



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ELIANA DE VITO

**APOPTOSE DE MACRÓFAGOS RESIDENTES E ATIVADOS  
POR CONCAVALINA – A APÓS FAGOCITOSE DE  
*CANDIDA ALBICANS***

---

Londrina  
2007

**ELIANA DE VITO**

**APOPTOSE DE MACRÓFAGOS RESIDENTES E ATIVADOS  
POR CONCAVALINA – A APÓS FAGOCITOSE DE  
*CANDIDA ALBICANS***

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

Orientador: Profa. Dra. Ionice Felipe

Londrina  
2007

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

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

D496a De Vito, Eliana.

Apoptose de macrófagos residentes e ativados por concanavalina – A após fagocitose de *Candida albicans* / Eliana De Vito. – Londrina, 2007.  
53f. : il. + anexos no final da obra.

Orientador: Ionice Felipe.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2007.

Inclui bibliografia.

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

**ELIANA DE VITO**

**APOPTOSE DE MACRÓFAGOS RESIDENTES E ATIVADOS  
POR CONCAVALINA – A APÓS FAGOCITOSE DE  
*CANDIDA ALBICANS***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mário Augusto Ono  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Luis Carlos Jabur Gaziri  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Ionice Felipe  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 22 de agosto de 2007.

## AGRADECIMENTOS

A professora Ionice Felipe, por ter me aceitado em seu laboratório e ter compartilhado parte de seus conhecimentos. Professora, mestres são raros. Revelam-se não pela pompa, mas pela dignidade e retidão que norteiam suas mais singelas atitudes. Persistem, íntegros, cientes de que a excelência do conhecimento não pode prescindir do humanismo. São poucos estes capazes de transformar céticos alunos em discípulos. A você, professora; devo gratidão profunda e, ao mundo, coragem para repetir o exemplo.

Ao professor Luis Carlos Jabur Gaziri, que ajudou na finalização desse trabalho, enriquecendo-o com seu conhecimento, Muito obrigada.

A professora Halha Ostrensky Saridakis, que sempre esteve a disposição em me ajudar, e mostrar com seu exemplo que ser humano esta acima de todo e qualquer conhecimento. Muito obrigada!

Aos professores, Emerson José Venancio e Mário Augusto Ono, por terem colaborado para o enriquecimento dessa dissertação.

Aos amigos de laboratório, Ivete Conchon-Costa, Wagner Loyola, Luiz Antônio Custódio, por terem tido paciência em me ensinar as técnicas dos ensaios, por me fazerem sorrir e persistir quando algo de errado acontecia, por terem fé, e pela enorme amizade que foi construída por esse tempo que passamos juntos. Muito Obrigada por tudo que fizeram por mim.

Aos estagiários, Jean Alcantara e Ana Carolina que se dedicaram parte de seu tempo no laboratório prestando ajuda; e pela enorme amizade que fizemos. Esse trabalho também é parte de vocês. Muito Obrigada.

A Vânia D. Castro, que me ensinou como preparar os meios para que este trabalho pudesse sair sempre com muito rigor.

A Valdelice dos Santos, Marta S. de Almeida, Iara B. Ferreira, Claci S. Stempinhaki, que me ajudaram na esterilização dos materiais, sempre com muita boa vontade.

Ao Pedro S. R. Dionizio Filho, que me ensinou a fazer punção cardíaca, para que eu pudesse obter o soro que tanto precisava.

Aos amigos de mestrado, pois compartilhamos horas de aprendizado juntos, e pela enorme força de vontade que cada um passava.

Ao amigo Alexandre Saito, por ter me ensinado a trabalhar com estatística, e por ter me ajudado a realizar muitos painéis para os congressos.

A todos que passaram por mim durante todo esse tempo de dedicação ao mestrado, ajudando de uma maneira ou outra, com gestos, palavras, sorrisos, lágrimas, fé... Muito obrigada!

