</b>	Horas
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama
<b>IHs</b>	Infecções hospitalares
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Imunidade mediada por célula
<b>ITS</b>	Internal transcribed spacer
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MC</b>	Candidíase de mucosa
<b>MgCL<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>MR</b>	Receptor de manose
<b>MI</b>	Mililitros
<b>Mm</b>	Milimolar
<b>NK</b>	Natural killer

<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados ao patógeno
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pH</b>	Potencial Hidrogênionico
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucléico ribossômico
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento padrão
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>Spp</b>	Espécie não identificada
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>Th1</b>	Linfócitos T helper 1
<b>Th17</b>	Células T helper 17
<b>Th2</b>	Linfócitos T helper 2
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral – alfa
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>Vs</b>	Versus



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
1.1	CANDIDÍASES	17
1.2	ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i>	18
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA	21
1.4	RESPOSTA IMUNE A CANDIDÍASE	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	31
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	32
3.1	ANIMAIS	32
3.2	AMOSTRAS EM ESTUDO	32
3.3	IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA POR CHROMÁGAR <i>CANDIDA</i>	32
3.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	33
3.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
3.5	CULTURA DE <i>CANDIDA</i>	34
3.6	ENSAIO FAGOCÍTICO <i>IN VITRO</i>	35
3.6.1	Dimorfismo	36
3.6.2	Ensaio Candidacida	36
3.6.3	Análise de Receptores	36
3.6.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
3.7	INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS	37
3.8	DOSAGEM DE CITOCINAS	38
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	53
	<b>CONCLUSÕES</b>	61
	<b>REFERÊNCIAS</b>	62

<b>APÊNDICE</b> .....	74
APÊNDICE A – Artigo submetido à publicação no periódico FEMS Immunology and Medical Microbiology .....	75

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CANDIDÍASES

O gênero *Candida* é constituído por leveduras que se reproduzem por brotamentos e está distribuído universalmente colonizando homens e animais, sobretudo o tegumento e mucosas digestiva, genital e respiratória. Algumas espécies podem vir a causar infecções que variam desde candidíase superficial mucosa e cutânea até disseminação hematogênica extensa (MURRAY *et al.*, 2006).

Infecções fúngicas têm aumentado substancialmente em número e severidade nas últimas duas décadas, e as espécies do gênero *Candida* são frequentemente isoladas como causa de infecções invasivas. Inúmeros fatores contribuem para isso, como o aumento da população com imunossupressão, defeitos no número e na função de neutrófilos e na imunidade mediada por células, disfunções metabólicas e extremos de idade (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Pacientes pediátricos em condições críticas são especialmente vulneráveis a infecções por *Candida*, em parte devido à idade e gravidade da doença e pelos procedimentos invasivos utilizados (FILITI; SPIROGLOU; ROILIDES, 2007). O uso de antibióticos de amplo espectro, quimioterapia, e transplantes também aumentam o risco para doenças e fungos oportunistas (NUCCI; MARR, 2005).

Múltiplas infecções oportunistas fúngicas estão associadas à infecção pelo vírus HIV, sendo a candidíase orofaríngea a mais frequente (GREENSPAN *et al.*, 1990), e considerada uma doença secundária indicativa de AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida). Estudos epidemiológicos recentes revelaram a substituição das espécies de *Candida* mais susceptíveis a antifúngicos, como *C. albicans*, por espécies menos suscetíveis, como *C. glabrata* e *C. krusei*. Uma pequena sub-população de pacientes desenvolvem resistência clínica aos agentes antifúngicos convencionais, possivelmente devido a episódios recorrentes de candidíase de mucosa (MC) e exposição freqüente ao agente antifúngico (VAZQUEZ, 2010). Em estudo realizado por Sánchez-Vargas *et al.* (2005) com leveduras isoladas da cavidade oral de 111 pacientes mexicanos infectados pelo HIV e 201 não infectados, a *C. albicans* foi a espécie mais isolada (83,5%) e

espécies não *albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) e *Saccharomyces cerevisiae*, foram isoladas de 16,5% pacientes colonizados. Houve nove casos de infecção ou colonização por pelo menos duas espécies diferentes.

## 1.2 ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Entre as várias espécies capazes de causar infecções humanas, a *C. albicans* predomina na maioria das infecções genitais, orais e cutâneas, entretanto estudos recentes têm observado um aumento na proporção de infecções causada por espécies não *albicans*. As razões para essa emergência não está completamente esclarecida, mas algumas condições médicas possuem impacto no risco de desenvolver candidemia por espécies não *albicans*, por exemplo: casos de candidemia por *C. tropicalis* estão associadas com câncer e neutropenia (KONTOYIANNIS *et al.*, 2000); fungemia por *C. krusei* e *C. glabrata* são associadas com exposição prévia a azóis (MARR *et al.*, 2000).

Zepelin *et al.* (2007) coletaram 561 isolados de *Candida* de pacientes (sangue, fluidos cérebro-espinhais e espécimes obtidas cirurgicamente), sendo que *C. albicans* foi a espécie mais frequente (58,5%), seguido por *C. glabrata* (19,1%), *C. parapsilosis* (8%), *C. tropicalis* (7,5%) e *C. krusei* (1,4%). As razões para essa distribuição das espécies podem estar fortemente relacionadas com o potencial de virulência destes micro-organismos e ao uso profilático e empírico de drogas antifúngicas (TAMURA *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Alvarez *et al.* (2003) com 1.765 pacientes da Espanha, demonstrou que 22% destes pacientes admitidos por mais de sete dias em UTI desenvolveram candidúria. *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada de culturas de urina, seguido por *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Uso prévio de agentes antifúngicos foi o único fator de risco para a seleção de candidúria por *Candida* não *albicans*.

Em estudo epidemiológico realizado por Borges *et al.* (2009) foi investigada a participação de *Candida* como agente de colonização e sepse e os fatores de risco associados a neonatos internados na UTI Neonatal em Uberlândia entre 2007 e 2008. Aproximadamente, 19% dos neonatos estavam colonizados por

*Candida*, sendo identificadas como *Candida albicans* (51%), *Candida krusei* (22%), *Candida glabrata* (16%), *Candida parapsilosis* (9%) e *Candida tropicalis* (2%). Destas amostras, 93% apresentaram resistência a antifúngicos (BORGES *et al.*, 2009).

A epidemiologia de infecções por *Candida* tem sido extensivamente estudada na América do Norte e Europa enquanto na América Latina tais estudos são limitados, além disso, é importante observar que as características epidemiológicas de algumas infecções fúngicas são muito diferentes na América Latina do que em outras partes do mundo (NUCCI *et al.*, 2010). O perfil de distribuição das espécies em casos de candidemia vem se modificando a cada ano, na década de 70 a 90 a porcentagem de isolamento de *Candida* não *albicans* era representada por 10-40%, em contraste, de 1991 a 1998, essas espécies representaram 35 a 65% das candidemias (KRCMERY; BARNES, 2002).

No Brasil, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as espécies mais comuns isoladas em muitos centros médicos (FRANÇA *et al.*, 2008; HINRICHSEN *et al.*, 2008; MOTTA *et al.*, 2010; XAVIER, 2009) enquanto nos Estados Unidos e Europa a *C. glabrata* é a segunda ou terceira espécie mais comum de *Candida* isolada de pacientes com infecções invasivas (PFALLER *et al.*, 2000). Um estudo epidemiológico recente conduzido em 11 centros médicos brasileiros verificou que a mortalidade por candidemia foi de 54% para *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%) (COLOMBO *et al.*, 2006). Em outro estudo epidemiológico realizado por Bruder-Nascimento *et al.* (2010), foram analisados 212 isolados de pacientes do Hospital das Clínicas em Botucatu, São Paulo entre 1998 e 2005. Destes isolados, *C. albicans* (31,8%), *C. parapsilosis* (17,9%), e *C. tropicalis* (11,8%) foram as espécies mais encontradas. Além disso, a espécie *C. parapsilosis* apresentou alta frequência tanto em infecções no sangue como em peritonites associadas à diálise, enquanto *C. albicans* ocorreu em um importante número de infecções, com distribuição homogênea entre as amostras clínicas.

A espécie *Candida parapsilosis* é considerada como um agente de infecções exógenas por ser capaz de colonizar a pele, principalmente as mãos de profissionais da saúde, assim como soluções glicosadas de uso hospitalar e cateter venoso central. Sua detecção é particularmente associada à nutrição parenteral total. A ocorrência de *C. parapsilosis* é maior em crianças, principalmente em

prematuros internados em Unidades de Terapia Intensiva (COLOMBO *et al.*, 2003; PFALLER *et al.*, 2007).

A *Candida tropicalis* tem sido considerada causa importante de fungemia e candidíase invasiva em doentes com câncer (ANAISSIE; GRAZZIUTTI; NUCCI, 2009). Na América latina, particularmente no Brasil, esta espécie também têm sido frequentemente isolada de sangue de pacientes não-oncológicos hospitalizados (GOLDANI ; MARIO, 2003). Esta levedura normalmente permanece suscetível a polienos e antifúngicos azóis, no entanto, os isolados clínicos resistentes a azólicos, em particular ao fluconazol, são cada vez mais relatados (VANDEPUTTE *et al.*, 2005). Diversos fatores de virulência parecem ser responsáveis pelas infecções causadas por *C. tropicalis*, as quais apresentam potencial elevado para disseminação e mortalidade (OKAWA; MIYAUCHI; KOBAYASHI, 2008). Há relato de uma criança de oito meses de idade que morreu de sepse e falência múltipla de órgãos, sendo que a ausência do timo nesta criança foi a possível causa da infecção por este patógeno oportunista (THIERAUF *et al.*, 2007).

Durante a década passada, o fluconazol foi extensivamente utilizado em pacientes neutropênicos. Isto resultou em uma considerável diminuição na incidência de candidíase invasiva, especialmente em transplantes de medula óssea alogênicas, entretanto, foi acompanhado por um aumento da susceptibilidade a outras espécies de *Candida*, por um processo de seleção (RICHARDSON, 2005).

A *C. glabrata* têm emergido como um importante e potencialmente resistente patógeno fúngico oportunista, sendo o segundo ou terceiro principal agente de candidíase em todos os locais, incluindo a mucosa orofaríngea e esôfagica. Sua resistência á drogas antifúngicas permite seu crescimento excessivo em relação a outras espécies sensíveis e podem contribuir para o aparecimento de infecções por *C. glabrata* em populações cronicamente imunocomprometidas (PFALLER; DIEKEMA, 2004). Dessa forma o aumento da proporção de fungemias devido a *C. glabrata* tem implicações importantes no tratamento a ser realizado (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999).

Em um estudo realizado por Ruan *et al.* (2008), verificou-se que entre 147 episódios de candidemia ocorridos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) a *C. glabrata* foi a segunda espécie mais comum, sendo encontrada em 30% dos episódios de candidemia, e 11% dos isolados foram resistentes ao fluconazol. A

fungemia causada por esta espécie foi observada com maior frequência em adultos mais velhos e está associada a uma taxa de mortalidade de 29% (MALANI *et al.*, 2005). Em estudo realizado por Klevay *et al.* (2009), pacientes com candidemia por *C. glabrata* apresentaram um risco maior de receber terapia antifúngica inicial inadequada, entretanto a mortalidade em quatro semanas não diferiu da mortalidade encontrada em pacientes com candidemia por *C. albicans*, isso pode refletir a importância fundamental das variáveis do hospedeiro e/ou uma diferença de virulência entre as espécies. Relatos clínicos sugerem que a infecção oral com misto de *C. albicans* e *C. glabrata* pode ser mais grave e é mais difícil de tratar (REDDING *et al.*, 2002).

*Candida krusei* tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (COLOMBO, 2003). Segundo Hachem *et al.* (2007), os pacientes que tinham doenças hematológicas possuíam maior risco de candidemia causada por *Candida* não *albicans*, sendo as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* as mais comuns. Tal constatação foi associada com o uso prévio de fluconazol como antifúngico profilático. Além da resistência intrínseca ao fluconazol, a *C. krusei* apresenta claramente uma diminuição da susceptibilidade à anfotericina B e flucitosina. Existe relato da emergência de *C. krusei* com menor susceptibilidade a caspofungina, como potencial causa de candidíase orofaríngea (HAKKI; STAAB; MARR, 2006). Portanto, testes de suscetibilidade desta espécie a estes agentes antifúngicos podem ser justificados para auxiliar na escolha do tratamento (PFALLER *et al.*, 2008).

### 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

A patogênese de infecções causadas por *C. albicans* e leveduras relacionadas é um processo complexo que pode envolver uma série de fatores de virulência como a morfogênese dos fungos, produção de enzimas, formação de biofilme, síntese de toxinas e adesão ao tecido (YANG, 2003). A capacidade de *Candida spp* persistir no local colonizado e causar infecção têm sido atribuídos à capacidade dessas leveduras em crescer em extremas condições fisiológicas de pH

e nutrientes. Além disso, o dimorfismo (células unicelulares e pseudo-hifas) e a capacidade de variar fenotipicamente contribuem para o processo infeccioso (CALDERONE; FONZI, 2001).

Algumas leveduras são capazes de sofrer morfogênese, passando de levedura para forma filamentosa, e isso contribui para o aumento do seu potencial patogênico (HAYNES, 2001). Calderone (2002) relatou que a formação de tubos germinativos em soro ou meio similar é característica de 95 a 97% dos isolados clínicos de *C. albicans* e *C. dublinensis*. Enwuru *et al.* (2008) concluíram que embora tenha sido constatada a formação de tubo germinativo em quatro cepas de *C. tropicalis*, a confiabilidade da produção de tubos germinativos como um teste de confirmação de *C. albicans* na infecção por HIV foi de 96,7% e por isso é recomendada para uso contínuo. Foi demonstrado que *C. glabrata* é capaz de formar pseudo-hifas em resposta à privação de nitrogênio (CSANK ; HAYNES, 2000). Entretanto sua importância não é conhecida em infecções por *C. glabrata*, e as pseudo-hifais não são encontradas em amostras clínicas. Em contraste com a maioria das espécies de *Candida* que possuem formas ovaladas, *C. krusei* geralmente possui formas alongadas. Usualmente são encontradas em duas morfologias básicas: leveduriforme e pseudo-hifa, ambas frequentemente presentes em culturas, não sendo distinguidas com facilidade (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994).

As espécies *C. glabrata* e *C. albicans* diferem em aspectos essenciais na sua interação com o hospedeiro, sendo que características importantes para virulência de *C. albicans*, como formação de hifas ou secreção de proteinases, não desempenham um papel conhecido na virulência de *C. glabrata*. Entretanto ambas as espécies realizam switching fenotípico e codificam genes para adesina (KAUR *et al.*, 2005).

*C. albicans* possui variabilidade fenotípica (switching), sendo capaz de alterar de forma reversível o seu fenótipo (SOLL, 1992). Esta variabilidade fenotípica está relacionada à virulência e é encontrada com maior frequência em isolados provenientes de infecções invasivas (JONES *et al.*, 1994). Foi demonstrado que cepas de *C. glabrata* também possuem habilidade de realizar variação fenotípica, mudando espontaneamente, de forma reversível em três fenótipos principais: colônias brancas, marrom clara ou marrom escura (LACHKE, 2000). Srikantha *et al.* (2008) demonstraram que o fenótipo marrom escuro, expresso com



maior frequência em isolados clínicos de *C. glabrata*, possui vantagem na colonização de órgãos em um modelo de infecção sistêmica em camundongos, sendo, portanto mais virulento que os outros fenótipos.

A capacidade de se associar de forma estável em superfícies epiteliais é importante para várias espécies de micro-organismos que colonizam mucosas. A pré-condição para a colonização e infecção de *C. albicans* é a sua aderência na superfície da célula hospedeira e essa adesão pode depender de uma variedade de ligantes celulares (KLOTZ *et al.*, 2004). Pesquisadores relatam que a hidrofobicidade de superfície celular está relacionada com a aderência em superfícies abióticas e não abióticas (HAZEN, 1995). Espécies de *Candida* isoladas de pacientes com diabetes mellitus expressaram uma maior capacidade de adesão do que as isoladas de indivíduos saudáveis (MANFREDI *et al.*, 2006).

Infecções por *Candida* são comumente associadas com formação de biofilme, que consiste em leveduras, hifas e pseudo-hifas arranjadas em uma estrutura complexa. A formação de biofilmes é estável e representa uma característica fenotípica de cepas de *Candida* apresentando variações entre *C. albicans* e espécies não *albicans*, e desempenha um importante papel na persistência da infecção (HASAN *et al.*, 2009). A maior resistência a antifúngicos por biofilmes de *Candida* é uma característica intrínseca possivelmente relacionada com a estrutura do biofilme (SENEVIRATNE; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2008).

Em estudo por Bizerra *et al.* (2008), foi mostrado que o desenvolvimento e arquitetura do biofilme de *C. tropicalis* são semelhantes aos descritos para outras espécies de *Candida*. Além disso, uma elevada resistência ao fluconazol e anfotericina B foi demonstrada. Outro estudo, realizado por Negri *et al.* (2010) com sete isolados de *C. tropicalis* de culturas de urina, sangue e cateter venoso central, demonstrou que todos os isolados foram capazes de formar biofilme e expressar atividade hemolítica total, sendo sensíveis ao fluconazol e anfotericina B. Apenas um destes isolados produziu fosfolipase.

Enzimas hidrolíticas podem contribuir para a invasão e proliferação do fungo causando destruição de tecidos do hospedeiro. As isoenzimas Aspartil Proteinases Secretoras (SAPs) são importantes determinantes de virulência de *C. albicans* e possuem diferentes papéis durante infecção. SAPs são codificadas por uma família de 10 genes homólogos que são diferencialmente regulados durante a

infecção, indicando que tais isoenzimas realizam funções específicas (STAIB *et al.*, 2000). A produção e secreção destas proteinases são provavelmente necessárias para a aquisição de nutrientes, aderência, penetração, e evasão do sistema imune (NAGLIK *et al.*, 2004).

Destas 10 isoenzimas, SAP1-8 são secretadas enquanto SAP9 e SAP10 estão associadas à membrana celular do patógeno. As subfamílias de SAP1-6 são conhecidas por hidrolisar proteínas do hospedeiro e conseqüentemente causar dano a tecidos, sendo SAP1-3 necessárias para infecções de mucosa e SAP4-6 para infecções sistêmicas (FELK *et al.*, 2002; SCHALLER *et al.*, 1999). Enquanto SAP9 e SAP10 estão ligadas a processos regulatórios na superfície celular de fungos, sendo essenciais para patogenicidade (ALBRECHT *et al.*, 2006).

Além de serem importantes fatores de virulência de *C. albicans* durante infecções sistêmicas e de mucosa, SAPs também podem contribuir na indução da resposta inflamatória do hospedeiro. Schaller *et al.* (2005) demonstraram que proteinases secretadas por *C. albicans*, em especial SAP1 e SAP2, podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a um modelo de candidíase vaginal.

A produção de SAP é induzida *in vitro* em meio de cultura contendo proteína exógena (geralmente albumina de soro bovino) como única fonte de nitrogênio (ALMEIDA *et al.*, 2004), podendo ser induzida também por hemoglobina, queratina, colágeno, ou misturas complexas de peptídeos, como por exemplo, peptona e triptona (LERNER *et al.*, 1993). Em modelos de infecção, a importância das isoenzimas SAPs para a virulência de *C. albicans* varia muito, já que diferenças na configuração experimental têm impacto na dependência da atividade de proteinase para a invasão e estabelecimento em diferentes nichos do hospedeiro (LERMANN *et al.*, 2008).

*C. albicans* não é a única espécie capaz de produzir proteinases extracelulares. Tem sido demonstrado que muitas espécies patogênicas de *Candida* possuem genes SAP, incluindo *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (NAGLIK *et al.*, 2003). Bramono *et al.* (2006) demonstraram que *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* mostraram altos níveis de atividade de proteinase, lipase e  $\alpha$ -glucosidase e que *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* não mostraram atividade enzimática significativa, com exceção da lipase. O estudo realizado por Almeida *et al.* (2004) verificou *in vitro* a produção de proteinases pelas espécies de

*Candida* das cepas CR2 (*C. tropicalis*), CR6-2 (*C. albicans*), CR6-3 (*C. glabrata*) e CR20 (*C. krusei*) em meio contendo albumina como única fonte de nitrogênio.

A alta produção de fosfolipase está correlacionada com um aumento na capacidade de aderência, a maior taxa de mortalidade em modelos animais (IVANOSKA, 2003) e dano a membrana celular do hospedeiro. Embora tenha sido demonstrado que espécies *não albicans* podem secretar fosfolipase, é importante ressaltar que estas espécies secretam quantidades significativamente menores de fosfolipase em relação a *C. albicans* (GHANNOUM, 2000). Em estudo realizado por Costa *et al.* (2009), foram isoladas colônias de pacientes com ou sem a presença clínica de candidíase oral, e foi observada secreção de aspartil proteinase tanto em *C. albicans* quanto em *C. tropicalis*, sem diferenças significativas entre as espécies, sendo que a produção de fosfolipase foi encontrada apenas em *C. albicans*. A resistência a antifúngicos foi verificada em ambas as espécies, sendo que *C. tropicalis* foi mais resistente aos antifúngicos testados que a *C. albicans*.

A capacidade de um organismo patogênico adquirir ferro do mamífero hospedeiro possui grande importância no estabelecimento da infecção (WEINBERG, 1978). Manns *et al.* (1994) descreveram a habilidade de *C. albicans* em utilizar ferro de hemoglobinas pela produção de hemolisinas, capazes de lisar eritrócitos. A produção desse fator hemolítico pode ser observada pelo crescimento da *Candida* em meio ágar sangue, enriquecido com glicose, e os termos alfa e beta hemólise denotam hemólise completa e incompleta do meio. Luo *et al.* (2001) demonstraram que diversas espécies de *Candida não albicans* obtidas de fontes clínicas exibiram uma variável habilidade de produzir ambos os tipos de atividade hemolítica. França *et al.* (2010) analisaram 28 isolados de *C. tropicalis* obtidos de diferentes amostras clínicas, como sangue, urina e secreção traqueal, sendo que todos os isolados apresentaram capacidade de promover hemólise *in vitro*.

Furlaneto-Maia *et al.* (2008) identificaram isolados de *Candida* provenientes da cavidade oral de indivíduos saudáveis obtendo predominância de espécies *não albicans* (89%) em comparação a *C. albicans* (11%). Foram investigados fatores de virulência de 18 isolados, onde todos apresentaram atividade hemolítica, 28% apresentaram produção de fosfolipase extracelular, 56% formaram biofilme e isolados de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* apresentaram resistência ao fluconazol.

#### 1.4 RESPOSTA IMUNE A CANDIDÍASE

Alterações na integridade do sistema imunológico determinam se o fungo permanece como um simples comensal, ou prolifera e causa doenças. A análise dos mecanismos de resistência de camundongos contra candidíase gastrointestinal ou oral demonstrou uma absoluta dependência das células T CD4+, e o envolvimento de células fagocitárias (ASHMAN *et al.*, 2004). Portanto, a imunidade inata e a adaptativa desempenham um papel crucial nas infecções causadas por *Candida*, e suas contribuições na proteção do hospedeiro dependem em grande parte do local da infecção.

Em infecções na mucosa a imunidade inata tem grande importância, e é representada por fagócitos (neutrófilos e macrófagos), células natural killer (NK) e células dendríticas. A interação da *Candida* com o sistema imune inato pode levar a uma atividade antifúngica, e uma atividade regulatória que promove a quimiotaxia, proliferação e diferenciação terminal de células da imunidade inata e adaptativa, através da síntese de citocinas (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005).

*C. albicans* é um potente indutor de uma cascata dinâmica de expressão de genes cujos produtos estão relacionados com o recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos. Tais genes codificam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como inúmeras outras moléculas envolvidas na resposta inicial a este microrganismo (KIM *et al.*, 2005).

Os macrófagos constituem uma das populações iniciais de células fagocíticas que medeiam as defesas do hospedeiro contra a *C. albicans* (ASHMAN *et al.*, 2004). Estas células produzem um intrincado padrão de citocinas e quimiocinas que aumentam a quimiotaxia, fagocitose e atividade microbicida, além da ativação de células T através do processamento e apresentação de antígenos (ASHMAN; PAPADIMITRIOU, 1995). Uma resposta imune efetiva requer que os macrófagos reconheçam padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), presentes na superfície do patógeno, mas ausente no hospedeiro (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A composição da membrana e parede celular de *C. albicans* representa o alvo para vários receptores presentes em células fagocíticas, que variam de acordo com estímulos ambientais como temperatura, pH e a presença de soro (SUNDSTROM *et al.*, 2002).

A lectina mitogênica concanavalina-A (Con-A), isolada de *Canavalia ensiformis* induz a ativação policlonal de linfócitos (AGRAWAL ; GOLDSTEIN, 1968). Con-A liga-se diretamente às moléculas de carboidratos (D-glucopiranosídeo e D-manopiranosídeo) do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e no receptor do linfócito T (TCR) e induz a resposta celular pela oligomerização de TCRs na superfície celular, resultando na indução da resposta celular (ANDERSON; MELCHERS, 1976).

Tem sido mostrado que a lectina ligadora de manose aumenta a ativação do complemento (IP; LAU, 2004) ao se ligar a *C. albicans* presente em tecidos de camundongo, proporcionando proteção contra infecções experimentais (LILLEGARD *et al.*, 2006). Estudos anteriores demonstraram que o tratamento de camundongos com Con-A ativa os macrófagos peritoneais, aumentando a fagocitose de *C. albicans* mediada por receptores de manose e do complemento (GAZIRI *et al.*, 1999).

O efeito protetor do Con-A é dose-dependente e pode estimular macrófagos empregando os mesmos mecanismos, tanto em camundongos adultos quanto lactantes, aumentando assim sua capacidade para fagocitar e destruir *C. albicans* (MORESCO *et al.*, 2002). Resultados de Loyola *et al.* (2002) suportam a hipótese de que a ativação da resposta imune celular pelo Con-A ocorre em duas fases: uma dominada pelos neutrófilos, e outra pelos macrófagos expressando atividade aumentada dos receptores de manose.

Conchon-Costa *et al.* (2007) demonstraram que o Con-A exerceu um efeito protetor contra a infecção por *C. albicans*. Essa proteção foi tempo-dependente, já que 100% dos camundongos infectados após três dias de tratamento com o Con-A sobreviveram, enquanto apenas 20% do grupo controle sobreviveram após um período de 28 dias. Foi também observado que duas horas após a infecção por *C. albicans*, a produção de TNF- $\alpha$  no fígado de camundongos pré-tratados com Con-A aumentou significativamente. Portanto, o efeito protetor do Con-A foi evidenciado por uma alta taxa de sobrevivência dos animais ao inoculo letal, índice normal de atividade de alanina transaminase (ALT), ativação de macrófagos, produção de TNF- $\alpha$  e aumento na eliminação do patógeno.

A morfogênese de leveduras pode ser um determinante importante na resposta do hospedeiro, considerando que leveduras são muitas vezes fagocitadas de forma eficaz, enquanto que um aumento no tamanho das hifas

diminui essa eficácia (SHOHAM; LEVITZ, 2005). Por exemplo, a forma leveduriforme de *C. albicans* é reconhecida pelos receptores Toll-like 4 e Dectin-1, os quais estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias que favorecem a eliminação da *Candida* (GANTNER; SIMMONS; UNDERHILL 2005; NETEA *et al.*, 2002). Entretanto, tanto a forma leveduriforme quanto hifas são reconhecidas por receptores Toll-like 2, os quais medeiam a liberação de citocinas antiinflamatórias favorecendo a sobrevivência da *Candida* (BLASI *et al.*, 2005). Leveduras mutantes, que se apresentam apenas na forma de levedura, são menos virulentas em modelos experimentais de candidíase disseminada (KRUEGER *et al.*, 2004; WARENDA *et al.*, 2003).

O fato de que macrófagos TLR2<sup>-/-</sup> terem melhor atividade fagocitária do que os macrófagos controle sugerem que o receptor TLR2 pode interferir na atividade dos outros receptores envolvidos no reconhecimento e ingestão da célula fúngica (BLASI *et al.*, 2005).

As diferenças entre a resposta imune do tipo CD4<sup>+</sup> Th1 e CD4<sup>+</sup> Th2 são consideradas um fator importante para a susceptibilidade ou resistência a infecção por *Candida*. Enquanto uma resposta imune do tipo Th1 com produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 está relacionada com resistência à *Candida*, a resposta tipo CD4<sup>+</sup> Th2 com secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, está relacionada com susceptibilidade a este patógeno (ROMANI *et al.*, 1992; NETEA *et al.*, 2005; VULTAGGIO *et al.*, 2008). Apesar da imunidade mediada por células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 ser considerada o mecanismo de defesa predominante do hospedeiro contra a candidíase orofaríngea, outros mecanismos imunes locais ou sistêmicos são importantes quando o número de células CD4<sup>+</sup> está reduzido a um limiar de proteção (FIDEL, 2006).

Os níveis de IFN- $\gamma$  afetam múltiplos componentes do sistema imune, como o reconhecimento do patógeno, apresentação de antígenos, aumento da atividade antifúngica de macrófagos e neutrófilos (SEGAL *et al.*, 2006). Foi verificado que a incubação de neutrófilos e macrófagos peritoneais com IFN- $\gamma$  aumenta sua atividade candidacida durante a candidíase (ROILIDES *et al.*, 1995). Resultados obtidos por Xiong *et al.* (2000) demonstraram que *C. albicans* e *C. krusei* induzem diferencialmente a produção de IL-12 por monócitos. Enquanto a *C. krusei* foi capaz de induzir a produção de IL-12 por monócitos, a *C. albicans* induziu apenas a produção de IL-10. Tais resultados indicam que *C. albicans* por possuir a

capacidade de induzir a expressão de IL-10 pode gerar um estado mais susceptível do hospedeiro à candidíase.

Um estudo realizado por Li *et al.* (2007) demonstrou que cepas de *C. glabrata* orofágicas induziram pronunciada síntese de GM-CSF e uma fraca ou indetectável síntese de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais bucais, quando comparada a *C. albicans*. Além disso, tais cepas de *C. glabrata* demonstraram potenciais variáveis de dano a tecidos e potencial invasivo, que foram em geral menores que as de *C. albicans*. A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória no hospedeiro e invadir o epitélio oral sugere a participação destas espécies na ativação da resposta imune do hospedeiro, na resposta inflamatória da mucosa oral, e sua contribuição para a patogênese.

Pacientes com candidíase crônica mucocutânea (CMC) são seletivamente incapazes de eliminar *Candida*, o que resulta em infecções debilitantes e persistentes que afetam a pele, unhas e membranas mucosas. Resultados demonstraram que pacientes com CMC possuem uma produção marcadamente prejudicada da citocina IL-12 e níveis dramaticamente aumentados de IL-6 e IL-10, em resposta a *Candida*. Estes resultados sugerem que os pacientes com CMC produzem citocinas que induzem a resposta Th1 prejudicada, o que poderia resultar em uma incapacidade de realizar uma resposta protetora mediada por células e falhar em eliminar o fungo. A lesão tecidual contínua e inflamação podem desencadear a produção de elevados níveis de citocinas inibidoras, como a IL-10, o que reduziria ainda mais a produção de citocinas indutoras da resposta Th1 em um ciclo de realimentação positiva levando a infecção persistente (LILIC *et al.*, 2003).

Além das sub-populações Th1 e Th2, recentemente foram descritas células T helper 17 (Th17) que produzem Interleucina-17 (IL-17), uma citocina importante na defesa do hospedeiro contra vários patógenos e que induz a infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) ao local da infecção, ativação de neutrófilos e macrófagos e síntese de peptídeos microbianos (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). Estudos anteriores demonstraram que IL-17 produzida em murinos possui importância para defesa do hospedeiro contra algumas bactérias gram-negativas (YE *et al.*, 2001) e também contra fungos, onde a expressão *in vivo* de IL-17 por camundongos os protegeu de uma dose letal de *C. albicans* (HUANG; FIDEL; SCHARZENBERGER, 2004). Um estudo realizado por Veerdonk *et al.* (2009)

identificou o padrão de receptores de reconhecimento específico que desencadeiam a resposta Th17 induzida por um patógeno humano na ausência de estimulação mitogênica. A IL-17 induzida por *Candida* foi dependente de células apresentadoras de antígenos e dos receptores de manose em macrófagos (MR), demonstrando que a manana presente na *Candida* não é apenas um estímulo mitogênico. A via TLR2/dectin-1, mas não TLR4 ou NOD2 amplifica a produção de IL-17 sinalizada por receptores de manose.

Apesar dos avanços na compreensão da resposta do hospedeiro às infecções causadas por fungos invasivos, novos caminhos de terapêutica estão sendo abertos para utilizar o sistema imunológico do paciente contra tais patógenos. Ensaios clínicos são necessários para demonstrar a segurança e eficácia dessas novas abordagens (SHOHAM; ROILIDES; WALSH, 2009).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Avaliar o efeito de concanavalina-A no perfil de citocinas no curso de infecção com *C. albicans* e atividade fagocítica in vitro de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Avaliar a capacidade fagocítica e candidacida de macrófagos residentes e ativados com Con-A frente a estas espécies;
- Avaliar a transição da forma leveduriforme para a forma filamentosa durante a interação dos isolados de *Candida* com os macrófagos residentes ou ativados com Con-A;
- Avaliar a expressão e atividade dos receptores para fagocitose;
- Avaliar a produção de TNF- $\alpha$  após fagocitose dos isolados de *Candida* por macrófagos residentes ou ativados com Con-A;
- Analisar a modulação da resposta imune e a liberação de citocinas pró e antiinflamatórias na infecção por *C. albicans* em camundongos pré-tratados com Con-A.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços, pesando entre 28-35 gramas e 6-12 semanas de idade. Os camundongos foram mantidos em sala com temperatura ambiente e receberam ração estéril e água a vontade. O trabalho recebeu aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina sob registro n°157/2009.

#### 3.2 AMOSTRAS EM ESTUDO

Foram utilizadas quatro amostras de leveduras do gênero *Candida* (CR15 *C. albicans*, CR2 *C. tropicalis*, C20 *C. krusei*, CR6.3 *C. glabrata*) isoladas da mucosa oral de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Os isolados de *Candida* foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose cobertas por óleo mineral. Após crescimento em caldo Sabouraud dextrose, os isolados foram utilizados após duas passagens em camundongos.

#### 3.3 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA POR CHROMÁGAR *CANDIDA*

As leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose por 24h a 28°C e plaqueadas por esgotamento em ágar Sabouraud dextrose por 24 h a 37°C. Uma colônia de cada isolado foi transferida para o meio seletivo diferencial CHROMágar *Candida*<sup>®</sup> (Probac do Brasil).

Este meio é um dos meios cromogênicos capaz de identificar *C. albicans* e diferenciar outras leveduras de interesse clínico de acordo com a cor das colônias. A identificação é presuntiva e de grande utilidade na identificação de *C.*

*albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (ODDS *et al.*, 1995). Frente as limitações que o CHROMágar possui, a identificação molecular por PCR foi utilizada como teste confirmatório para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular das espécies de *Candida* foi realizada pelo emprego da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) no Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina, sob supervisão da professora Dr<sup>a</sup> Márcia Cristina Furlaneto.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR são espécie-específicos e foram desenhados com base nas regiões ITS (Internal transcribed spacer) 1 e 2 do gene rRNA (ácido ribonucléico ribossômico) (Tabela 1) (LI *et al.*, 2003).

**Tabela 1** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de *Candida spp.*

Espécie	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (bp)
<i>Candida albicans</i> (CA)	TCA ACT TGT CAC ACC AGA TTA TT	402
<i>Candida tropicalis</i> (CT)	AAG AAT TTA ACG TGG AAA CTT A	149
<i>Candida glabrata</i> (CGL)	CAC GAC TCG ACA CTT TCT AATT	632
<i>Candida krusei</i> (CK)	GAT TTA GTA CTA CAC TGC GTG A	475
(ITS4) (oligonucleotideo universal reverso)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

\*bp: pares de bases

### 3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a identificação molecular, via PCR, foram utilizadas células provenientes das colônias a serem identificadas, sem necessidade de extração de DNA genômico.

Na reação de amplificação foram utilizados para cada amostra 0,5µL do oligonucleotídeo iniciador espécie-específico (20pmol/µL), 0,5µL do oligonucleotídeo iniciador ITS4 (20pmol/µL) (Tabela 1), 0,8µL de desoxinucleotídeos 2,5 µM (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) (Invitrogen), 0,2 µL de Taq polimerase 5U/ µL (Invitrogen) juntamente com 2 µL do tampão (10x) e 0,6 µL de cloreto de magnésio MgCl<sub>2</sub> 50mM/mL, completando-se um volume final de 20 µL de reação com água bidestilada.

Todas as amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf, Mastercycle gradiente). O ciclo inicial de amplificação foi de 15 minutos a 96°C, seguidos de 34 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, ao final dos 34 ciclos houve mais 5 minutos a temperatura de 72°C para assim encerrar a reação.

A visualização dos produtos de amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose (1,4%). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo, observado sob luz ultravioleta e as imagens dos géis foram capturadas empregando o sistema Digi-Doc (Amersham-Pharmacia). O resultado foi positivo considerando a ocorrência de um único amplicon de tamanho predito para cada espécie (Tabela 1).

### 3.5 CULTURA DE *CANDIDA*

Os isolados inoculados em camundongos para ativação dos fatores de virulência foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose em temperatura ambiente. Para realização dos ensaios fagocíticos, as células fúngicas foram obtidas por crescimento em caldo Sabouraud dextrose por 24 horas a 28°C. Após este período de crescimento as leveduras foram coletadas por centrifugação (6 minutos a

4000 rpm), lavadas três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,0 e ressuspendidas.

### 3.6 ENSAIOS FAGOCÍTICOS *IN VITRO*

Camundongos machos Swiss, pesando entre 28-35g entre 60-80 dias foram tratados com dose única de 250 µg de Concanavalina-A (Sigma)/ 250µl de PBS, intraperitonealmente (i.p) ou apenas 250µl de PBS (grupo controle). Após três dias os animais foram sacrificados em éter etílico, as células do exsudado peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal com 3 ml de meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado por aquecimento. Os fagócitos coletados foram mantidos em frasco estéril imerso em gelo, para quantificação das células em câmara de Neubauer.

As células foram ajustadas a  $4 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  e adicionadas às lamínulas (22x22mm) contidas em placas de cultivo celular de 6 poços e incubadas por 1 hora a 37°C para permitir a aderência de células fagocíticas na superfície do vidro. Após este período de incubação as células foram lavadas com meio RPMI 1640, para remoção das células não aderentes.

Monocamadas de macrófagos peritoneais ativados com Con-A ou PBS foram coincubadas com *Candida* por 0,5 e 2 horas, a 37°C com 1 ml de RPMI contendo 5% de SFB inativado, tamponado a um pH de 7.2 com 6mM HEPES, contendo 5 leveduras ( $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) por fagócito. Para controle, 2 lamínulas contendo macrófagos de animais tratados com PBS ou Con-A foram incubadas sem adição de leveduras.

O sobrenadante foi coletado, centrifugado a 3000 RPM a 4°C por 10 minutos, e armazenado a -20°C para dosagem de citocinas. As células foram fixadas com metanol e coradas pelo método de May-Grumwald Giemsa. Com o auxílio de um microscópio óptico Nikon YS, um total de 200 macrófagos foi analisado em cada lamínula para estabelecer a proporção de macrófagos fagocitando.

### 3.6.1 Dimorfismo

O dimorfismo foi avaliado após 2 horas de coincubação de macrófagos com as espécies de *Candida*. Leveduras e formas filamentosas foram contadas dentro e fora dos macrófagos em imersão (10 campos), usando microscópio Nikon Alphaphot YS.

### 3.6.2 Ensaio Candidacida

O ensaio candidacida foi realizado após meia hora de coincubação de macrófagos com as espécies de *Candida*. Foi adicionado aos poços 1000µl de água destilada gelada para ocorrer a lise dos macrófagos e cada poço da placa de cultura foi agitado com pipeta Pasteur para ressuspender as células, e em seguida foi feita uma diluição de 1:100. Para a análise das unidades formadoras de colônia (UFC), foram plaqueadas alíquotas no volume de 25 µl e 50µl para o controle (*Candida* sem macrófagos) e para as amostras (macrófagos com *Candida*) e incubadas a 37°C durante 48 horas.

### 3.6.3 Análise de Receptores

Para o estudo do Dectin-1, um receptor que se liga a β-glucanas das cicatrizes do brotamento de células leveduriformes, o método usado por GANTNER *et al.*, 2003 foi utilizado; macrófagos peritoneais foram pré-incubados com 100 µg CM de laminarina (Sigma) por meia hora. Para o estudo dos receptores de manose, os macrófagos foram pré-incubados com 100 µg de manana. Os inibidores foram empregados em meio RPMI nos ensaios fagocíticos como descrito anteriormente no item 3.6. Um total de 200 fagócitos foi analisado em cada preparação e a porcentagem de fagócitos que apresentaram *Candida* fagocitadas foram contados após coloração das células com May-Grunwald Giemsa.

### 3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, sob supervisão da professora Dr<sup>a</sup> Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e com auxílio do Técnico Osvaldo Capello.

As células do exsudado peritoneal foram aderidas a lamínulas previamente tratadas com poli L-lisina por 1 hora. Após realização do ensaio fagocítico *in vitro* por 2 horas, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M por 2 horas, lavadas 3 vezes com tampão fosfato 0,1M, fixadas no escuro com ósmio 1% por 1 hora, lavadas 3 vezes com tampão fosfato 0,1M e mantidas em álcool 70% . Após a fixação, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 100%) sendo 3 vezes com álcool 70% e 80% e 4 vezes com álcool 90% e 100% por um período de 10 minutos para cada concentração. A última etapa foi a realização do ponto crítico com CO<sub>2</sub>, seguido da metalização com ouro. Por fim, a observação foi feita em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu 550 SS.

### 3.7 INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Cinco grupos de camundongos machos swiss, pesando entre 28-35g e 60-80 dias foram tratados com dose única de 250 µg de Concanavalina-A (Sigma)/ 250µl de PBS, intraperitonealmente (i.p) ou apenas 250µl de PBS (grupo controle). Após três dias os animais foram inoculados com *Candida albicans* CR15 ( $1 \times 10^7$  leveduras /ml RPMI) e sacrificados após 0,5; 2; 6; 18 e 24 horas em éter etílico. Um grupo de cinco camundongos sem infecção foi usado como controle.