## **DEDICATÓRIA**

**A minha família e ao noivo que  
sempre me incentivaram a  
continuar estudando e me dando  
apoio para realizar mais um sonho.**

**Tenho muito orgulho de vocês!**

**Amo-os muito!**

**APOIO FINANCEIRO**

CAPES

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA

CNPq

**“As grandes coisas são  
feitas por pessoas que  
tem grandes idéias e  
saem pelo mundo para  
fazer com que seus  
sonhos se tornem  
realidades”**

**Ernest Holmes**



DE VITO, Eliana. **Apoptose de Macrófagos Residentes e Ativados Por Concanavalina – A Após Fagocitose De *Candida Albicans***. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as interações entre macrófagos e *Candida albicans* quanto à fagocitose, capacidade de matar *C. albicans* e propriedade dos diferentes isolados de *C. albicans* em causar condensação de cromatina nuclear e apoptose de macrófagos. Os macrófagos foram obtidos de camundongos pré-tratados com PBS ou concanavalina-A (Con-A) por 72 horas e co-incubados com *C. albicans* (CR15, 577, CR1) por 1 hora a 37 °C. *C. albicans* opsonizadas com soro foram co-incubadas com macrófagos pré-tratados com Con-A, que apresentaram 80% de fagocitose para cepa CR1, 40% para cepa 577 e 50% para cepa CR15; levando a redução do inóculo de 2 vezes mais do que os macrófagos de animais tratados com PBS. As cepas CR15 e CR1 quando opsonizadas induziram a condensação de cromatina nuclear em 30% dos macrófagos; sendo que a cepa 577 não induziu apoptose. Uma das características da apoptose é a exposição da fosfatidilserina de macrófagos, sendo que macrófagos que fagocitaram a cepa CR15 entraram em apoptose, evidenciado pela ligação com anexina V-FITC. A ativação de macrófagos por Con-A causou uma maior atividade de receptores de manose e maior eficácia na morte de *C. albicans*, os quais foram mais resistentes a indução de apoptose por cepas CR1 e CR15 enquanto os macrófagos de animais tratados com PBS foram menos ativados; fagocitaram pouco via receptores de manose e muito através de receptores para o complemento e por não terem potencial candidacida como os ativados por Con-A, ficaram mais susceptíveis à apoptose induzida por cepas CR1 e CR15. Portanto, a Con-A é um imunomodulador que contribuiu com a eliminação de *C. albicans* através de macrófagos.

**Palavras-chave:** Apoptose. Macrófagos. *Candida albicans*. Concanavalina-A.

DE VITO, Eliana. **Apoptose de Macrófagos Residentes e Ativados Por Concanavalina – A Após Fagocitose De *Candida Albicans***. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the interactions between macrophages and *Candida albicans* in relation to phagocytosis, and their capacity to kill *C. albicans* and the capacity of the different isolates of *C. albicans* in to cause nuclear chromatin condensation and apoptosis of the macrophages. The macrophages were obtained from mice pre-treated with PBS or concanavalin-A (Con-A) for 72 hours and co-incubated with *C. albicans* (strains: CR15, 577 and CR1) for 1 hour at 37 °C. *C. albicans* initially opsonized with serum and co-incubated with macrophages pre-treated with Con-A, presented 80% of phagocytosis for CR1 strain, 40% for 577 strain and 50% for CR15 strain; the inoculum was reduced twice the number of the macrophages for each animal treated with PBS. Strain CR15 and CR1 when opsonized, induced the nuclear chromatin condensation in 30% of the macrophages; while 577 strain did not induce apoptosis. The macrophages that phagocytized CR15 strain presented apoptosis that was evidenced by the link with anexina V-FITC. The activation of macrophages by Con-A caused a higher activity of the mannose receptors and greater effectiveness in the *C. albicans* death, since they were more resistant to the induction of apoptosis by CR1 and CR15. The macrophages of animals treated with PBS were less activated; they phagocytized little via receptors mannose and a lot via receptors complement. And also, they don't have candidacidal potential as the ones activated by Con-A and they were more susceptible to apoptosis induced by CR1 and CR15. In conclusion it was observed that Con-A is an immunomodulator that contributes to the elimination of *C. albicans* by macrophages.