As células do exsudado peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal com 2ml de meio RPMI 1640 contendo 5% de SFB inativado por aquecimento. Alíquotas (50µl e 100µl) foram plaqueadas em Agar Sabouraud dextrose e o número de UFC foi determinado após incubação por 48 horas a 37°C. Após centrifugação a 3000 RPM a 4°C por 4 minutos, o sobrenadante foi coletado e

armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para dosagem de citocinas, e o pellet foi ressuspenso em 1 ml de RPMI com 5% SFB. As células foram distribuídas em lamínulas (200 $\mu\text{l}$  por lamínula) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , com 5%  $\text{CO}_2$ , por meia hora. As células foram fixadas com metanol e coradas pelo método de May-Grumwald Giemsa. A porcentagem de macrófagos e neutrófilos foi estimada com o auxílio de microscópio óptico Nikon YS pela contagem de 20 campos em imersão.

### 3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os sobrenadantes dos ensaios fagocíticos foram coletados por centrifugação das amostras e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior detecção de citocinas através da técnica do ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) usando Kit da eBioscience (USA). A concentração da citocina foi determinada com referência na curva padrão por seriadas diluições, e a absorbância óptica mensurada a 492 nm.

Exudatos peritoneais de camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS e infectados com *C. albicans* foram centrifugados a  $4^{\circ}\text{C}$  e os sobrenadantes armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para dosagem de citocinas de acordo com o protocolo do fabricante de eBioscience. Foi avaliada a produção das citocinas IL-17, TGF- $\beta$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ .

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do teste t Student para avaliar a diferença entre as médias.  $P < 0,05$  foi considerado significativo.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO POR CHROMÁGAR E PCR

As amostras de leveduras foram identificadas através de dois métodos: cultivo em CHROMágar *Candida* e reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme descrito por Li *et al.* (2003). O meio CHROMágar *Candida* indica colônias verde-claras para *C. albicans* e azuis para *C. tropicalis* (ODDS; BERNAERTS, 1995). As colorações rosa e lilás, no entanto, são comuns em diferentes espécies de *Candida* (*C. Krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*), o que dificulta a interpretação do teste. Por isso foi necessário recorrer a outras características tais como rugosidade para orientar a identificação dessas espécies. Esta peculiaridade de rugosidade ao redor das colônias em *C. krusei*, foi citada por Garcia-Martos *et al.* (1998). A identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. Krusei* foi confirmada por PCR.

O isolado CR15 apresentou colônias de coloração verde, e foi confirmado por PCR como *C. albicans*; o isolado CR2 apresentou colônias de coloração azul, e foi confirmado por PCR como *C. tropicalis*; o isolado CR20 apresentou colônias rugosas de coloração rosa, e foi confirmado por PCR como *C. krusei* e o isolado CR6.3 apresentou colônias de coloração lilás, e foi identificado por PCR como *C. glabrata* (Tabela 2).

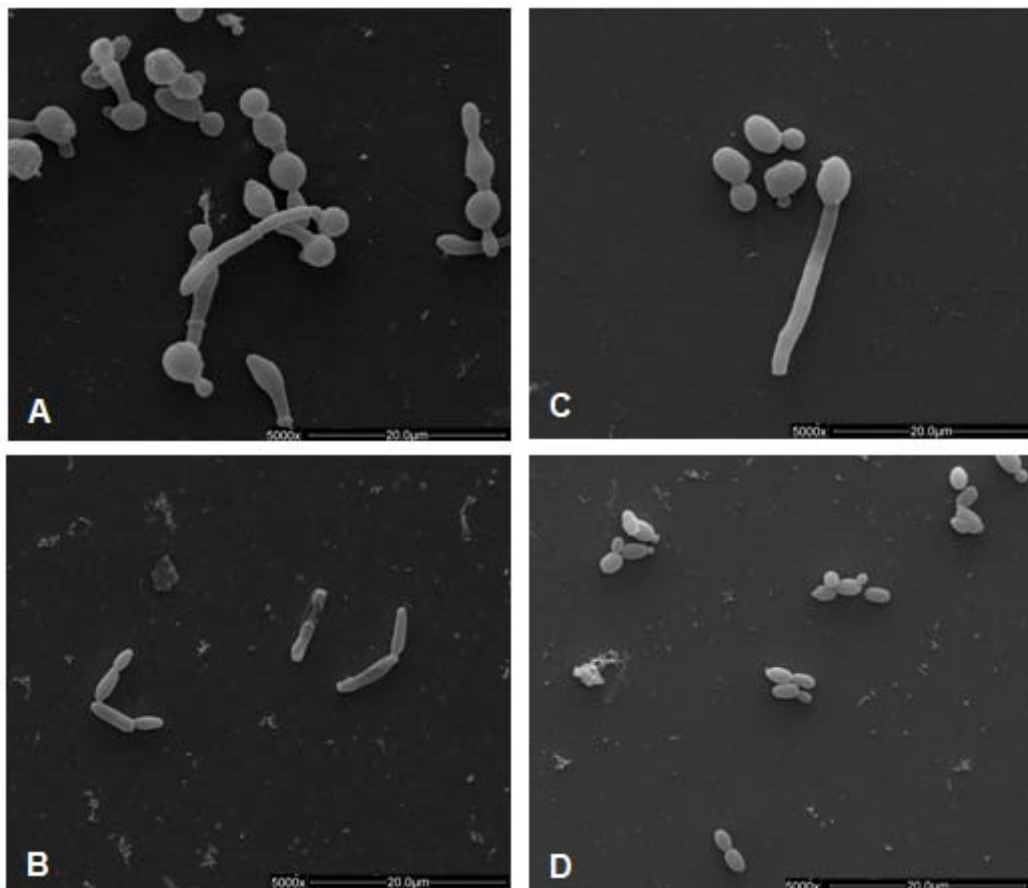
**Tabela 2** - Identificação das leveduras isoladas por métodos bioquímicos e PCR.

Isolado	CHROMágar	Identificação PCR
CR15	Verde*	<i>Candida albicans</i>
CR2	Azul*	<i>Candida tropicalis</i>
CR20	Rosa rugosa*	<i>Candida krusei</i>
CR6.3	Lilás*	<i>Candida glabrata</i>

As leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose por 24h a 28°C e plaqueadas por esgotamento em ágar Sabouraud dextrose por 24h a 37°C. Uma colônia de cada isolado foi transferida para o meio seletivo diferencial CHROMágar *Candida* e a identificação molecular das espécies foi realizada pela técnica de PCR. **\*Colônia Verde:** *Candida albicans*; **Azul:** *Candida tropicalis*; **Rosa rugosa:** *Candida krusei*.

## 4.2 DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE ISOLADOS DE *CANDIDA*

Os quatro isolados de *Candida* (CR15, CR2, CR20 e CR6.3) foram crescidos em caldo Sabouraud dextrose por 24 horas a 28°C, lavados 2 vezes com PBS e incubados por 2 horas em meio RPMI. A Figura 1 mostra a aparência morfológica dos quatro isolados após a microscopia eletrônica de varredura (5000x), onde se observa que *C. albicans* CR15 possui blastoconídeos arredondados e formação de hifas, *C. tropicalis* CR2 possui blastoconídeos ovais e formam pseudo-hifa; *C. krusei* CR20 são alongadas e apresentam formação de pseudo-hifas e *C. glabrata* CR6.3 possui blastoconídeos ovais e ausência de dimorfismo.



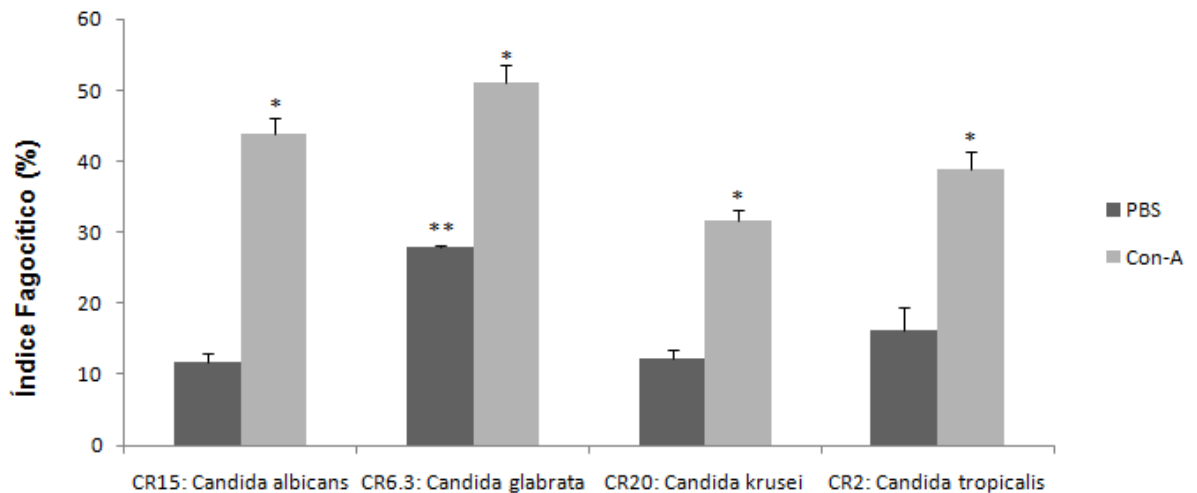
Os isolados de *C. albicans* CR15 (A), *C. krusei* CR20 (B), *C. tropicalis* CR2 (C) e *C. glabrata* CR6.3 (D) foram crescidos em caldo Sabouraud dextrose por 24 horas a 28°C, lavados em PBS, cultivados em meio RPMI por 2 horas e realizada fotomicrografia eletrônica de varredura (5000x).

**Figura 1** – Eletromicrografia das quatro espécies de *Candida*.

### 4.3 EFEITO DE ADMINISTRAÇÃO DE CON-A NA FAGOCITOSE *IN VITRO* DE *CANDIDA*

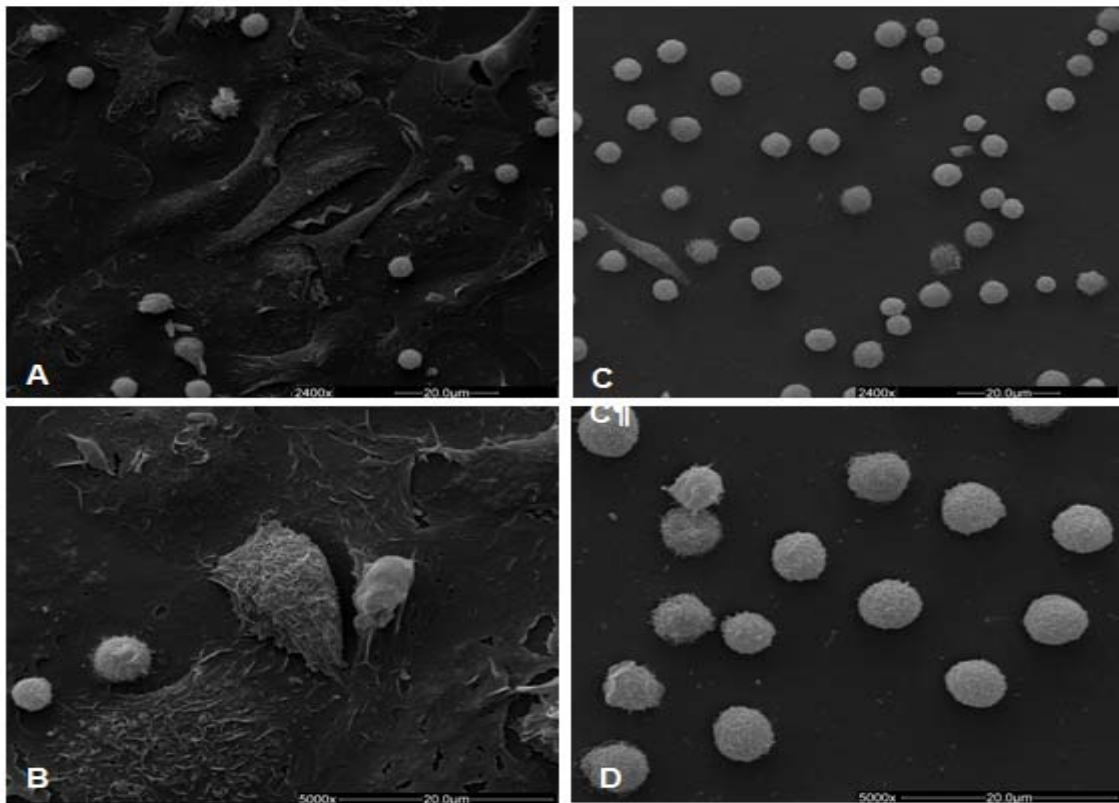
Para avaliar o efeito de concanavalina-A na fagocitose de *Candida*, macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados por três dias com Con-A ou PBS (controle) foram incubados com blastoconídeos dos quatro isolados por 2 horas em meio RPMI contendo 5% de SFB inativado.

A porcentagem de macrófagos tratados com PBS fagocitando foi de 11,85% para *C. albicans*, 12,19% para *C. krusei*, 16,14% para *C. tropicalis* e 27,82% para *C. glabrata*. A porcentagem de fagocitose foi significativamente maior nos macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A, comparados ao controle (PBS) para todos os isolados de *Candida* utilizados neste estudo. A porcentagem de fagocitose dos macrófagos tratados com PBS apresentou diferença significativa para a espécie *C. glabrata*, onde houve maior índice fagocítico (Figura 2).

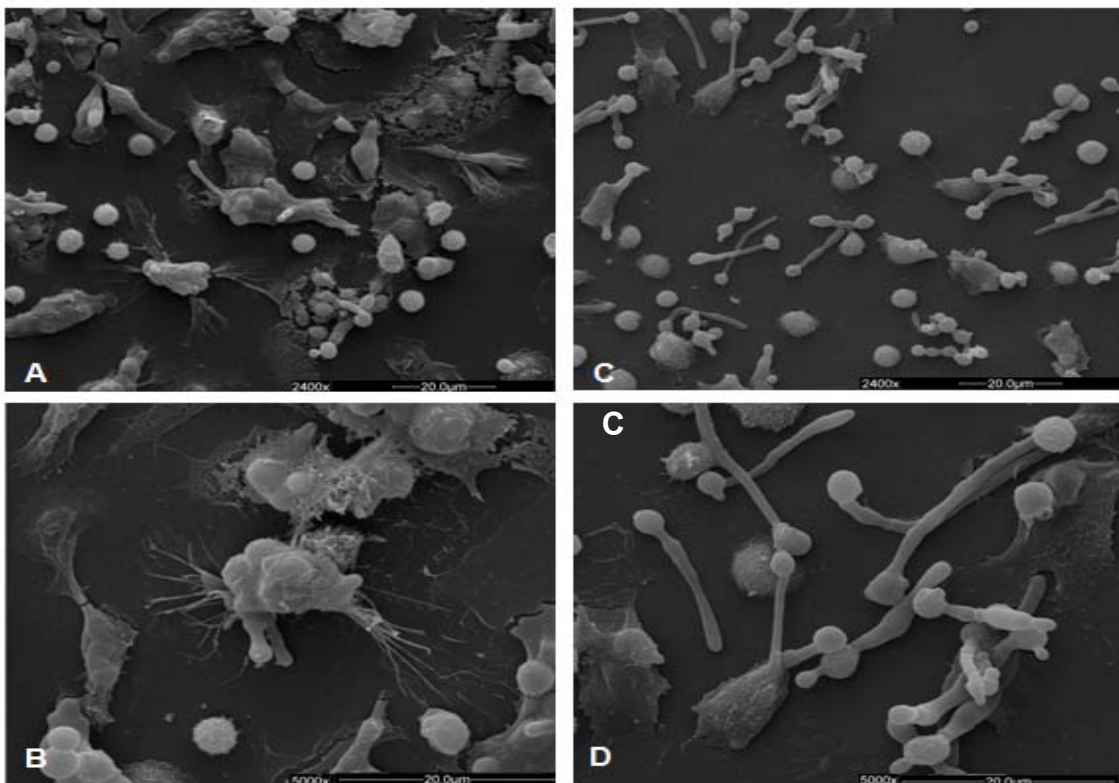


Macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS ou Con-A foram co-incubados com CR15, CR6.3, CR20 e CR2 por 2 horas a 37°C e a porcentagem de macrófagos fagocitando foi determinada pela contagem de 10 campos em imersão no microscópio óptico. Dados constituem média e erro padrão de 5 experimentos. \*P<0,05 macrófagos ativados com Con-A comparados com macrófagos residentes. \*\* P<0,05 fagocitose de *C. glabrata* por macrófagos residentes comparado as demais espécies.

**Figura 2** – Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de espécies de *Candida*.

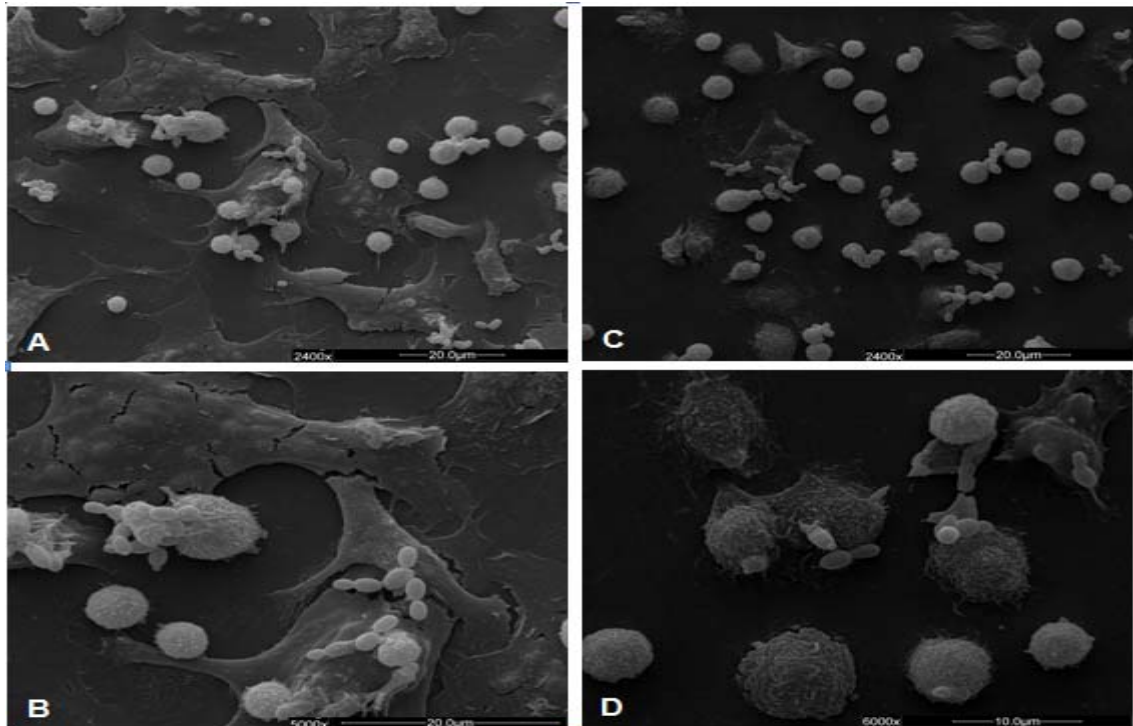


**Figura 3** – Macrófagos pré-tratados com concanavalina-A e PBS por 72 horas.



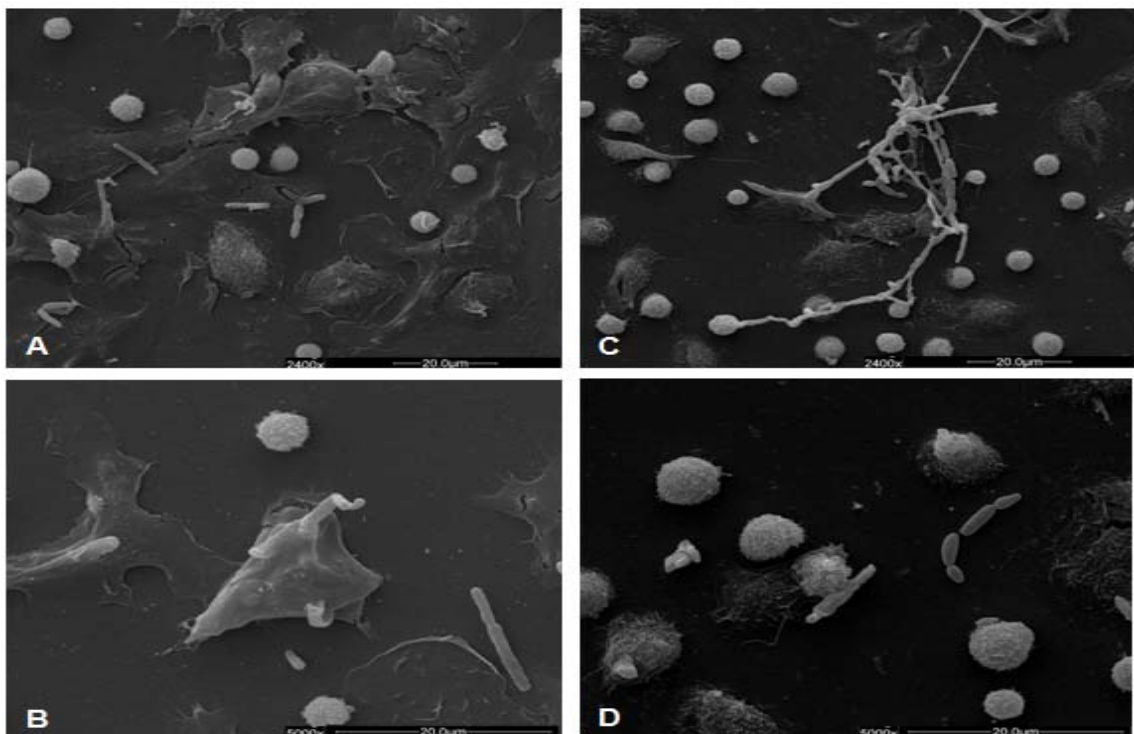
Macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A (A)(B) e PBS (C)(D), coincubados com *C. albicans* CR15 por 2 horas a 37°C. Eletromicrografia (2400x) e (5000x).