**Keywords:** Apoptosis. Macrophages. *Candida albicans*. Concanavalin-A.

## LISTA DE ABREVIATURA

- AIDS** – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- AIF** – Fator indutor de apoptose
- ALS** – Aglutinina
- ALT** – Alanina transaminase
- APAF-1** – Fator -1 de ativação de protease apoptótica
- Ca<sup>2+</sup>** – Cálcio
- CARD** – Domínio de recrutamento de caspases
- CON-A** – Concanavalina-A
- Cu** – Cobre
- DC** – Célula Dendriticas
- GM-CSF** – Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
- GSH** – Glutathiona
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio
- IL-1** – Interleucina-1
- IL-2** – Interleucina-2
- IL-4** – Interleucina-4
- IL-8** – Interleucina-8
- IL-10** – Interleucina-10
- IL-12** – Interleucina-12
- IL-13** – Interleucina-13
- INF-γ** – Interferon-gama
- LT** – Linfócito T
- M-CSF** – Fator estimulante de colônia de macrófago
- Mn<sup>2+</sup>** – Manganês
- MNLAN<sup>G</sup>** - – monometil-L- arginina
- NADPH** – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NO** – Oxido Nítrico
- PAMPs** – Padrões moleculares típicos presentes em microrganismos
- PBL** – Linfócito do sangue periférico
- PBS** – Salina tamponada com fosfato
- PL** – Fosfolipase
- PMN.** – Polimorfonucleares

**PRRs** – Receptores de reconhecimento padrão

**ROIs** – Intermediários reativos de oxigênio

**RNI** – Intermediários reativos de nitrogênio

**SAP** – Aspartil proteinases secretada

**SOD** – Superóxido Dismutase

**TCR** – Receptor de células T

**TLR** – Receptor *Toll- Like*

**TLR2** – Receptor *Toll- Like 2*

**TLR4** – Receptor *Toll- Like 4*

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**TNF- $\beta$**  – Fator de necrose tumoral-  $\beta$

**UFC** – Unidades formadoras de colônia

**Zn** – Zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	12
1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	14
1.2.1 ADERÊNCIA EM CÉLULAS DO HOSPEDEIRO.....	15
1.2.2 FORMAÇÃO DE TUBOS GERMINATIVOS.....	15
1.2.3 SECREÇÃO DE PROTEINASES E FOSFOLIPASES .....	16
1.2.4 ALTERAÇÃO FENOTÍPICA .....	18
1.3 MECANISMO DE DEFESA DO HOSPEDEIRO .....	20
1.4 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO IMUNOMODULADOR CONCAVALINA-A (CON-A)....	25
1.5 MORTE CELULAR: APOPTOSE E NECROSE.....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
<b>4 RESULTADO</b> .....	36
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>ANEXO</b> – Apoptosis of Resident and Concanavalin A-activated Macrophages after Phagocytosis of <i>Candida albicans</i> . Manuscrito submetido à publicação no periódico FEMS Immunology and Medical Microbiology .....	58

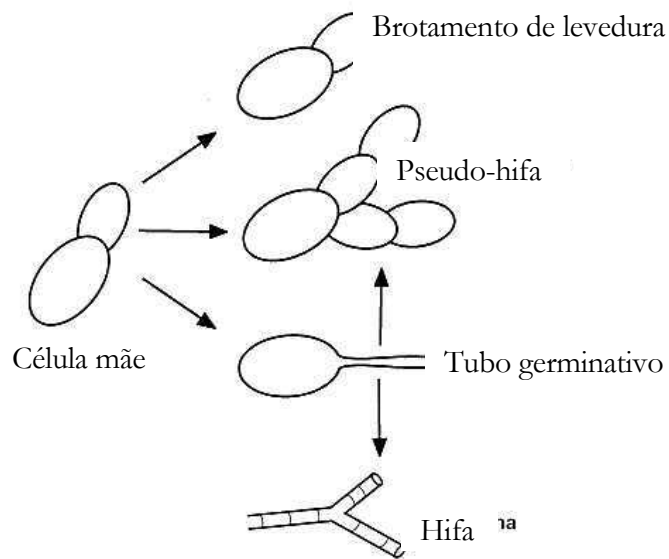
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *CANDIDA ALBICANS*

*Candida albicans* foi primeiramente descrita em 1853 por Robim, como *Oidum albicans* e desde então a espécie recebeu 100 sinônimos e passou por 18 gêneros. Destes gêneros, apenas dois prevaleceram ao longo do tempo para referir-se a esta espécie: O gênero *Monilia* no qual estava incluída a espécie *Monilia candida* (Plaut, 1885) e depois *Monilia albicans* (Zopt, 1890) terminologia utilizada quando Berkhout (1923) propôs o gênero *Candida* e a espécie *Candida albicans*, aceito pelo 3º Congresso Internacional de Microbiologia em Nova York ocorrido em 1939. Desde então passaram para o gênero *Candida* todas aquelas leveduras que não se encaixavam no gênero *Monilia* e todas as infecções produzidas por *Candida* passaram a chamar-se candidíase (PARDI & CARDOZO, 2002).

*C. albicans* é um organismo heterotrófico que usa fontes orgânicas de carbono para síntese de carboidratos, lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas. Podem ser aeróbicos ou anaeróbicos facultativos e obtém seus nutrientes por absorção e apresentam glicogênio como material de reserva (COLE, 2000).

A forma de levedura consiste em uma célula oval ou arredondada; a qual sofre um processo de transformação, originando a forma denominada de pseudo-hifa, formada por uma cadeia de células alongadas com uma visível constricção no local de septação; ou uma forma filamentosa sem constricção no local da septação denominada de hifa (SUDBERY et al., 2004).



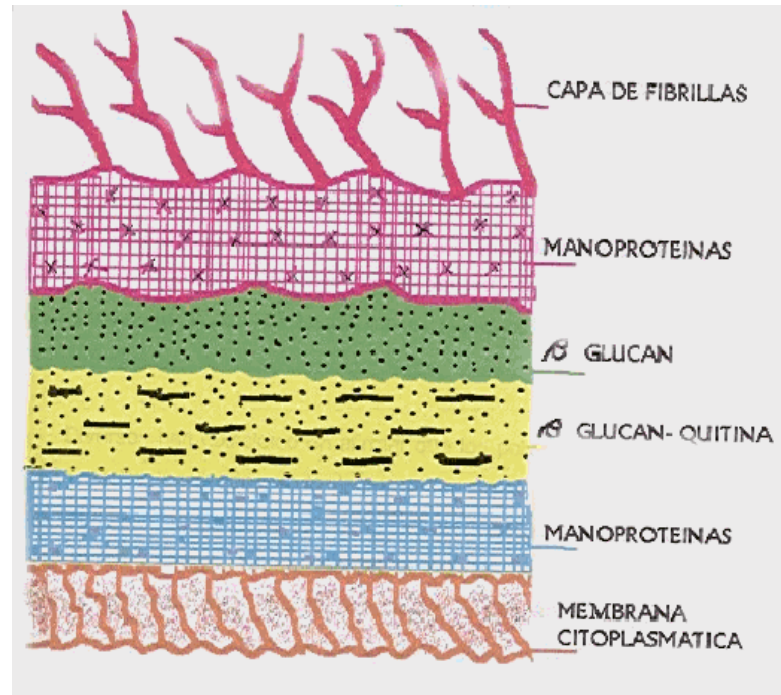
Fonte: (COLE, 2000)

**Figura 1** – Morfogênese de *C. albicans*.

*C. albicans* possui a notável capacidade de sobreviver e proliferar mesmo sob mudanças radicais do ambiente, adaptando-se os extremos de pH, osmolaridade, disponibilidade de nutrientes e temperaturas (HUBE, 2004). Essa versatilidade contribui para o sucesso de *C. albicans*, colonizar como comensal, diferentes sítios anatômicos em indivíduos saudáveis (SOLL, 2002a) e como patógeno, causando infecção em diferentes locais do corpo, especialmente em pacientes imunodeprimidos (CALDERONE & FONZI, 2001).