**Figura 4** – Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de *C. albicans*.



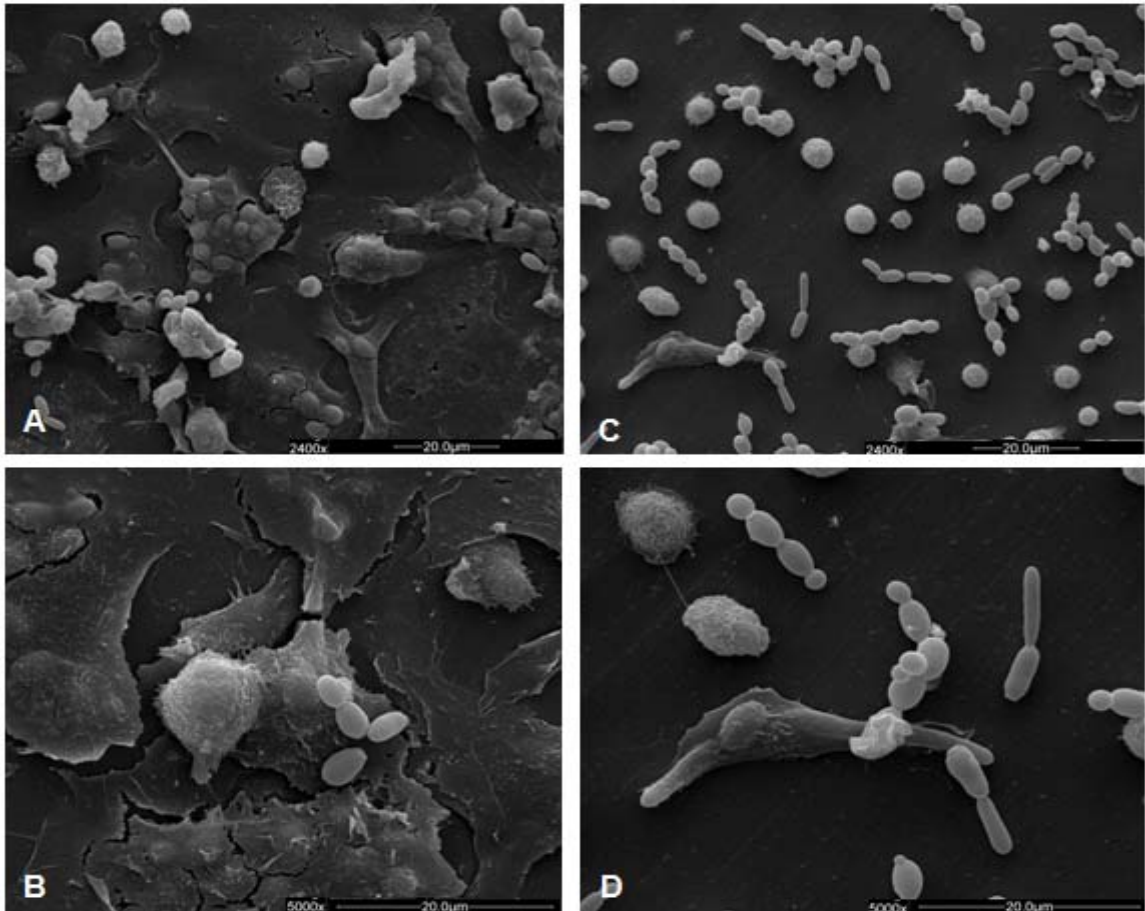
Macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A (A)(B) e PBS (C)(D), coincubados com *C. glabrata* CR6.3 por 2 horas a 37°C. Eletromicrografia (2400x) e (5000x).

**Figura 5** – Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de *C. glabrata*.



Macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A (A)(B) e PBS (C)(D), coincubados com *C. krusei* CR20 por 2 horas a 37°C. Eletromicrografia (2400x) e (5000x).

**Figura 6** – Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de *C. krusei*.



Macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A (A)(B) e PBS (C)(D), coincubados com *C. tropicalis* CR2 por 2 horas a 37°C. Eletromicrografia (2400x) e (5000x).

**Figura 7 –** Efeito do pré-tratamento com concanavalina-A na fagocitose de *C. tropicalis*.

Em adição, foi realizado o estudo do perfil de receptores de manose e dectina-1 utilizando ensaios fagocíticos com  $2 \times 10^6$  de *Candida* na presença de manana (100  $\mu\text{g}$ ) e laminarina (100  $\mu\text{g}$ ). Os resultados mostram que macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A três dias antes apresentaram atividade superior dos receptores de manose em *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, que pode ser observado pela significativa redução da fagocitose dos isolados testados na presença de manana. Macrófagos pré-tratados com Con-A apresentaram atividade superior dos receptores dectina-1 em *C. albicans* e *C. tropicalis*, observado pela significativa redução de fagocitose na presença de laminarina. Já a *C. glabrata* não apresentou redução significativa da fagocitose na presença destes inibidores (Tabela 3).

**Tabela 3** – Efeito inibitório de manana e laminarina na fagocitose *Candida*.

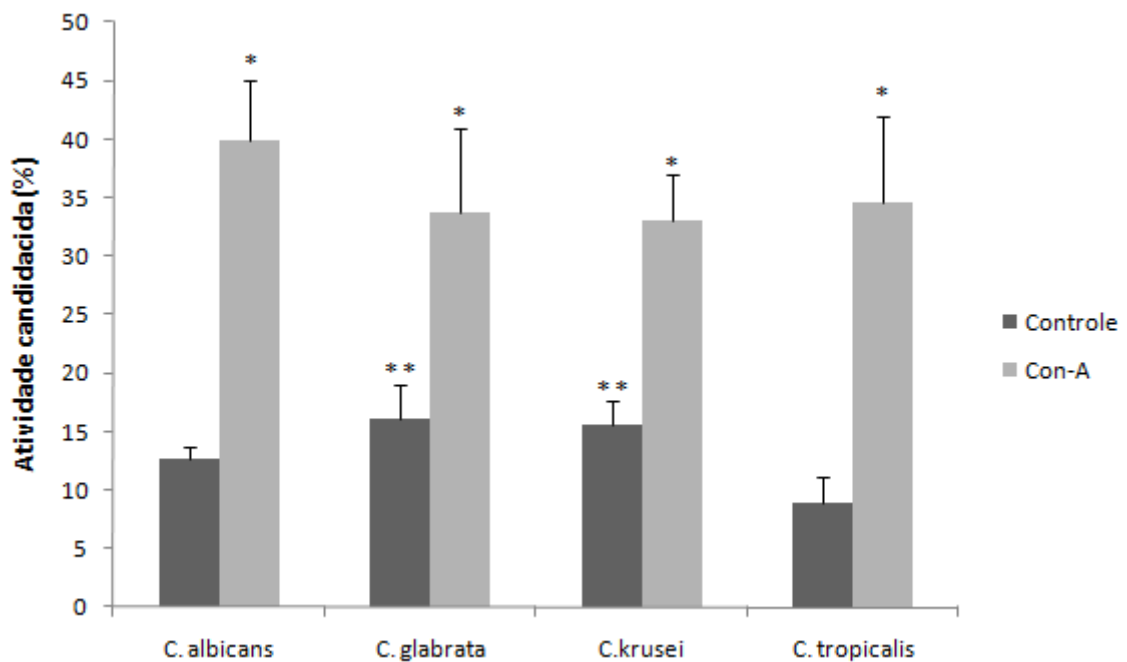
Condições	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
PBS controle	10,4 ± 1,2	19,9 ± 3,0	11,5 ± 2,8	10,7 ± 0,7
PBS manana	N.D	N.D	N.D	N.D
PBS laminarina	N.D	N.D	N.D	N.D
Con-A controle	37,0 ± 4,5*	35,3 ± 2,9*	21,4 ± 4,0*	19,5 ± 2,1*
Con-A manana	18,1 ± 3,6†	33,3 ± 1,1	7,9 ± 2,2†	11,4 ± 1,7†
Con-A laminarina	22,2 ± 3,6†	30,0 ± 2,9	11,3 ± 2,0†	16,4 ± 1,8

Camundongos foram pré-tratados com Con-A 3 dias antes dos ensaios e os macrófagos incubados com as espécies de *Candida* por 0,5h a 37°C. A inibição dos receptores de manose e dectina-1 foi investigada pela adição de manana e laminarina nos ensaios fagocíticos. Os resultados são média ± erro padrão para cinco experimentos. \*P<0,05 para Con-A vs PBS. † P<0,05 Con-A controle vs Con-A na presença dos inibidores. N.D Não determinado.

#### 4.4 EFEITO DE ADMINISTRAÇÃO DE CON-A NA ATIVIDADE CANDIDACIDA DE MACRÓFAGOS

Camundongos foram previamente inoculados com Con-A ou PBS e os macrófagos incubados com blastoconídeos dos quatro isolados por meia hora em meio RPMI. Para a análise das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), foram plaqueadas alíquotas no volume de 25 e 50µl e incubadas a 37°C durante 48 horas.

Nos ensaios candidacidas, macrófagos tratados apenas com PBS foram capazes de destruir entre 8,9% a 16,6% do inóculo. Enquanto que macrófagos pré-tratados com Con-A foram mais eficientes na morte de *Candida*, destruindo de 33,0% até 37,7% do inóculo. Portanto, a atividade candidacida foi significativamente maior nos macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A, comparados ao controle. Em camundongos que receberam PBS houve maior atividade candidacida de *C. glabrata* e *C. krusei* quando comparado a *C. tropicalis* (Figura 8).



Porcentagem de *Candida* ssp. morta por macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A e PBS. As células do exsudado peritoneal foram co-incubadas com *Candida* por 0,5h, plaqueadas em ágar Sabouraud e incubadas por 48h a 37°C para contagem de UFC. Dados constituem média e erro padrão de cinco experimentos. \*P<0,05 para Con-A vs PBS. \*\* P<0,05 para *C. glabrata* e *C. krusei* vs *C. tropicalis* PBS.

**Figura 8** – Efeito de concanavalina-A na atividade candidacida de macrófagos.

#### 4.5 TRANSIÇÃO DA FORMA DE LEVEDURA PARA FILAMENTOSA DURANTE COINCUBAÇÃO COM MACRÓFAGOS

Foi investigado a transição da forma de levedura para filamentosa durante coincubação com macrófagos pré-tratados com Con-A ou PBS. Após duas horas de coincubação dos macrófagos com os isolados de *Candida* CR15, CR2, CR20 e CR6.3, dez campos em imersão foram analisados.

Verificou-se que *C. albicans* (CR15) e *C. tropicalis* (CR2) apresentaram maior capacidade de transição para forma filamentosa comparando ao grupo controle (PBS) com o grupo Con-A. *C. glabrata* (CR6.3) demonstrou comportamento não dimórfico e a transição de *C. krusei* (CR20) não apresentou resultados significativos (Tabela 4).



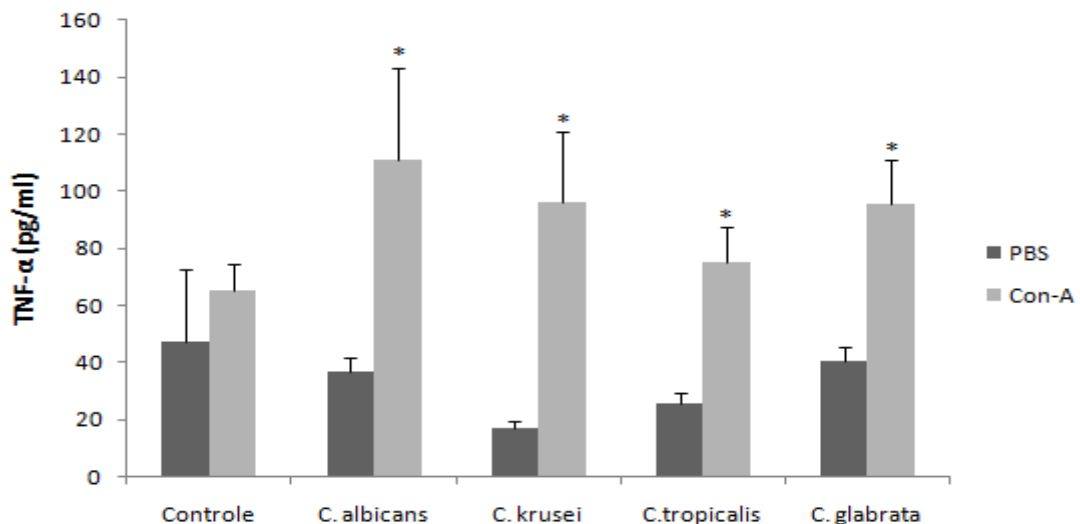
**Tabela 4** – Transição para formas filamentosas durante coincubação de *Candida* ssp. com macrófagos.

Isolados	Con-A	PBS
	Filamentos	Filamentos
<i>C. albicans</i>	30,24 ± 0,92*	81,02 ± 3,36
<i>C. tropicalis</i>	27,27 ± 1,74	86,18 ± 0,95
<i>C. krusei</i>	26,28 ± 3,69*	23,74 ± 1,91
<i>C. glabrata</i>	**	**

Espécies de *Candida* foram coincubadas com macrófagos a 37°C por 2 horas. As análises foram realizadas através da contagem de dez campos em imersão e a porcentagem de formas filamentosas foi determinada. Os resultados constituem média e erro padrão para cinco experimentos. \*P<0,05 em relação aos macrófagos pré-tratados com Con-A. \*\*Isolado não dimórfico.

#### 4.6 EFEITO DE CON-A NA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS

A produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante dos ensaios fagocíticos dos macrófagos ativados com Con-A e coincubados com *Candida* foi significativamente aumentada após 2 h de coincubação com todas as espécies testadas com significância de P<0,05 comparado ao controle (Figura 9).



As células do exsudado peritoneal foram coincubadas com *Candida* por 2h e os sobrenadantes dos ensaios fagocíticos *in vitro* foram coletados para determinação da produção de TNF- $\alpha$  através da técnica de ELISA. Dados constituem média e erro padrão de cinco experimentos. \*P<0,05 para Con-A vs PBS.

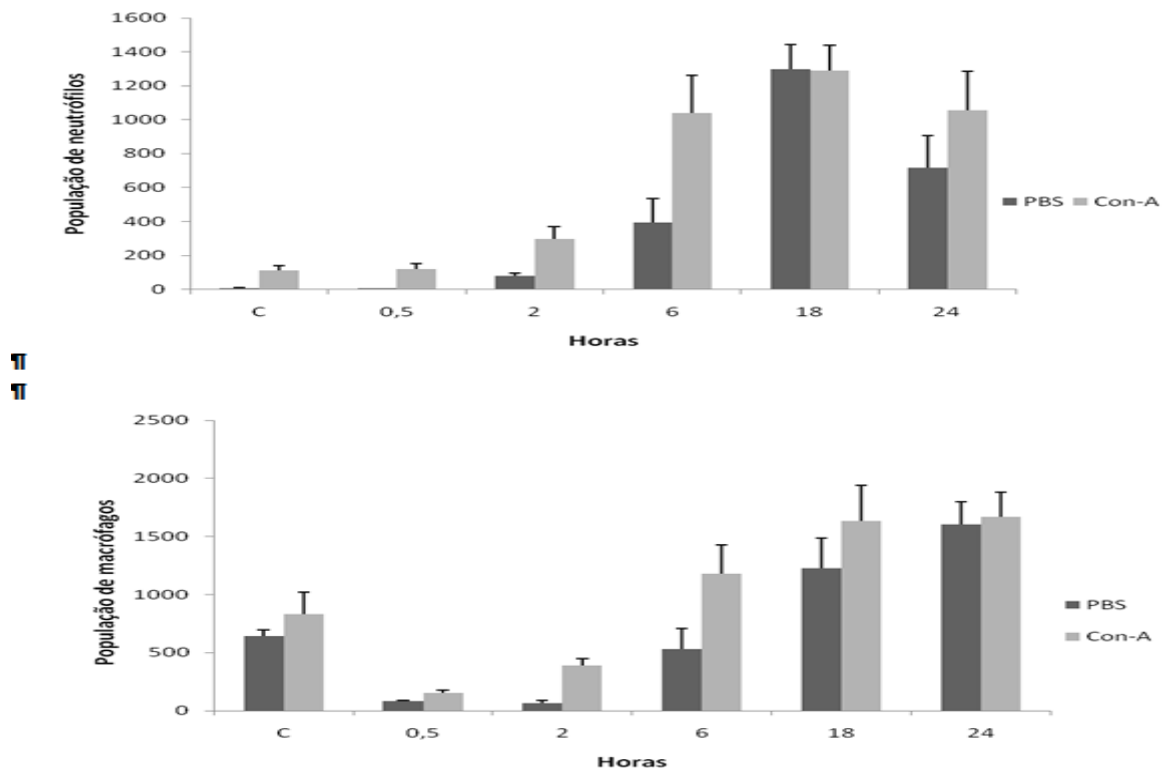
**Figura 9** – Efeito de Con-A na produção *in vitro* de TNF- $\alpha$ .

#### 4.7 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DE CON-A NA INFECÇÃO POR *CANDIDA ALBICANS*

Para avaliar o efeito de concanavalina-A na infecção por *C. albicans* cinco grupos de camundongos pré-tratados por três dias com Con-A ou PBS foram inoculados i.p. com  $1 \times 10^7$  de *C. albicans* e sacrificados após 0,5; 2; 6; 18 e 24 h. Um grupo de cinco camundongos sem infecção foi usado como controle.

O número de neutrófilos foi baixo nas primeiras 2 horas após infecção por *C. albicans*, e sua migração aumentou posteriormente atingindo um pico às 18 horas. Houve aumento significativo no número de neutrófilos 6 horas após infecção do grupo pré-tratado com Con-A comparado ao grupo PBS.

O número de macrófagos presentes no exsudado peritoneal durante as 24 horas de infecção foi semelhante entre os grupos pré-tratados com Con-A e PBS, embora durante as primeiras duas horas após infecção houve significativa redução de macrófagos no grupo PBS. Um aumento no número de macrófagos pode ser observado entre 6 e 24 horas após infecção em ambos os grupos (Figura 10).



Os camundongos foram pré-tratados com PBS ou Con-A três dias antes de inoculação i.p. com  $10^7$  *C. albicans*. Os resultados constituem média e erro padrão para cinco experimentos

**Figura 10** – População de células fagocíticas no exsudado peritoneal durante o curso de infecção por *C. albicans*.

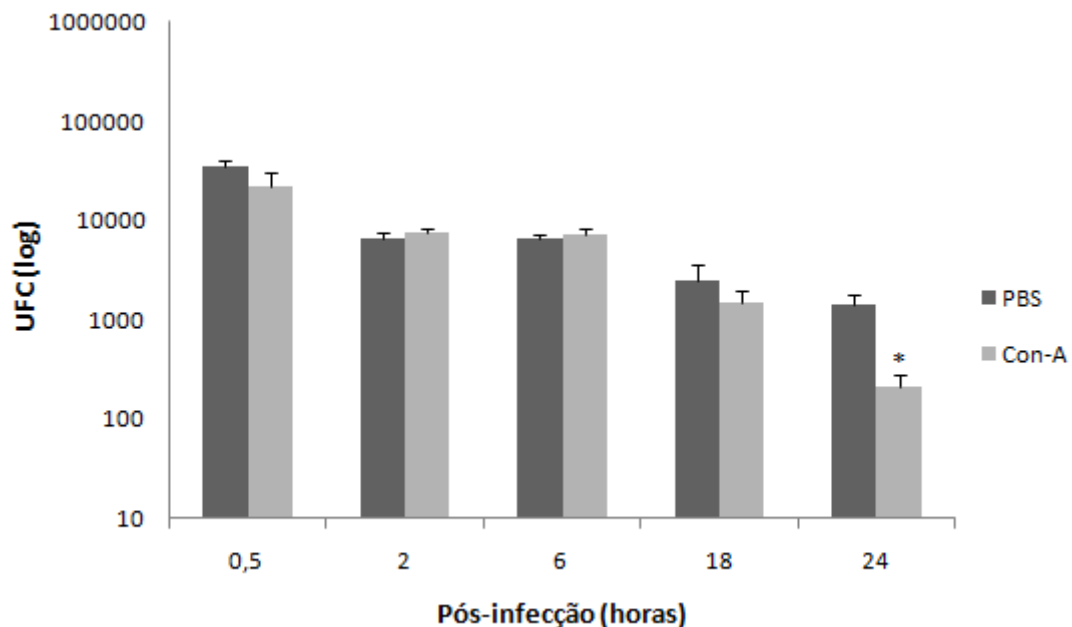
A fagocitose de *C. albicans in vivo* por macrófagos e neutrófilos ativados com Con-A foi superior a de macrófagos controle durante a infecção (Tabela 5).