A parede celular contém microfibrilas de quitina inserida em uma matriz de polissacarídeos, proteínas, lipídeos, sais inorgânicos e pigmentos. A parede serve de âncora para o citoesqueleto e delimita o protoplasma. Há três tipos de polissacarídeos na parede celular de *C. albicans*: polímeros de glicose com ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 ( $\beta$  - glucanas); polímeros de N-acetil-D-Glucosamina contendo ligações  $\beta$ -1,4 (Quitina) e polímeros de manose associada covalentemente a proteínas, além de proteínas (6% a 25%) e lipídeos (1% a 7%).

As microfibrilas e as quitinas são componentes estruturais da parede, sendo também responsáveis pela resistência da parede (CHAFFIN et al., 1998).



**Figura 2** – Diagrama das seis camadas da parede celular de *C. albicans* (CALDERONE & BRAUN, 1991).

## 1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A maioria das propriedades relacionadas a patogenicidade e virulência de *C. albicans* reside na parede do fungo, que age como barreira de permeabilidade protegendo a célula contra injúrias osmóticas e físicas além de mediar a interação inicial entre o microrganismo e o ambiente (LÓPEZ-RIBOT et al., 1995).

Além da parede celular *C. albicans* possui outros importantes fatores de virulência como: aderência em células do hospedeiro; formação de tubos germinativos; secreção de proteinases e fosfolipases e “switch” fenotípico (LYON & RESENDE, 2006).



### 1.2.1 Aderência em Células do Hospedeiro

A adesão do microrganismo à superfície da célula do hospedeiro é um pré-requisito para colonização e infecção (SAMARANAYAKE & MACFARLANE, 1982; FILLER, 2006).

TRONCHIN et al. (1984) relataram que a estrutura fibrilar e grânulos de polissacarídeos na superfície de leveduras poderiam mediar à adesão em células epiteliais. Segundo CALDERONE & PHILLIS (1991), adesinas são biomoléculas que promovem aderência dos patógenos na célula do hospedeiro, ligam-se a proteínas da matrix extracelular de células de mamíferos, como fibronectina (FN), laminina, fibrinogênio e colágeno tipo I e IV (HOSTETTER, 1994). Alguns tipos de adesinas importantes já demonstradas em *C. albicans* são: ALS1p, ALS5p, HWp1p (isoladas de hifas e tubo germinativo), MNT1p (célula epitelial bucal humana), INT1p (faz ligação de MEC, FN, Laminina e Colágeno tipo I e IV à célula epitelial), (CALDERONE & FONZI, 2001; SUNDSTROM, 1999; HOSTETTER, 1994).

ALS1p e ALS3p (aglutininas) medeiam aderência em células endoteliais vasculares e células epiteliais da cavidade bucal (SHEPPARD et al., 2004). Ambas ALS1 e ALS3 são expressas principalmente pelas hifas, que também expressam outros genes para outras adesinas como HWP1 (proteína um de parede hifal) (NOBILE & MITCHELL, 2005). ALS1p é essencial para virulência na disseminação hematogênica em modelo experimental (FU et al., 1998).

### 1.2.2 Formação de Tubos Germinativos

*C. albicans* pode mudar de leveduriforme para forma filamentosa, podendo ser encontradas em tecidos infectados (ODDS, 1998). Segundo KOBAYASHI & CUTLER (1998) e GALE et al. (1998), a capacidade de *C. albicans* mudar reversivelmente de forma é importante e fundamental para virulência.