**Tabela 5** – Porcentagem de macrófagos e neutrófilos fagocitando *Candida albicans* durante infecção.

Condições	Tempo após infecção (horas)									
	Macrófagos					Neutrófilos				
	0,5	2	6	18	24	0,5	2	6	18	24
<b>PBS</b>	12,7±5,1	0,4±0,3	0,2±0,1	0±0	0±0	0,5±0,4	0±0	0,2±0,1	0±0	0±0
<b>Con-A</b>	38,4±8,7	4,2±0,4	2,5±0,3	0,4±0,2	0,7±0,25	10,4±7,9	1,7±0,2	0,4±0,2	0,2±0,1	0,2±0,1

Fagocitose de *C. albicans* por macrófagos e neutrófilos do exsudado peritoneal de camundongos pré-tratados com PBS ou Con-A. Dados representam média ± erro padrão para cinco experimentos.

A redução do inóculo de *C. albicans* foi significativamente maior no grupo pré-tratado com Con-A, como observado pela redução de UFC no exsudado da cavidade peritoneal 24 horas após infecção (Figura 11).



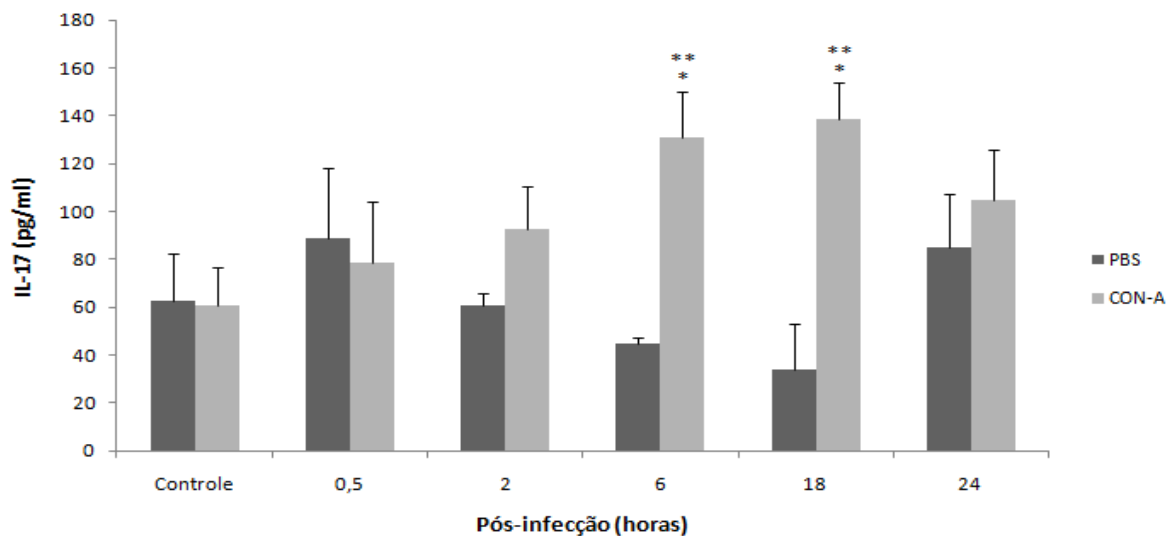
Os camundongos foram pré-tratados com PBS ou Con-A três dias antes de inoculação i.p. com  $10^7$  *C. albicans*. Os resultados são UFC e erro padrão para cinco experimentos. \* $P < 0,05$  para Con-A vs PBS 24h.

**Figura 11** – Efeito de concanavalina-A na recuperação de *Candida albicans* da cavidade peritoneal durante o curso da infecção.

#### 4.8 EFEITO DE CON-A NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS COM *CANDIDA ALBICANS*

A produção de IL-17 no sobrenadante do exsudado peritoneal de camundongos que receberam inóculo de  $10^7$  de *C. albicans* CR15 foi significativamente superior em animais pré-tratados com Con-A após 6 e 18 horas de infecção, quando comparado aos tratados apenas com PBS.

A quantidade de IL-17 sofreu uma queda significativa de 2 h para 6 h após a infecção no grupo PBS. Já no grupo pré-tratado com Con-A, houve aumento significativo de IL-17 em 6 e 18 horas após infecção quando comparado aos camundongos não infectados (Figura 12).

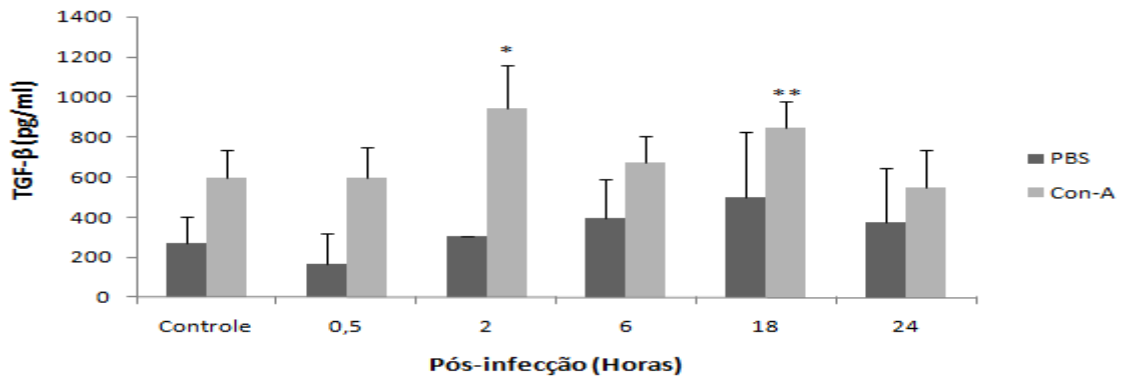


Os sobrenadantes dos exudatos peritoneais pós infecção com *C. albicans* CR15 foram coletados para determinação da produção de IL-17 através da técnica de ELISA. Significância estatística \* $P < 0.05$  para Con-A vs. PBS 6h e 18h \*\*  $P < 0.05$  para Controle Con-A vs Con-A 6h e 18h.

**Figura 12** – Efeito de Con-A na produção *in vivo* de IL-17.

A produção de TGF- $\beta$  no sobrenadante do exsudado peritoneal de camundongos que receberam inóculo de  $10^7$  de *C. albicans* CR15 foi significativamente superior em animais pré-tratados com Con-A após 2 horas de infecção, quando comparado aos tratados apenas com PBS.

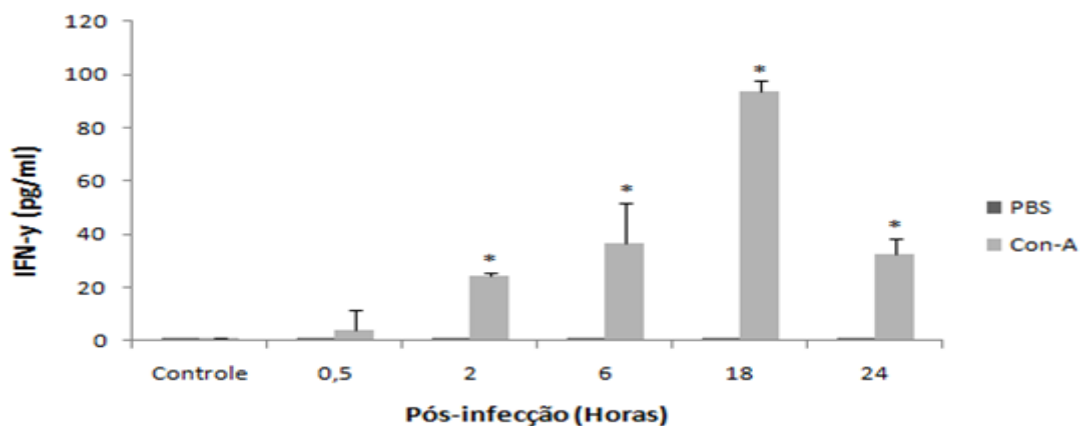
No grupo pré-tratado com Con-A, houve aumento significativo de TGF- $\beta$  18 horas após infecção quando comparado aos camundongos não infectados (Figura 13).



Os sobrenadantes dos exudatos peritoneais pós infecção com *C. albicans* CR15 foram coletados para determinação da produção de TGF- $\beta$  através da técnica de ELISA. Significância estatística \* $P < 0.05$  para Con-A vs. PBS 2h. \*\*  $P < 0.05$  para controle Con-A vs Con-A 18h.

**Figura 13** – Efeito de Con-A na produção *in vivo* de TGF- $\beta$ .

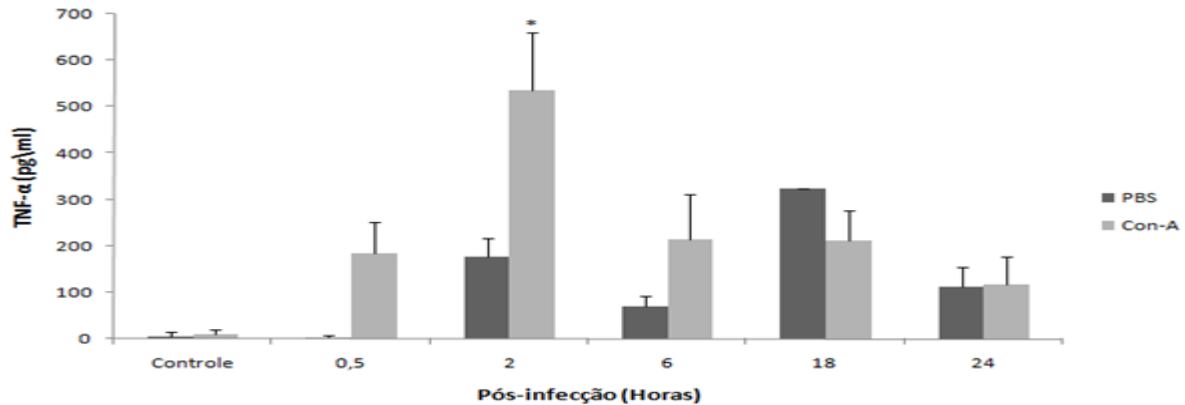
Não foi encontrada produção de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do exsudado peritoneal de camundongos que receberam inóculo de  $10^7$  de *C. albicans* em animais tratados com PBS, dessa forma, a produção de IFN- $\gamma$  foi significativamente superior em animais pré-tratados com Con-A após 2, 6, 18 e 24 horas de infecção (Figura 14).



Os sobrenadantes dos exudatos peritoneais pós infecção com *C. albicans* CR15 foram coletados para determinação da produção de IFN- $\gamma$  através da técnica de ELISA. Significância estatística \* $P < 0.05$  para Con-A vs. PBS 2h, 6h, 18h e 24h.

**Figura 14** – Efeito de Con-A na produção *in vivo* de IFN- $\gamma$ .

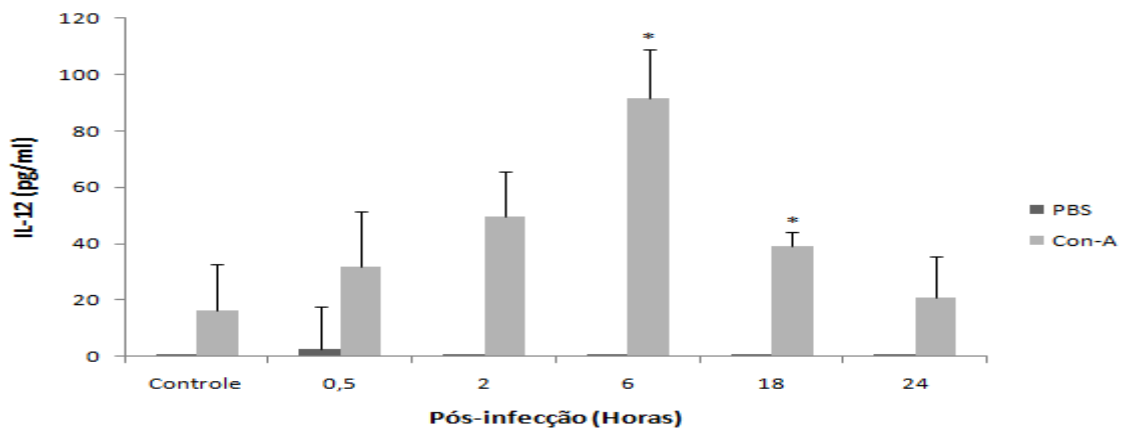
A produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante do exsudado peritoneal de camundongos que receberam inóculo de  $10^7$  de *C. albicans* CR15 foi superior em animais pré-tratados com Con-A após 2 horas de infecção, quando comparado aos tratados apenas com PBS (Figura 15).



Os sobrenadantes dos exudatos peritoneais pós infecção com *C. albicans* CR15 foram coletados para determinação da produção de TNF- $\alpha$  através da técnica de ELISA. Significância estatística \* $P < 0.05$  para Con-A vs. PBS 2h.

**Figura 15** – Efeito de Con-A na produção *in vivo* de TNF- $\alpha$ .

A produção de IL-12 no sobrenadante do exsudado peritoneal de camundongos que receberam inóculo de  $10^7$  de *C. albicans* CR15 foi significativamente superior em animais pré-tratados com Con-A 6 e 18 horas após infecção, quando comparado aos tratados apenas com PBS (Figura 16).



Os sobrenadantes dos exudatos peritoneais pós infecção com *C. albicans* CR15 foram coletados para determinação da produção de IL-12 através da técnica de ELISA. Significância estatística \* $P < 0.05$  para Con-A vs. PBS 6h e 18h .

**Figura 16** – Efeito de Con-A na produção *in vivo* de IL-12.

## 5 DISCUSSÃO

Espécies de *Candida* são patógenos complexos e o sistema imune utiliza várias células, receptores de superfície celular e vias de sinalização para desencadear uma resposta imune eficiente. A interação entre o hospedeiro e *Candida* pode resultar tanto na eliminação rápida dos patógenos ou sua persistência em pacientes imunocomprometidos, o que conduz a candidíase mucocutânea crônica ou candidíase invasiva (NETEA; MARÓDI, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de concanavalina-A no perfil de citocinas no curso de infecção com *C. albicans* e atividade fagocítica in vitro de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Estudos prévios demonstraram que o tratamento com Con-A aumentou a capacidade de eliminar o inóculo de *C. albicans* da cavidade peritoneal, baço, fígado e rim, em relação aos animais controle (FELIPE *et al.*, 1995) e que o efeito protetor do Con-A é dose-dependente e pode estimular macrófagos empregando os mesmo mecanismos, tanto em camundongos adultos quanto lactantes, aumentando assim sua capacidade para fagocitar e destruir *C. albicans* (MORESCO *et al.*, 2002). Corroborando com estes dados, os resultados demonstraram que a porcentagem de fagocitose para todas as espécies de *Candida* testadas foram superiores nos macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A, quando comparados aos macrófagos de animais pré-tratados com PBS (Figura 2). Portanto, concanavalina-A aumentou a capacidade de macrófagos fagocitarem *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (Figura 4, 5, 6 e 7).

Entre os animais pré-tratados com PBS, os macrófagos apresentaram maior índice de fagocitose da espécie *C. glabrata* (Figura 2). Enquanto *C. albicans* é capaz de destruir macrófagos através da formação de hifas, a *C. glabrata* fagocitada por macrófagos não realiza transição morfológica (LEBERER *et al.*, 2001).

A capacidade de algumas espécies de *Candida* sofrerem morfogênese contribui para o aumento do seu potencial patogênico (HAYNES, 2001) e diante disso foi investigado a transição de levedura para forma filamentosa durante coincubação com macrófagos pré-tratados com Con-A ou PBS. Duas das espécies testadas, *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram maior capacidade de transição

para forma filamentosa quando coincubadas com macrófagos pré-tratados com PBS e esta transição foi reduzida na presença de macrófagos pré-tratados com Con-A. Já *C. glabrata* demonstrou comportamento não dimórfico e a transição de *C. krusei* não apresentou resultados significativos (Tabela 4). Estes resultados demonstram que as leveduras não destruídas pelos macrófagos pré-tratados com PBS, das espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* foram capazes de se transformar em formas filamentosas, apresentando maior capacidade patogênica do que as espécies *C. glabrata* e *C. krusei*. De acordo com Geraldino et al. (2010) as formas filamentosas de *C. albicans* oferecem resistência aos mecanismos microbicidas de macrófagos. Neste estudo, nós verificamos que além da *C. albicans*, a *C. tropicalis* também apresenta este mecanismo patogênico (Tabela 4)(Figura 8).

Con-A liga-se diretamente às moléculas de carboidratos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e no receptor do linfócito T (TCR) e induz a resposta celular (ANDERSON; MELCHERS, 1976). Neste trabalho, macrófagos de camundongos pré-tratados por Con-A apresentam-se maiores e mais espalhados que os macrófagos controle como visualizado através de microscopia de varredura (Figura 3). Segundo Mosser (2003) macrófagos ativados são capazes de espalharem-se mais do que as células residentes e possuem um aumento marcante na sua capacidade de matar e degradar microorganismos. Isto se deve a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e indução do gene NO sintase (iNOS) induzível para produção de óxido nítrico (NO).

As Figuras 4, 5, 6 e 7 permitem a visualização do efeito do pré-tratamento com Con-A na fagocitose de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* pelo emprego de fotomicroscopia eletrônica de varredura. É possível comparar a ativação dos macrófagos, capacidade de fagocitose e transição de leveduras para formas filamentosas dos grupos de camundongos tratados com Con-A e PBS. Um número maior de leveduras unicelulares (blastóporos) pode ser vistas no interior de macrófagos ativados enquanto macrófagos do grupo controle fagocitam um número menor de *Candida* e muitos mostram crescimento filamentoso. De acordo com Shoham e Levitz (2005) as leveduras são muitas vezes fagocitadas de forma eficaz, enquanto que um aumento no tamanho das hifas diminui essa eficácia. Estas observações sugerem que a ativação de macrófagos por Con-A favorece a fagocitose de leveduras e também reprime a transição de leveduras para filamentos, cujo crescimento pode levar a morte do macrófago.



Van der Graaf *et al.* (2005) demonstraram que blastoconídeos e hifas de *C. albicans* diferem no estímulo da resposta do hospedeiro. Blastoconídeos estimulam ambos receptores TLR2 e TLR4, sendo o último crucial para a estimulação de citocinas pró-inflamatórias, com grande produção de IFN- $\gamma$  por monócitos e de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais. As hifas, por sua vez, não são reconhecidas por TLR4, não sendo capazes de induzir a produção de IFN- $\gamma$  e induzem grande produção de IL-10 por meio de TLR2, tal citocina provoca a desativação dos mecanismos microbicidas de macrófagos e esta condição beneficia o patógeno. Em nosso estudo, os ensaios fagocíticos realizados com macrófagos ativado com Con-A apresentaram aumento significativo nos níveis de TNF- $\alpha$  para todas as espécies testadas, estando relacionado à maior capacidade de matar *Candida* e conseqüente redução do dimorfismo. Em contraste, os macrófagos controle mantiveram níveis basais de TNF- $\alpha$ , proporcionando um melhor ambiente para a transição da forma leveduriforme para forma filamentosa.

Joly *et al.* (2009) demonstraram que *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, foram capazes de induzir a secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos, uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel importante na imunidade antifúngica, e *C. glabrata* não induziu a produção de IL-1 $\beta$  devido à ausência de dimorfismo. Entretanto, *C. glabrata* apresenta outros mecanismos de escape para colonizar e causar infecção em pacientes imunocomprometidos. Roetzer *et al.* (2010) investigaram a fagocitose de *C. glabrata* por macrófagos e demonstraram que a autofagia e peroxifagia é um provável fator de virulência para *C. glabrata*, já que ao ser fagocitada a privação de nutrientes representa um sério desafio, e a mobilização de nutrientes intracelulares através da autofagia é um dos principais contribuintes para sustentar a viabilidade do fungo. Já em infecções por *C. albicans* a autofagia não desempenha papel relevante na diferenciação de *C. albicans* ou em sua interação com as células do hospedeiro (PALMER *et al.*, 2007). A autofagia recicla continuamente quase todos os constituintes da célula, e ajudam o organismo a superar períodos de falta de nutrientes, reciclando componentes intracelulares para sustentar funções celulares vitais (FARRE *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, a ativação de macrófagos é importante na atividade candidacida. Geraldino *et al.* (2010) demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados com Con-A produziram níveis maiores de TNF- $\alpha$  e reduziram significativamente o inóculo de *C. albicans* após 1

hora de coincubação, em comparação aos macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados com PBS. No presente estudo também foi avaliada a atividade candidacida de ambas as populações de macrófagos, e os resultados demonstraram um aumento da atividade candidacida nos macrófagos dos animais pré-tratados com Con-A e coincubados por 30 minutos, destruindo de 33,0% até 37,7% do inóculo. Enquanto os macrófagos de camundongos que receberam pré-tratamento com PBS foram capazes de destruir apenas 8,9% a 16,6% do inóculo, sendo observada maior atividade candidacida para *C. glabrata* e *C. krusei* quando comparado a *C. tropicalis* (Figura 8). Estudos experimentais anteriores demonstraram que *C. krusei* possui menor capacidade de aderência a superfícies epiteliais e produção de fosfolipases, quando comparadas a *C. albicans* em (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994). Salin *et al.* (1985) utilizando ensaio fagocítico *in vitro* com macrófagos peritoneais de camundongos, demonstraram que os índices de fagocitose obtidos para *C. krusei* foram significativamente maiores aos de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Em estudo realizado por Westwater *et al.* (2007), camundongos deficientes em células natural killer (NK) e células T foram inoculados por via oral com *C. glabrata* e *C. albicans*. Sendo que *C. glabrata* colonizou o trato digestório e penetrou no tecido queratinizado, mas em contraste com *C. albicans*, foi incapaz de infectar tecidos oroesofageais. Além disso, *C. glabrata* não foi letal para os camundongos, e não provocou uma resposta inflamatória no tecido gástrico colonizado nem estimulou a produção de granulócitos pelo baço. Tal atividade inflamatória deficiente poderia explicar a capacidade de *C. glabrata* a persistir em tecidos infectados e sobreviver como um comensal do aparelho digestório. Dados obtidos por Wells *et al.* (2007) apóiam a hipótese de que o intestino de camundongos tratados com antibióticos pode ser um reservatório epidemiológico para *C. glabrata* e que esta espécie tende a se disseminar em condições clínicas específicas.

O reconhecimento do patógeno na imunidade inata é mediado por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), presentes em microrganismos patogênicos (NETEA *et al.*, 2008). Os receptores de manose presentes na superfície de macrófagos reconhecem superfície rica em manana, sendo especialmente importante na fagocitose de *C. albicans*. Nós investigamos se este receptor também pode estar envolvido na fagocitose de espécies não *albicans*. Os resultados

mostraram que macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A apresentaram significativa redução da fagocitose dos isolados *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, quando testados na presença de manana durante os ensaios fagocíticos em relação aos macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS, o que sugere uma atividade superior dos receptores de manose nestes macrófagos (Tabela 3). Resultados semelhantes foram anteriormente encontrados por Gaziri *et al.* (1999) e Loyola *et al.* (2002) que verificaram que o pré-tratamento de macrófagos com Con-A aumentou a expressão de receptores de manose e conseqüente fagocitose de *C. albicans*. Portanto, os experimentos sugerem que este receptor também pode estar envolvido na fagocitose de espécies não *albicans* investigadas neste estudo.

Além disso, macrófagos pré-tratados com Con-A apresentaram significativa redução de fagocitose de *C. albicans* e *C. tropicalis* na presença de laminarina, sugerindo atividade superior dos receptores dectina-1. Já *C. glabrata* não apresentou redução significativa da fagocitose na presença destes inibidores (Tabela 3). A forma leveduriforme de *C. albicans* é reconhecida pelo receptor Dectina-1, os quais estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias que favorecem a eliminação da *Candida* (GANTNER, SIMMONS ; UNDERHILL 2005; NETEA *et al.*, 2002).

Após reconhecimento do fungo por meio de receptores de superfície, a interação da *Candida* com o sistema imune inato pode levar a uma atividade antifúngica, e uma atividade regulatória que promove a quimiotaxia, proliferação e diferenciação terminal de células da imunidade inata e adaptativa, através da síntese de citocinas (DONGARI-BAGTZOGLOU ; FIDEL, 2005). Como já mencionado, a concanavalina-A se liga as moléculas de carboidratos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e receptores de células T auxiliar (TCR), resultando na ativação de células Th1 e produção de citocinas como IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e conseqüente ativação de macrófagos.

Huang *et al.* (2004) relataram que a produção de IL-17 por células Th17 possui importância na defesa do hospedeiro contra fungos, onde a expressão *in vivo* de IL-17 por camundongos os protegeu de uma dose letal de *C. albicans*. Portanto também procuramos investigar neste trabalho se o tratamento com concanavalina-A pode mediar uma resposta imune adaptativa envolvendo células Th17.

Deste modo, camundongos tratados com Con-A três dias antes da infecção i.p com *C. albicans* mostraram um aumento significativo nos níveis de IL-17 após 6h de infecção no grupo de camundongos tratados com Con-A, sendo estes níveis mantidos até 18h pós-infecção, enquanto nos camundongos controle foi verificada uma redução dessa citocina (Figura 11).

O fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é amplamente reconhecido por possuir papel chave na regulação de respostas inflamatórias que ocorrem em vários tipos de doenças infecciosas e autoimunes. (SEDER *et al.*, 1998). TGF-  $\beta$  é uma citocina relativamente ubíqua, já que suprime a diferenciação de células Th1 e Th2 enquanto induz a diferenciação de células Treg. Entretanto, na presença da citocina inflamatória IL-6, é capaz de direcionar o desenvolvimento de células Th17 (REINER, 2007). A combinação de IL-6 e TGF- $\beta$  inibe Foxp3, um fator de transcrição de genes que é essencial para diferenciação de células Treg, assim células Th17 e Treg estão relacionadas, sendo que TGF- $\beta$  participa dos dois processos (TATO; JOHN, 2006). Neste trabalho, os resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de TGF- $\beta$  após 2h infecção por *C. albicans* em camundongos tratados com Con-A (Figura 13) sugerindo seu papel na diferenciação de células Th17. Pois da mesma forma que células Th1 e Th2 requerem citocinas específicas e fatores de transcrição para seu desenvolvimento, tem sido mostrado que IL-6 e TGF- $\beta$  tem papel crucial no início da diferenciação de células Th17 (VELDHOEN *et al.*, 2006).

Fungos patogênicos infectam humanos através de diferentes mecanismos, incluindo ataque e invasão da pele danificada e inoculação direta em tecidos profundos. Independentemente da via de infecção, os macrófagos desempenham um papel fundamental na interação inicial entre o hospedeiro e o patógeno. Outras células fagocíticas, como neutrófilos e células dendríticas (DCs), também estão intimamente envolvidas neste processo (NICOLA, CASADEVALL ; GOLDMAN, 2008).

Fagócitos podem matar fungos usando mecanismos independente de fagocitose. Isso é perceptível no caso de fungos filamentosos, em que uma única hifa é muito maior do que o fagócito-se e não pode ser ingerida. Os neutrófilos são os mais frequentemente associados com mecanismos de morte extracelular que envolve a liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e componentes do grânulo no meio extracelular (ERMERT *et al.*, 2009). Loyola *et al.*

(2002) demonstraram que a ativação da resposta imune celular por Con-A ocorre em duas fases: uma dominada pelos neutrófilos, e outra pelos macrófagos expressando atividade aumentada dos receptores de manose, ambas as populações são importantes dependendo da fase da infecção.

Diversos estudos relacionam a citocina pró-inflamatória IL-17 com a migração de neutrófilos em sítios de inflamação (KOLLS *et al.*, 2003; YE *et al.*, 2001; MCALLISTER *et al.*, 2005). Conti *et al.* (2009) demonstraram que a deleção genética da via de sinalização mediada por IL-17 tem sido associada a um aumento da carga fúngica, redução do recrutamento de neutrófilos e expressão diminuída de certos fatores antifúngicos em camundongos. Corroborando com o aumento dos níveis de IL-17 pelos macrófagos pré-tratados com Con-A, a migração de neutrófilos aumentou 6h após infecção, atingindo o pico 18h após infecção (Figura 9).

A família da citocina IL-12, que inclui IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35, está amplamente envolvida no desenvolvimento de células T helper. Tanto respostas Th1 e Th17 são consideradas protetoras, enquanto respostas do tipo Th2 e Treg possuem efeito supressivo na imunidade do hospedeiro contra candidíase. Enquanto a citocina IL-12 leva ao desenvolvimento de células Th1, a citocina IL-23 está envolvida no direcionamento e manutenção de células Th17 (WEI *et al.*, 2011). Neste estudo, a produção de IL-12 no sobrenadante do exsudado peritoneal de camundongos infectados por *C. albicans* foi significativamente superior em animais pré-tratados com Con-A 6 e 18 horas após infecção, quando comparado aos tratados apenas com PBS (Figura 16).

Resultados obtidos por Xiong *et al.* (2000) demonstraram que *C. albicans* e *C. krusei* induzem diferencialmente a produção de IL-12 por monócitos. Enquanto a *C. krusei* foi capaz de induzir a produção de IL-12 por monócitos, a *C. albicans* induziu apenas a produção de IL-10. Tais resultados indicam que *C. albicans* por possuir a capacidade de induzir a expressão de IL-10 pode gerar um estado mais susceptível do hospedeiro à candidíase. Neste trabalho, camundongos pré-tratados com Con-A e infectados com *C. albicans* apresentaram produção de IL-12 superior do que os tratados com PBS (Figura 16).

Estudo anterior realizado *in vivo* por Conchon-Costa *et al.* (2007) demonstrou que camundongos pré-tratados com Con-A quatro dias antes e infectados com *C. albicans* CR15 tiveram um significativo aumento na produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de células peritoneais, fígado e baço em relação aos

animais pré-tratados com PBS. Os macrófagos de animais pré-tratados com PBS tiveram menor capacidade de depurar *C. albicans* do local da infecção, que por sua vez disseminou-se para outros órgãos como fígado e baço.

Neste trabalho, os macrófagos de animais tratados com Con-A também fagocitaram maiores números de leveduras, e foram ativados através da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em níveis significantes 2 horas após infecção, sendo que a depuração de *Candida* foi significativamente maior 24 horas após a infecção (Tabela 5) (Figura 12 e 14). Deste modo, eles provavelmente são mais capazes de matar e processar antígenos de *Candida*, sinalizando uma resposta imune adaptativa. Já os macrófagos dos controles não evitaram a transição de leveduras em hifas e foram parcialmente destruídos, como mostrado em microscopia eletrônica de varredura (Figura 4).

Células fagocíticas aumentam sua capacidade candidacida especialmente quando ativadas por citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$ , produzido por linfócitos CD4+. Lin *et al.* (2009) demonstraram que a imunidade adaptativa contra infecção por *C. albicans* requer a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 por células T CD4+ .

Com base em estudos realizados, Ashman *et al.* (2011) sugerem que a apresentação de antígenos de *Candida* via moléculas MHC de classe 2 ativam e diferenciam células T CD4 tanto para o tipo Th1 quanto Th17, o tipo dominante é provavelmente determinado por meio das citocinas predominantes . Tendo isto em vista, os resultados deste trabalho sugerem que o tratamento com Con-A facilita o desencadeamento de respostas Th17 e Th1 via produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ , levando a resolução da infecção por *C. albicans*.

## CONCLUSÕES

- Os isolados utilizados neste estudo demonstraram diferentes comportamentos com relação à capacidade de transição para formas filamentosas. As espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram maior dimorfismo enquanto *C. krusei* apresentou baixo potencial de transição e a espécie *C. glabrata* não apresentou formas filamentosas.
- A porcentagem de fagocitose dos macrófagos tratados com PBS não apresentou diferença significativa entre os isolados testados exceto para a *Candida glabrata* onde os macrófagos apresentaram maior índice fagocítico.
- A ativação dos macrófagos com Con-A aumentou a produção de TNF- $\alpha$ , a atividade fagocítica e atividade candidacida frente aos isolados testados.
- Con-A protegeu macrófagos da injúria causada por *C. albicans*.
- O tratamento com Con-A propiciou o desencadeamento de respostas Th17 e Th1 via produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  que participaram na ativação de macrófagos e neutrófilos corroborando com a resolução da infecção.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin-A polysaccharide interaction. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.46, p. 1147-1150, 1968.
- ALMEIDA, R. S. C.; GAZIRI, D.A.; PONGELUPE, R. C. S.; GAZIRI, L. C. J.; FELIPE, I. Atividade de aspartil proteinases por isolados de *Candida* de pacientes HIV+. **Biosaúde**, v.6, p. 17-26, 2004.
- ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICHOVA, I.; NAGLIK, J. R.; SCHALLER, M.; GROOT, P.; MACCALLUM, D.; ODDS, F. C.; SCHAFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M.; HUBE, B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 688–694, 2006.
- ALVAREZ-LERMA, F.; NOLLA-SALAS, J.; LEON, C.; PALOMAR, M.; JORDÁ, R.; CARRASCO, N.; BOBILLO, F. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical to intensive care medical units. **Intensive Care Medicine**, v.29, p. 1069–76, 2003.
- ANAISSIE, E. J.; GRAZZIUTTI, M.; NUCCI, M. Invasive fungal infections in cancer patients. **Clinical Mycology**, v. 20, p. 431-440, 2009.
- ANDERSON, J.; MELCHERS, F. In: WHILEY ; SONS. Concanavalin-A as a tool. London, New York, Sydney, Toronto. p. 505-522, 1976.
- ASHMAN, R. B.; PAPADIMITRIOU, J. M. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans*. **Infection. Microbiological Reviews** v.59, p. 646–672, 1995.
- ASHMAN, R. B.; VIJAYAN, D.; WELLS, C. A. IL-12 and related cytokines: function and regulatory implications in *Candida albicans* infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v.11, p. 1-10, 2011.
- ASHMAN, R. B.; FARAH, C. S.; WANASAENGSAKUL, S.; HU, Y.; PANG, G.; CLANCY, R. L. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. **Immunology and Cell Biology** v.82, p. 196–204, 2004.
- BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; POERSCH, C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; QUESADA, R. M. B.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v.8, p. 442–450, 2008.
- BLASI, E.A.; MUCCI, R.; NEGLIA, F.; PEZZINI, B.; COLOMBARI, D.; RADZIOCH, A.; COSSARIZZA, E.; LUGLI, G.; VOLPINI, G.; DEL GIUDICE.; PEPPOLONI, S. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, p. 69-79, 2005.



- BORGES, R. M.; SOARES, L. R.; BRITO, C. S.; BRITO, D. D.; ABDALLAH, V. O. S.; FILHO, P. P. G. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p. 431-435, 2009.
- BRAMONO, K.; YAMAZAKI, M.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Jpn. Journal of Infectious Disease**, v.59, p. 73-76, 2006.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **TRENDS in Microbiology**, v.9, p. 327-335, 2001.
- CALDERONE, R. A. *Candida* and Candidiasis ASM press. **American Society for Microbiology** v.3, p.451-456, 2002.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p. 5, 2003.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology** v.44, p. 2816–2823, 2006.
- CONCHON-COSTA, I.; LOYOLA, W.; GAZIRI, L. C. J.; CUSTODIO, L. A.; FELIPE, I. Low dose of concanavalina-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v.49, p. 330-336, 2007.
- CONTI, H.R.; SHEN, F.; NAYYAR, N.; STOCUM, E.; SUN, J. N.; LINDEMANN, M. J.; HO, A. W.; HAI, J. H.; YU, J.; JUNG, J. W.; FILLER, S. G.; MASSO-WELCH, P.; EDGERTON, M.; GAFF, S. L. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.206, p. 299-311, 2009.
- COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia** v.167, p. 73–79, 2009.
- CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p. 115-120, 2000.
- DONGARI-BAGTZOGLOU, A.; FIDEL, P. L. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. **Journal of Dental Research**, v.84, p. 966-977, 2005.
- ENWURU, C. A.; OGUNLEDUN, A.; IDIKA, N.; ENWURU, N. V.; OGBONNA, F.; ANIEDOBE, M.; ADEIGA, A. Fluconazole resistant opportunistic oro-pharyngeal *Candida* and non-*Candida* yeast-like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigeria. **African Health Sciences**, v.8, p.142-148, 2008.

ERMERT, D.; URBAN, C. F.; LAUBE, B.; GOOSMANN, C.; ZYCHLINSKY, A.; BRINKMANN, V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. **Journal of Innate Immunity**, v.1, p. 181–193, 2009.

FARRE, J. C.; KRICK, R.; SUBRAMANI, S.; THUMM, M. Turnover of organelles by autophagy in yeast. **Current Opinion in Cell Biology** v.21, p. 522–530, 2009.

FELIPE, I.; BIM, S.; SOMENSI, C. C. Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin-A or jacalin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.4, p. 477–483, 1995.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAEUER, S.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H. C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infection and Immunity**, v.70, p. 3689–3700, 2002.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Review**, v.12, p. 80–96, 1999.

FIDEL, P. L. *Candida*-Host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. **Advances in Dental Research** v.19, p. 80–84, 2006.

FILIOTI, J.; SPIROGLOU, K.; ROILIDES, E. Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. **Intensive Care Medicine**, v.33, p. 1272–1283, 2007.

FRANÇA, E. J. G.; FÁVERO, D.; SCREMIN, H.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.43, p. 318–321, 2010.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p. 23–28, 2008.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v.166, p. 209–217, 2008.

GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; CANAVERA, S. J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v.97, p. 1107–1117, 2003.

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

- GAZIRI, G.; GAZIRI, L. C. J.; KIKUCHI, R.; SCANAVACCA, J.; FELIPE, I. Phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalin-A activated peritoneal macrophages. **Medical Mycology**, v.37, p. 195-200, 1999.
- GERALDINO, T. H.; VITO, E.; CUSTÓDIO, L. A.; CONCHON-COSTA, I.; GAZIRI, L. C. J.; FELIPE, I.; LOYOLA, W.; BONIFÁCIO, K. L. Increased tumour necrosis factor- $\alpha$  production, higher mannose receptor activity and ability to kill *Candida* by concanavalin-A-activated macrophages. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.59, p. 11–17, 2010.
- GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p. 122–143, 2000.
- GOLDANI, L. Z.; MÁRIO, P. S. S. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **Journal of Infection**, v.46, p.155–160, 2003.
- GREENSPAN, D.; GREENSPAN, J. S.; SCHIODT, M.; PINDBORG, J. J. Aids and the mouth. **Copenhagen**, p. 85-90, 1990.
- HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D.; JIANG, Y.; RAAD, M. S. I. The changing epidemiology of invasive candidiasis. **American Cancer Society**, v.112, p. 2493- 2499, 2007.
- HAKKI, M.; STAAB, J. F.; MARR, K. A. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.50, p. 2522–2524, 2006.
- HASAN, F.; XESS, I.; WANG, X.; JAIN, N.; FRIES, B. C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes and Infection**, v.11, p. 753-761, 2009.
- HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **TRENDS in Microbiology**, v.9, p. 591-596, 2001.
- HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p. 462-478, 1995.
- HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p. 394-398, 2008.
- HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P. L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. **Journal of Infectious Disease**. v.190, p. 624–631, 2004.
- IP, W. K.; LAU, Y. L. Role of mannose-binding lectin in the innate defense against *Candida albicans*: enhancement of complement activation but lack of opsonic function in phagocytosis by human dendritic cells. **Journal of Infectious Disease**, v.190, p. 632–640, 2004.

IVANOSKA, N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, p. 357–61, 2003.

JOLY, S.; MA, N.; SADLER, J. J.; SOLL, D. R.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. **The Journal of Immunology**, v.183, p. 3578–3581, 2009.

JONES, S.; WHITE, G.; HUNTER, P. R. Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p. 2869–2870, 1994.

KAUR, R.; DOMERGUE, R.; ZUPANCIC, M. L.; CORMACK, B. P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p. 378–384, 2005.

KIM, H.S.; CHOI, E.H.; KHAN, J.; ROILIDES, E.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; SEIN, T.; SCHAUFEL, R.L.; SAKURAI, K.; SON, C.G.; GREER, B.T.; CHANOCK, S.; LYMAN, C.A.; WALSH, T.J. Expression of Genes Encoding Innate Host Defense Molecules in Normal Human Monocytes in Response to *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v.73, p. 3714–3724, 2005.

KLEVAY, M. J.; HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Initial treatment and outcome of *Candida glabrata* versus *Candida albicans* bloodstream infection. **Diagnostic in Microbiology and Infectious Disease**, v.64, p. 152–157, 2009.

KLOTZ, S.A.; GAUR, N.K.; LAKE, D.F.; CHAN, V.; RAUCEO, J.; LIPKE, P.N. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. **Infection and Immunity**, v.72, p. 2029–2034, 2004.

KOLLS, J.K.; KANALY, S. T.; RAMSAY, A. J. Interleukin-17 an emerging role in lung inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.28, p. 9–11, 2003.

KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; THORNBLY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G. P.; RAAD, I. I. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p. 1676–1681, 2001.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infections**, v.50, p. 243–260, 2002.

KRUEGER, K. E.; GHOSH, A. K.; KROM, B. P.; CIHLAR, R. L. Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. **Microbiology**, v.150, p. 229–240, 2004.

LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; TSAI, L. K.; DANIELS, K.; SOLL, D. R. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. **Infection and Immunity**, v.68, p. 884–895, 2000.

LEBERER, E.; HARCUS, D.; DIGNARD, D.; JOHNSON, L.; USHINSKY, S.; THOMAS, D.Y.; SCHROPPEL, K. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v.42, p. 673–687, 2001.

LERNER, C. G.; GOLDMAN, R. C. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 1643–1651, 1993.

LI, L.; REDDING, S. AND DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. **Journal of Dental Research**, v.86, p.204-215, 2007.

LI, Y.L.; LEAW, S.N.; CHEN, J.H.; CHANG, H.C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer region 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v.22, p. 693-696, 2003.

LILIC, D.; GRAVENOR, I.; ROBSON, N.; LAMMAS, D.A.; DRYSDALE, P.; CALVERT, J.E.; CANT, A.J.; ABINUN, M. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Infection and Immunity**, v.71, p. 5690–5699, 2003.

LILLEGARD, J. B., R. B. SIM, P. THORKILDSON, M. A. GATES, AND T. R. KOZEL. Recognition of *Candida albicans* by mannan-binding lectin in vitro and in vivo. **Journal of Infectious Diseases**, v.193, p. 1589–1597, 2006.

LIN, L.; IBRAHIM, A. S.; XU, X.; FARBER, J. M.; AVANESIAN, V.; BAQUIR, B.; FU, Y.; FRENCH, S. W.; EDWARDS, J. E.; SPELLBERG, B. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **PLoS Pathogens**, v.5, p. 1371, 2009.

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

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 2971–2974, 2001.

MALANI, A.; HMOUD, J.; CHIU, L.; CARVER, PL.; BIELACZYC, A.; KAUFFMAN, C.A. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p. 975-981, 2005.

MANFREDI, M.; MCCULLOUGH, M. J.; AL-KARAAWI, Z. M.; VESCOVI, P.; PORTER, S. R. In vitro evaluation of virulence attributes of *Candida* spp. isolated from patients affected by diabetes mellitus. **Oral Microbiology and Immunology**, v.21, p. 183–189, 2006.

MANNS, J. M.; MOSSER, D.M.; BUCKLEY, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v.62, p. 5154-5156, 1994.

MARR, K. A.; SEIDEL, K.; WHITE, T. C.; BOWDEN, R. A. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.309–316, 2000.

MCALLISTER, F.; HENRY, A.; KREINDLER, J.L.; DUBIN, P. J.; ULRICH, L.; STEELE, C.; FINDER, J. D.; PILEWSKI, J. M.; CARRENO, B. M.; GOLDMAN, S. J.; PIRHONEN, J.; KOLLS, J.K. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene- and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. **The Journal of Immunology**, v.175, p. 404–412, 2005.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**, v.173, p. 89–97, 2000.

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

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**. v.73, p. 209-212, 2003.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M. D.; JÚNIOR, J. N. A.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F.

Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, p. 441-448, 2010.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8<sup>a</sup> ed. Washington D.C.: ASM Press, 2006.

Naglik, J.R.; Challacombe, S.J.; Hube, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p. 400–428, 2003.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O. AND HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen inter-actions. **Cellular Microbiology**, v.6, p. 915-926, 2004.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v.169, p.175–182, 2010.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.A.; VONK, A.G.; VERSCHUEREN, I.; VANDER MEER J.W.; KULLBERG, B. J. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.1483-1489, 2002.

NETEA, M.G.; VAN DER MEER, J.W. M.; SUTMULLER, R.P.; ADEMA, G.J.; KULLBERG1, B.J. From the Th1/Th2 Paradigm towards a Toll-Like receptor/T-helper. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p. 3991–3996, 2005.

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p. 67–78, 2008.

NETEA, M. G. ; MARODI, L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. **Trends in Immunology** v.31, p. 346–353, 2010.

NICOLA, A.M., CASADEVALL, A., AND GOLDMAN, D.L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, p. 313–317, 2008.

NUCCI, M., AND K. A. MARR. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.521–526, 2005.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBO, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases** v.51, p. 561–570, 2010.

ODDS FC, BERNAERTS R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p. 1923-1929, 1995.

OKAWA Y, MIYAUCHI M, KOBAYASHI H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. **Biological ; Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p. 1507–1510, 2008.

OUYANG, W.; KOLLS, J.K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v.28, p. 454–467, 2008.

PALMER, G. E.; MICHELLE N.; JOY E. Autophagy in the pathogen *Candida albicans*. **Sturtevant Microbiology**, v.153, p. 51–58, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p. 11-23, 2004.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA D. J. Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p. 515–52, 2008.

REDDING, S. W.; KIRKPATRICK, W. R.; COCO, B. J; SADKOWSKI, L.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; ENG, T.Y.; PATTERSON, T.F. *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 1879–81, 2002.

REINER, S. L. Development in Motion: Helper T Cells at Work. **Cell**. v.129, p.33-36 2007.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p. 5-11, 2005.

ROETZER, A.; GRATZ, N.; KOVARIK, P.; SCHÜLLER, C. Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. **Cellular Microbiology**, v.12, p. 199–216, 2010.

ROILIDES, E.; HOLMES, A.; BLAKE, C. ET AL. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and interferon-gamma on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against pseudohyphae of different medically important *Candida* species. **Journal of Leukocyte Biology**, v.57, p.651–656, 1995.

ROMANI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Gamma interferon modifies CD4+ subset expression in murine candidiasis. **Infection and Immunity**, v.60, p.4950-4952, 1992.

RUAN, S.Y.; LEE, L.N.; JERNG, J.S.; YU, C.J.; HSUEH, P.R. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. **Clinical Microbiology and Infection**. v.14, p. 136–140, 2008.

SALIM, R.; KOMAID, A. G. *In vitro* determination of phagocytic indices of *Candida berkhout* species by rat peritoneal macrophages. **Mycopathologia**, v.89, p. 25-34, 1985.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v.41, p. 295-310, 1994.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; ORTIZ-LÓPEZ, N. G.; VILLAR, M.; MORAGUES, M. D.; AGUIRRE, J. M.; CASHAT-CRUZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; GAITÁN-CEPEDA, L. A.; QUINDÓS, G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p. 83-92, 2005.

SCHALLER, M.; KORTING, H. C.; BORELLI, C.; HAMM, G.; HUBE, B. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, p. 2758–2765, 2005.

SEDER, R. A.; MARTH, T.; SIEVE, M. C.; STROBER, W.; LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A.B.; KELSALL, B. Factors involved in the differentiation of TGF- $\beta$  producing cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells: IL-4 and IFN- $\gamma$  have opposing effects, while TGF- $\beta$  positively regulates its own production. **Journal of Immunology**, v.160, p.5719-5728, 1998.

SEGAL, B.H.; KWON-CHUNG, J.; WALSH, T.J.; KLEIN, B.S.; BATTIWALLA, M.; ALMYROUDIS, N.G.; HOLLAND, S.M.; ROMANI, L. Immunotherapy for fungal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p. 507–515, 2006.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p. 3259–3266, 2008.



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

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **British Journal of Haematology**, v.129, p. 569–582, 2005.

SHOHAM, S.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Augmentation of innate host defenses against opportunistic fungal pathogens. **Current Fungal Infection Reports**, v.3, p. 186–191, 2009.

SOLL, D.R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Trends in Genetics**, v.9, p.61–65, 1992.

SRIKANTHA, T.; DANIELS, K. J.; WU, W.; LOCKHART, S. R.; YI, S.; SAHNI, N.; MA, N.; SOLL, D. R. Dark brown is the more virulent of the switch phenotypes of *Candida glabrata*. **Microbiology**, v.154, p. 3309–3318, 2008.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHAUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p. 6102-6107, 2000.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cellular Microbiology**, v.4, p. 461–469, 2002.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, p. 91-93, 2007.

TATO, C. M.; O'SHEA, J. J. What does it mean to be just 17? **Nature**, v.11, p. 441, 2006.

THIERAUF, A.; DETTMAYER, R.; WOLLERSEN, H.; MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Fatal *Candida tropicalis* infection in an 8-month-old infant with an aplasia of the thymus as a rare cause of death in infancy. **Forensic Science International**, v.169, p. 228–233, 2007.

VAN DER GRAAF, C. A. A.; NETEA, M. G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Differential cytokine production and Toll-Like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. **Infection and Immunity**, v.73, p. 7458–7464, 2005.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGES, T.; RENIER G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p. 4608–4615, 2005.

VAZQUEZ, J. A. Management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients with HIV infection. **Journal of HIV Therapy** v.4, p. 1–19, 2010.

VEERDONK, F. L.; MARIJNISSEN, R. J.; KULLBERG, B. J.; KOENEN, H. J.P.M.; CHENG, S.; JOOSTEN, I.; BERG, W. B.; WILLIAMS, D. L.; MEER, W.M.;

- JOOSTEN, L.A.B.; NETEA, M. G. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. **Cell Host ; Microbe**, v.5, p. 329–340, 2009 .
- VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFb in the context of an inflammatory cytokine milieu supports differentiation of IL-17-producing T. **Cells Immunity**, v.24, p. 179–189, 2006.
- VULTAGGIO, A.; LOMBARDELLI, L.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; MAZZINGHI, B.; SCALETTI, C.; MAZZETTI, M.; LIVI, C.; LEONCINI, F.; ROMAGNANI, S.; MAGGI, E.; PICCINNI, M.P. T cells specific for *Candida albicans* antigens and producing type 2 cytokines in lesional mucosa of untreated HIV-infected patients with pseudomembranous oropharyngeal candidiasis. **Microbes and Infection** v.10, p. 166-174, 2008.
- WARENDA, A. J.; KAUFFMAN, S.; SHERRILL, T. P.; BECKER, J. M.; KONOPKA, J. B. *Candida albicans* septin mutants are defective for invasive growth and virulence. **Infection and Immunity**, v.71, p.4045–4051, 2003.
- WEI, X-Q.; ROGERS, H.; LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W. The role of the IL-12 cytokine family in directing T-cell responses in oral candidosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2011, p. 1-10, 2011.
- WEINBERG, E. D. Iron and infection. **Microbiological Reviews** v.42, p. 45-66, 1978.
- WELLS, C. L.; JOHNSON, M.; HENRY-STANLEY, M. J.; BENDEL, C. M. *Candida glabrata* colonizes but does not often disseminate from the mouse caecum. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 688–693, 2007.
- WESTWATER, C.; SCHOFIELD, D. P.; NICHOLAS, J.; PAULLING, E. E.; BALISH, E. *Candida glabrata* and *Candida albicans* dissimilar tissue tropism and infectivity in a gnotobiotic model of mucosal candidiasis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.51, p. 134–139, 2007.
- XAVIER, P. C. N. Epidemiology and molecular analysis of candidemia in patients of the NHU-UFMS, 1998-2006. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, p. 66, 2009.
- XIONG, J.; KANG, K.; LIU, L.; YOSHIDA, Y.; COOPER, K. D.; GHANNOUM, M. A. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v.68, p. 2464-2469, 2000.
- YANG Y-L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v.36, p. 223–228, 2003.
- YE, P.; RODRIGUEZ, F. H.; KANALY, S.; STOCKING, K. L.; SCHURR, J.; SCHWARZENBERGER, P.; OLIVER, P.; HUANG, W.; ZHANG, P.; ZHANG, J.; SHELLITO, J.E.; BAGBY, G. J.; NELSON, S.; CHARRIER, K.; PESCHON, J. J.; Kolls, J. K. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **The Journal of Experimental Medicine**, v.194, p. 519–527, 2001.

ZEPELIN, M. B.; KUNZ, L.; RUCHEL, R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROß, U.  
Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents:  
results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August  
2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p. 424- 428, 2007.

## APÊNDICE

APÊNDICE A  
 ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NO PERIODICO FEMS IMMUNOLOGY  
 AND MEDICAL MICROBIOLOGY

**FEMS Immunology and Medical Microbiology**



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

Journal:	FEMS Immunology & Medical Microbiology
Manuscript ID:	FEMSIM-10-12-0282
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	13-Dec-2010
Complete List of Authors:	felipe, ionice; Universidade Estadual de Londrina, Patologia Carvalho, Paula; Universidade Estadual de Londrina, Patologia Custódio, Luiz; Universidade Estadual de Londrina, Patologia Quirino, Gustavo; Universidade Estadual de Londrina, Patologia Andrade, Célia; Universidade Estadual de Londrina, Microscopia Eletrônica Costa, Ivete; Universidade Estadual de Londrina, Patologia Almeida, Ricardo; Universidade Estadual de Londrina, Patologia
Keywords:	Candida albicans infection, concanavalin-A, TH17 immune response

CONCANAVALIN-A INDUCES IL-17 PRODUCTION DURING THE COURSE OF  
*CANDIDA ALBICANS* INFECTION

**Paula Galdino Cardin Carvalho<sup>1</sup>, Luiz Antonio Custódio<sup>1</sup>, Gustavo Fernando da Silva  
Quirino, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, Ivete Conchon-Costa, Ionice  
Felipe<sup>1</sup>.**

CONCAVALIN-A INDUCES IL-17 PRODUCTION DURING THE COURSE OF  
*CANDIDA ALBICANS* INFECTION

**Paula Galdino Cardin Carvalho<sup>1</sup>, Luiz Antonio Custódio<sup>1</sup>, Gustavo Fernando da Silva Quirino, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, Ivete Conchon-Costa, Ionice Felipe<sup>1</sup>.**

**Abstract**

In a previous study, our group verified that 100% of mice survived a lethal dose of *Candida albicans* following pretreatment with concanavalin-A (Con-A) for three days. This work proposed to investigate whether treatment could mediate an adaptative immune response involving TH17 cells. A significant increase in IL-17 levels at 6h postinfection was observed and was maintained up to 18h in the Con-A group, whereas in control mice, a reduction in this cytokine was verified. Correlating with IL-17 production, in the Con-A treated group, migration of neutrophils began increasing after 6h postinfection, achieving peak counts at 18h. TGF- $\beta$  levels increased significantly 2h postinfection in Con-A-treated mice. Macrophages were involved in the process, engulfing greater numbers of yeast cells, and were activated through TNF- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  produced at significant levels at 2h postinfection. Thus, they were probably more capable of killing and processing *Candida* antigens, signaling an adaptative immune response. Macrophages from controls did not prevent yeast-to-hyphae transition and were partially destroyed, as shown in scanning microscopy. These results suggest that treatment with Con-A facilitated the triggering of TH17 and TH1 responses via IL-17 and IFN- $\gamma$  production, leading to the resolution of *C. albicans* infection.

**Keywords:** *Candida albicans* infection. Concanavalin-A. TH17 immune response.

**Introduction**

*Candida albicans* is a commensal organism found in the gastrointestinal and reproductive mucosa; however, in immunocompromised settings, *C. albicans* leads to oral and oropharyngeal, vulvovaginal, mucocutaneous or disseminated candidiasis (Villar & Dongari-Bagtzoglou, 2008). *C. albicans* may cause peritonitis when it reaches the peritoneal cavity through iatrogenic inoculation involving contaminated plastic devices and fluids during continuous ambulatory peritoneal dialysis (Goldie et al., 1996; Michel et al., 1994; Fourtounas et al., 2005). The immune responses to these different forms of disease are quite distinct, revealing the complexity of the anatomical basis for host defenses against *C. albicans* infection.

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina; Departamento de Ciências Patológicas. 86051-990. Tel+51 43 3371-4616 e-mail:ionice@uel.br

IL-17 has emerged as one of the most important proinflammatory cytokines due to its modulation of neutrophil-mediated responses and its role in the protection of mucosae by inducing an increase in defensins from intestinal epithelial cells (Huang et al., 2004; Rehaume et al., 2009). Very little is known regarding the pathways regulating IL-17 when encountering pathogenic microorganisms, because only artificial conditions, such as inducing TH17 proliferation with anti-CD3/anti-CD28, have been used. A recent work identified mannose receptors as the most important pathway for IL-17 induction and TIR2/dectin-1 as having a secondary amplification effect on mannose receptor-induced IL17 production in response to *C. albicans* (van de Veerdonk et al., 2009).

Previously, our group reported that treatment with concanavalin-A for three days protected 100% of mice against lethal inoculum of *C. albicans* by increasing the expression and activity of mannose receptors on peritoneal macrophages, which produced significantly more TNF- $\alpha$  and were more able to kill *C. albicans* in vitro or over the course of infection with *Candida* compared to the control group (Conchon-Costa et al., 2007; Geraldino et al., 2010). This study tested the hypothesis that greater expression and activity of mannose receptors on peritoneal macrophages from mice pretreated with concanavalin-A could facilitate the activation of TH17 subset over the course of infection by *C. albicans*.

## Material and methods

### *Candida albicans* culture

*Candida albicans* strain CR15 was isolated from the oral mucosa of a HIV+ patient at the university hospital and maintained on Sabouraud dextrose agar; the isolate was used after two serial animal passages. *C. albicans* blastoconidia were obtained by growth in Sabouraud dextrose broth for 24 h at 28°C, were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended at  $10^7$  blastoconidia ml<sup>-1</sup> RPMI 1640 (Sigma/ Aldrich, USA).

### Treatment and infection of mice

Subgroups of 5 male Swiss mice, each weighing 28-32g and aged 4 to 6 weeks-old, received 250 $\mu$ g concanavalin-A (Sigma) (Con-A) ml<sup>-1</sup> PBS intraperitoneally (i.p.) or PBS alone and three days later were infected (i.p.) with *C. albicans* CR15 ( $10^7$  ml<sup>-1</sup> RPMI). One group of 5 noninfected mice was used as control.



### **Ex-vivo assays**

Mice that received pretreatment with Con-A or PBS were infected with *C. albicans* and sacrificed after 30 min, 2, 6, 18 and 24 h and their peritoneal exudates were collected with 2ml RPMI 1640 medium (Sigma) pH 7.0 with 140 µg gentamicin. Samples of 50 µl or 100 µl were plated in Sabouraud dextrose agar (Difco) for all the time points studied and the number of CFUs was determined after incubation for 24 h at 37°C. For analysis of cytokines, the supernatants were collected by centrifugation (3000rpm x 4 min at 4°C) and the peritoneal exudate cells were resuspended in 1ml RPMI medium pH 7.0 supplemented with 5% inactivated fetal calf serum (FCS) plus 70µg gentamicin ml<sup>-1</sup>.

### **Evaluation of peritoneal phagocytic cells**

The peritoneal exudate cells collected following infection were adhered in coverslips (0.2ml/coverslip) for 30 min at 37°C. The following tests were applied to the cells: (1) staining by May-Grunwald-Giemsa (Merck, Germany) and analysis by light microscopy to evaluate the populations of macrophages and neutrophils, percentage of phagocytosing cells by counting 20 fields; (2) staining with propidium iodide plus 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) (Sigma) to evaluate the presence of necrotic and viable cells, as described by Gasparoto et al. (2004). Analysis of fluorescent labeling was performed in a fluorescent microscope (Zeiss) and photographed (blue-violet irradiation: BG-38 and BG12 excitation filters and 530-barrier filter); and (3) the cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Merck) buffered with phosphate 0.1M for 2 h at room temperature followed by postfixation in osmium tetroxide 1% for 1 h. Following dehydrated in ethanol, the samples were dried by the critical-point method, coated with a thin layer of gold and examined in a scanning microscopy (Shimadzu 550 SS) after 2 h of phagocytic assays *in vitro*.

### **Cytokines assays**

Supernatants were collected after centrifugation of peritoneal exudates obtained from each mouse from all the experimental groups and submitted to capture ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA) to determine the concentrations of IL-17, TGF-β, IFN-γ and TNF-α. Cytokines assays were performed according to the manufacturer's instructions.

## Statistical analysis

The differences between groups were analyzed by the Student t-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results and discussion

Previously our group verified significant expression and activity of mannose receptors on macrophages from mice pretreated with Con-A for three days (Geraldino et al., 2010). Con-A-activated cells were able to destroy 70% of the *C. albicans* CR15 inoculum during 1 h of coincubation. In this study, we proposed that this pathway of phagocytosis could be mediating an adaptative immune response involving TH17 cells over the course of mice infection with *Candida*. Figure 1 shows a significant increase in IL-17 concentrations at 6 h postinfection that was maintained up to 18 h. In the control group, the mice were pretreated with saline (PBS) and few macrophages expressed mannose receptors, phagocytosis was lower compared to Con-A-activated macrophages and only 30% of *C. albicans* added to phagocytic assays were destroyed (Geraldino et al 2010). In this study, analysis verified that the levels of IL-17 were significantly reduced over the course of infection compared to mice pretreated with Con-A (Fig. 1). For first time, this study demonstrated that mannose receptors could signalize the differentiation of TH 17 cells with IL-17 production on the course of *Candida* infection in mice pretreated with Con-A. These results corroborate data obtained by van de Veerdonk et al. (2009), who affirmed that mannose receptors on human macrophages are considered the most important pathway of IL-17 induction.

Although numerous studies have focused on the pathological aspects of IL-17 producing cells in autoimmune diseases, their role in protective antimicrobial immunity has also been increasingly recognized. Thus, our interest was to investigate whether the cytokine TGF- $\beta$  could be modulating the activity of TH17 cells. Figure 2 shows basal levels of TGF- $\beta$  in both groups; however, the levels of this cytokine was significantly higher in noninfected mice pretreated with Con-A and present a significant increase 2 h postinfection, suggesting a trigger for TH17 differentiation. Corroborating these results, Mangan et al. (2006) demonstrated that TGF- $\beta$  acted to promote a substantial increase in TH17+cells independent of IL-23 in an experimental model under IFN- $\gamma$ -null conditions; furthermore, the development of TH17 cells is impaired in TGF- $\beta$ 1-deficient mice. Additionally, Veldhoen et al. (2006) verified that presence of IL-6 and TGF- $\beta$  subverts Th1 and Th2 differentiation for the generation of IL-17-producing T cells.

TH17 cells were considered to be protective against candidiasis since defective neutrophil recruitment was associated with the susceptibility of mice with IL-17R genetic deficiency to disseminated candidiasis (Huang et al., 2004). According to Kolls & Dubin (2008) IL-17 plays important role in neutrophil recruitment and granulopoiesis. In this study, the migration of neutrophils during infection was evaluated. The population of neutrophils was significantly increased at 6 h postinfection, particularly in the group pretreated with Con-A, and was maintained for 18 to 24 h (Fig. 3A), correlating with a increase significant in IL-17 levels. As expected, antimicrobial response by neutrophils caused a reduction in CFUs in the peritoneal cavity (Fig 4), because according to Zelante et al. (2009), besides inducing their recruitment, IL-17 is also associated with their activation.

Figure 3B predominantly shows macrophages in both groups of mice pretreated with Con-A or PBS before infection. Note that under these conditions, the group pretreated with Con-A presented macrophages counts two-fold higher compared to the control group. The population of macrophages was partially destroyed, particularly in control mice, in the early phase of infection; however, new cells migrated to the peritoneal cavity during the infection with *C. albicans* (Fig. 3B). Analysis of macrophages at 2 h postinfection after staining with propidium iodide plus 6-CFDA shows high viability for Con-A-activated macrophages and greater spreading compared to control macrophages (data not shown). Images from scanning microscopy show that these activated-Con-A macrophages engulf greater numbers of yeast cells and remain spread over the glass surface, while the macrophages from controls did not prevent yeast-to-hyphae transition and were partially destroyed (Fig.5).

Analyzing the levels of IFN- $\gamma$ , probably produced by Th1 cells from the peritoneal cavity, a significant increase was verified between 2 and 18 h in mice pretreated with Con-A, but not in control mice (Fig 6A). Observation also verified that TNF- $\alpha$  production was increased significantly during the initial phase of infection providing autocrine activation for Con-A-activated-macrophages (Fig. 6B), as well as IFN- $\gamma$ .

According to Ashman et al. (2010), both the innate and adaptative components of the immune system work cooperatively to provide an effective defense against the invading fungus. This study verified that the initial contact of phagocytic cells with *C. albicans* is determinant regarding the immune response, since the yeast cells could be engulfed through mannose receptors and activate the respiratory burst and cytokine release, as described in this work for the Con-A group. Differentiation to either a TH1 type or a TH17 type cell was evident due to the significant increases in both IFN- $\gamma$  and IL-17 levels, cytokines that increased the candidacidal activity of macrophages and neutrophils.

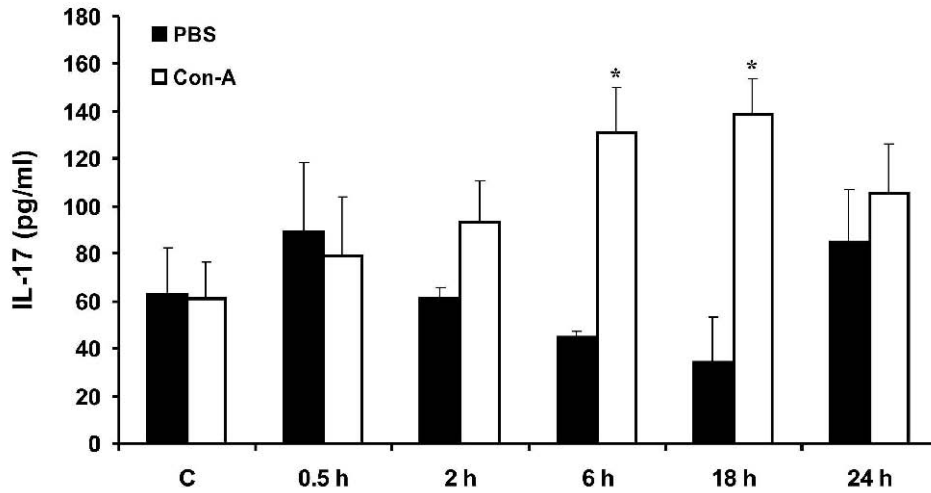
## REFERENCES

- Ashman RB, Vijayan D & Wells CA (2010). IL-12 and Related Cytokines: Function and regulatory implications in *Candida albicans* Infection. *Clin Dev Immunol* 2011: 1-9.
- Conchon-Costa I, Loyola W, Gaziri LCJ, Custódio LA & Felipe I (2007) Low dose of concanavalin-A enhances innate immune response and prevent liver injury in mice infected with *Candida albicans*. *FEMS Immun Med Microbiol* 49: 330-336.
- Fourtounas C, Marangos M, Kalliakmani P, Savidaki E, Goumenos DS & Viachojannis JG (2006). Treatment of peritoneal dialysis related fungal peritonitis with caspofungin plus amphotericin B combination therapy. *Nephrol Dial Transplant* 21: 236.
- Gasparoto TH, Gaziri LCJ, Burger E, Almeida RSC & Felipe I (2004) Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 219-224.
- Geraldino TH, de Vito E, Custódio LA, Conchon-Costa I, Gaziri LCJ, Felipe I, Loyola W, & Landucci, K B (2010) Increase tumour necrosis factor alpha production, higher mannose receptor activity and ability to kill *Candida* by concanavalin-A-activated-macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 11-17.
- Goldie SJ, Kiernan-Troidle L, Torres C, Gorban-Brennan N, Dunne D, Klinger AS & Finkeeltein FO (1996). Fungal peritonitis in a large chronic peritoneal dialysis population: a report of 55 episodes. *AM J Kidneys Dis* 28: 86-91.
- Huang W, Na L, Fidel PL & Schwarzenberg P (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice *J Infect Dis* 190: 624-631.
- Kolls JK & Dubin PJ (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological Reviews* : 226: 160-171.
- Mangan PR, Harrington LE, Quinn DBO, et al., (2006) Transforming growth factor- $\beta$  induces development of Th17 lineage. *Nature* 44: 231-234.
- Michel C, Courdavault L, Viron B, Roux P & Mignon F (1994). Fungal peritonitis in patients on peritoneal dialysis. *Am J Nephrol* 14: 113-120.
- Rehaume LM, Joault T & Chamaillard M (2009) Lessons from inflammasome: a molecular sentry linking *Candida* and Crohn's disease. *Trends in Immunol* 31: 171-175.
- Van de Veerdonk FL, Marjnissen R J, Kullberg BJ, Koenen HJPM, Cheng SC, Joosten I, Wim B, van de Berg , Willians DL, van der Meer, Joosten LAB & Netea MG (2009). The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host & microb* 5 : 329-340.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM & Stockinger B (2006). TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24: 179-189
- Villar CC & Dongari-Bagtzoglou A (2008). Immune defence mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis. *Expert Rev Mol Med* 10:e 29.

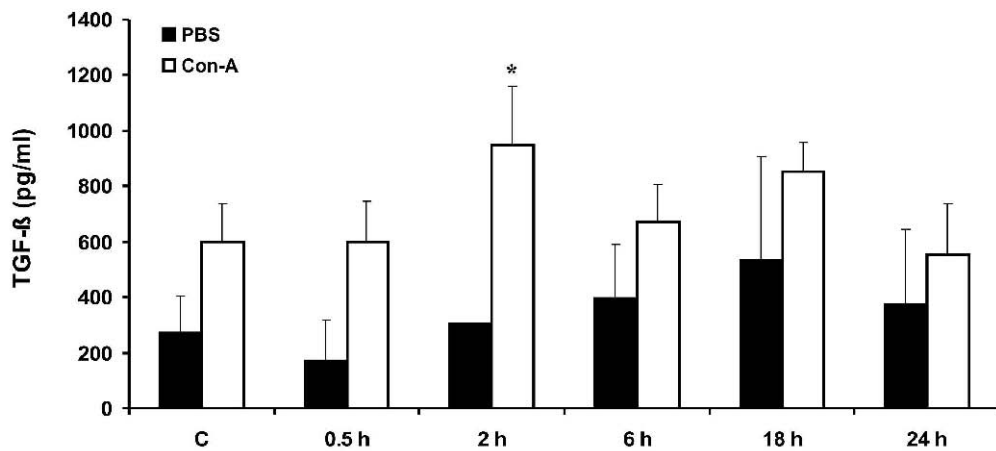
Zelante T, de Luca A, D'Angelo C & Moretti S (2009) Th17 in host defense: IL-17/ Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur J Immunol* 39:634-675.

## Legends

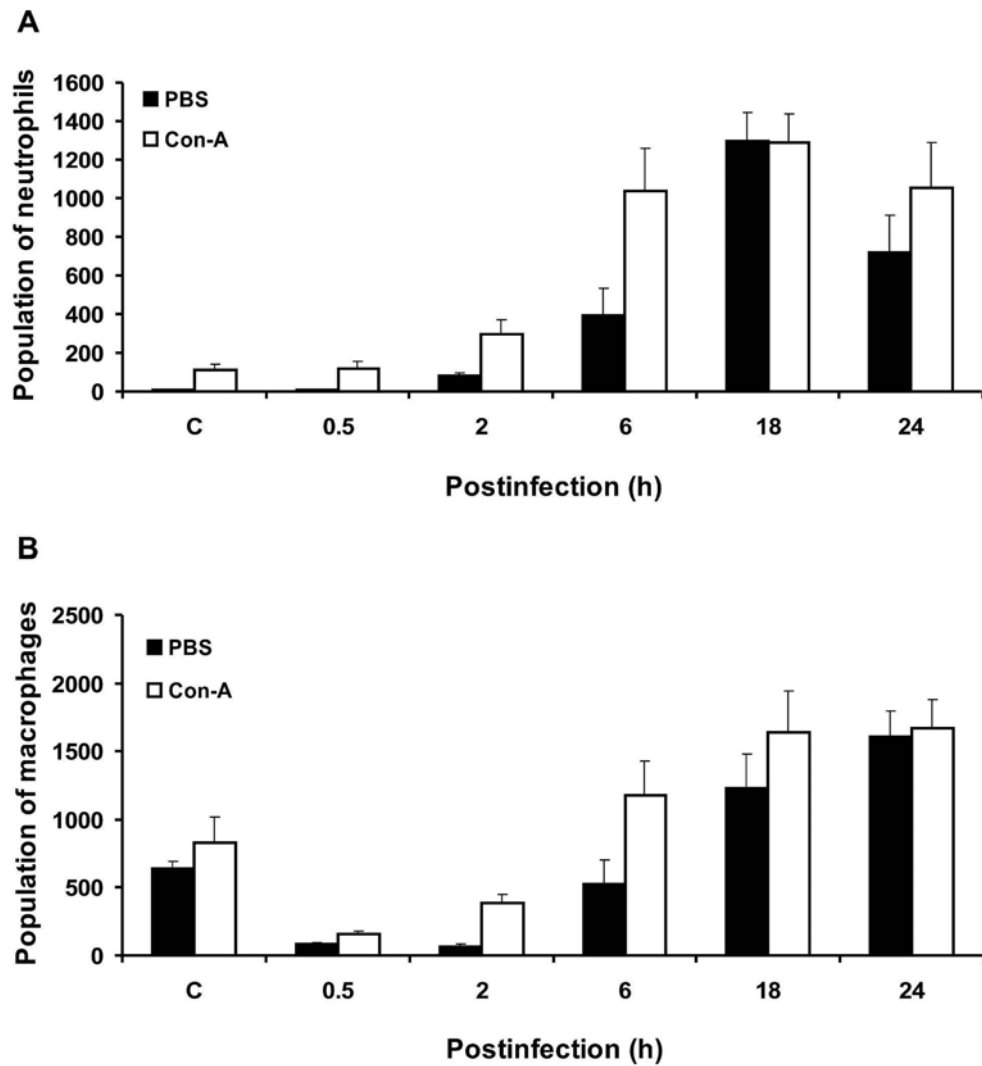
- Figure 1** – Effect of pretreatment with concanavalin-A on IL-17 production over the course of *C. albicans* infection. Mice were pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with  $10^7$  *C. albicans*. The results from noninfected mice are shown in C. The supernatants from peritoneal exudates were collected and IL-17 was determined by ELISA. Statistically significant at \*P < 0.05 for Con-A versus PBS group.
- Figure 2** – TGF- $\beta$  production over the course of infection with *C. albicans*. Mice pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days were inoculated with  $10^7$  *C. albicans*. The amount TGF- $\beta$  in the supernatants from peritoneal exudates was determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate and the results represent the mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*P < 0.05 Con-A versus PBS group.
- Figure 3** – Populations of phagocytic cells in the peritoneal exudate over the course of infection. Mice were pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with  $10^7$  *C. albicans*. The results represent the means values  $\pm$  SEM for 5 experiments. Statistically significant at \*P < 0.05 compared to noninfected mice (C).
- Figure 4** – Effect of Con-A on the recovery of *Candida albicans* from peritoneal cavity. Mice were pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with  $10^7$  *C. albicans*. The results are reported as the mean of CFUs  $\pm$  SEM per ml of peritoneal exudates from 5 experiments. Statistically significant at \*P < 0.05 for Con-A versus PBS group.
- Figure 5** – Contrasting features of peritoneal macrophages from mice pretreated with PBS for 3 days (A); or Con-A (B); PBS-macrophages infected with *C. albicans* (C); Con-A activated macrophages infected with *C. albicans* (D).
- Figure 6** – Effect of Con-A on IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production over *C. albicans* infection. Mice pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days were inoculated with  $10^7$  *C. albicans*. The amount of IFN- $\gamma$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) in the supernatants from peritoneal exudates was determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate and the results represent the mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*P < 0.05 Con-A versus PBS group.



**Figure 1** – Effect of pretreatment with concanavalinA on IL17 production over the course of *C. albicans* infection. Mice were pretreated with ConA (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with 107 *C. albicans*. The results from noninfected mice are shown in C. The supernatants from peritoneal exudates were collected and IL17 was determined by ELISA. Statistically significant at \*P < 0.05 for ConA versus PBS group.

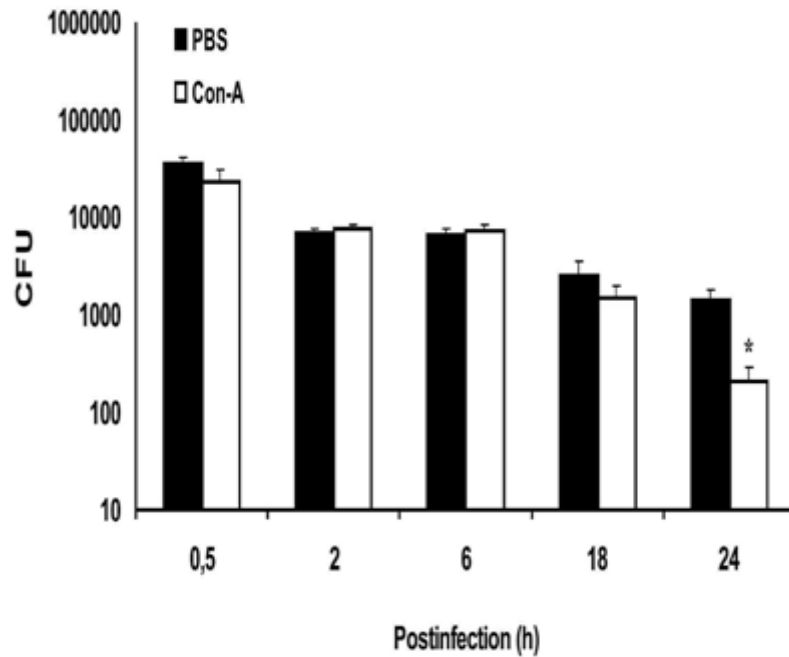


**Figure 2** – TGFβ production over the course of infection with *C. albicans*. Mice pretreated with ConA (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days were inoculated with 107 *C. albicans*. The amount TGFβ in the supernatants from peritoneal exudates was determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate and the results represent the mean ± SEM of 5 independent experiments. \*P < 0.05 ConA versus PBS group.

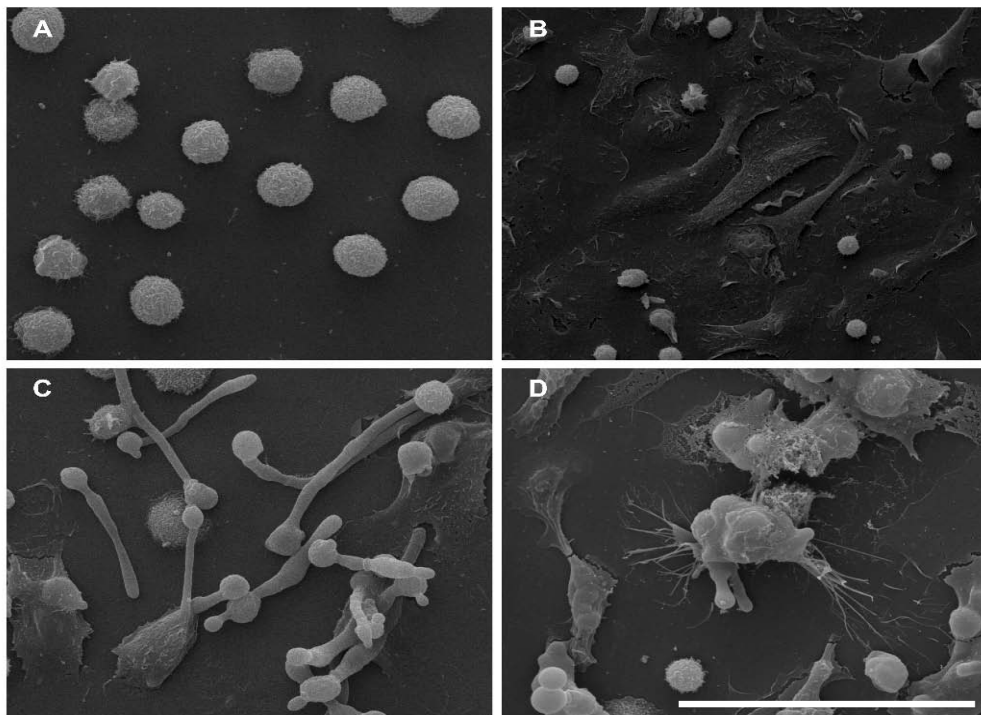


**Figure3** – Populations of phagocytic cells in the peritoneal exudate over the course of infection. Mice were pretreated with ConA (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with 107 *C. albicans*. The results represent the means values  $\pm$  SEM for 5 experiments. Statistically significant at  $*P < 0.05$  compared to noninfected mice (C).

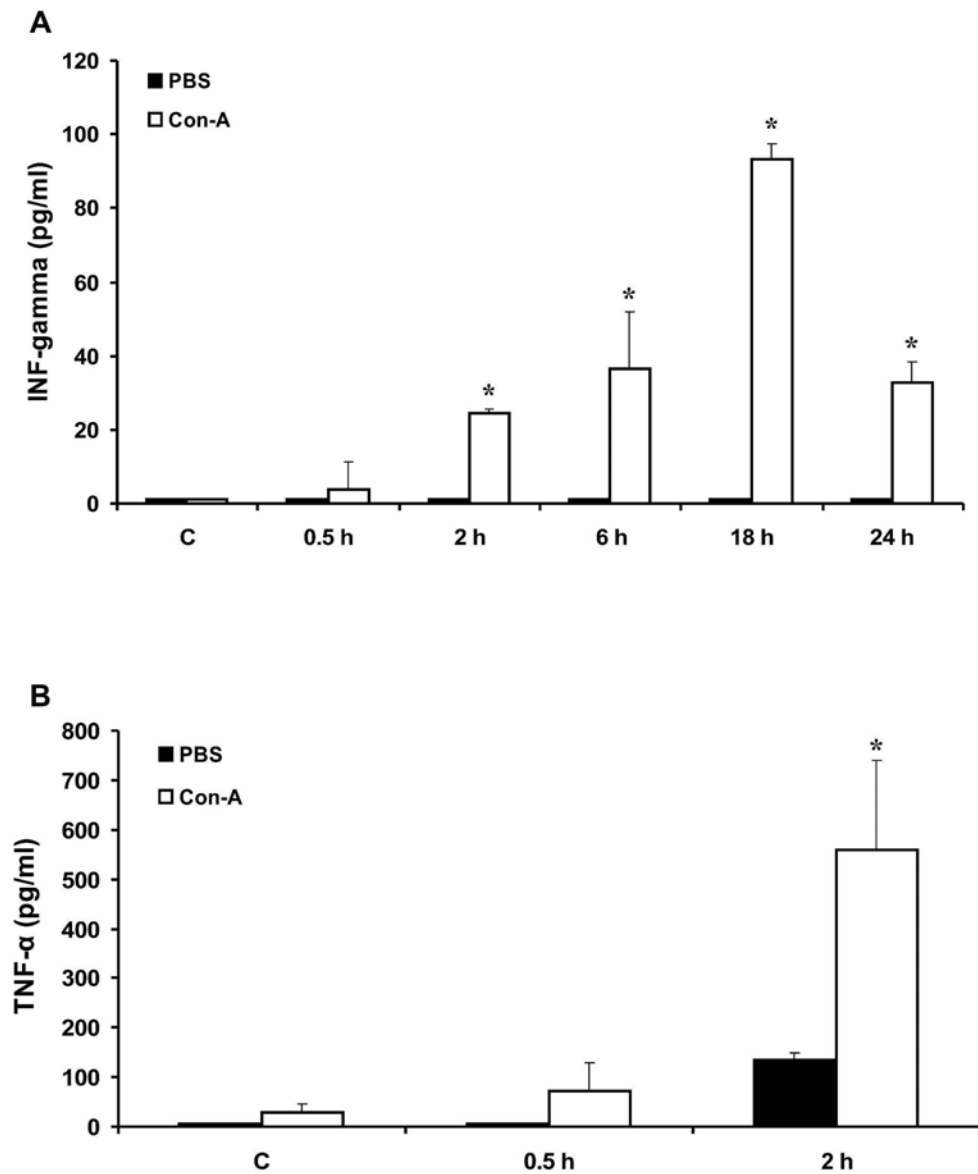




**Figure 4** – Effect of Con-A on the recovery of *Candida albicans* from peritoneal cavity. Mice were pretreated with Con-A (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days before inoculation i.p. with  $10^7$  *C. albicans*. The results are reported as the mean of CFUs  $\pm$  SEM per ml of peritoneal exudates from 5 experiments. Statistically significant at \* $P < 0.05$  for Con-A versus PBS group.



**Figure 5** – Contrasting features of peritoneal macrophages from mice pretreated with PBS for 3 days (A); or ConA (B); PBS-macrophages infected with *C. albicans* (C); ConA-activated macrophages infected with *C. albicans* (D).



**Figure 6** – Effect of ConA on IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  production over *C. albicans* infection. Mice pretreated with ConA (open bars) or PBS (closed bars) for 3 days were inoculated with 107 *C. albicans*. The amount of IFN $\gamma$  (A) and TNF $\alpha$  (B) in the supernatants from peritoneal exudates was determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate and the results represent the mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*P < 0.05 ConA versus PBS group.