A convivência de levedura – hospedeiro ocorre durante toda a vida, sendo detectadas na microbiota humana. A princípio, a presença de cepas de *Candida* na microbiota do ser humano não induz nenhum transtorno que possa

favorecer patologia, embora as leveduras de *Candida* sejam o fungo mais oportunista já descrito. Todavia, quaisquer alterações orgânicas, independente da natureza, favorecem a manifestação infecciosa deste fungo leveduriforme. Isso ocorre principalmente quando há alterações do sistema imunológico, dos aspectos físico-químico e biológico da pele ou mucosa envolvida, propiciando a sua proliferação exarcebada com expressão de seus fatores de virulência (RIBEIRO et al., 2004). De acordo com Romani et al. (1997b) a forma leveduriforme é observada durante a proliferação e a forma filamentosa durante a invasão dos tecidos infectados e de células do sistema imune. Entretanto, ambas as formas, levedura e filamentosa, podem ser encontradas em muitas lesões, sugerindo que ambos têm um papel no desenvolvimento e progressão da doença. LO et al. (1997) construíram um mutante duplo com ausência dos genes CPH1 e EFG1. O grupo de *Candida* cph1/cph1, efg1/efg1 não induziram forma filamentosas e não apresentaram virulência.

### 1.2.3 Secreção de Proteinases e Fosfolipases

A produção de enzimas hidrolíticas por *C. albicans* é um fator de virulência e tem papel central na patogênese, sendo as aspartilproteinases secretadas (SAP) e fosfolipases (PL) duas grandes famílias de enzimas de *C. albicans* associadas à virulência.

De quatro fosfolipases (PL) identificadas (PLA, PLB, PLC e PLD) apenas PLB1 esta ligada à virulência de candidíase em modelo animal. PLB1p é uma glicoproteína, provavelmente secretada, que tem atividade hidrolase e tranilase-lisofosfolipase, cuja atividade tem sido recentemente detectada em hifas durante a invasão de tecidos (GHANNOUM, 2000). Segundo Mclain & Dolan (1997), a fosfolipase D é requerida para o processo de transição levedura-hifa.

A atividade de proteinases de *C. albicans* está associada com a família de 10 SAPs com peso molecular aproximadamente 35 e 50 kDa, codificadas pelos genes SAP1-10 (FELK et al., 2000),

A presença de 10 genes SAP sugere que diferentes proteinases podem ter uma variedade de alvos nas células e tecidos do hospedeiro durante infecção por *C. albicans* (NAGLIK et al., 2004). Todos os 10 genes SAPs codificam

pró - enzimas, que são processadas quando transportadas para via secretória (MONOD et al., 1998). As SAPs são ativadas por peptidases no retículo endoplasmático e por uma “Kex2-Like” proteinases no complexo de Golgi (HUBE, 1998). A vantagem da expressão de genes para proteinases é a produção de enzimas SAP com atividade proteolítica em distintos valores de pH, o que possibilita a colonização e infecção por *C. albicans* nos diferentes sítios. Assim, as SAP1 - 3 são associadas à levedura e tem uma atividade em pH 3 a 5 enquanto SAP4 - 6 são associadas a hifa em pH 5 a 7 (HUBE et al., 1994; NAGLIK et al., 2003).

SAP 1 e 3 estão envolvidas na mudança fenotípica (WHITE & AGABIAN, 1995). Tem papel na penetração de *C. albicans* nos tecidos, encontradas em superfície de mucosas; produzindo danos no tecido (SCHALLER et al., 1998).

A SAP 2 é regulada por proteínas exógenas ou peptídeos via um mecanismo “feed back” positivo (NAGLIK et al., 2004). Também degradam muitas proteínas humanas em mucosas incluindo matrix extracelular e proteínas de superfície do hospedeiro como queratina, colágeno, vimentina, fibronectina, laminina e mucina (RAY & PAYNE, 1990). Constituintes que participam do sistema de defesa do hospedeiro, podem ser hidrolisadas e clivadas pela SAP2, incluindo lactoferrina salivar, muitas imunoglobulinas (incluindo IgA secretória), lactoperoxidase, catepsina D (uma enzima lisossomal), componente C3 do complemento, citocina pró-inflamatória (interleucina-1 $\beta$ ),  $\alpha$ 2-macroglobulina (um inibidor de proteinase no plasma), cistatina A (um inibidor proteinase cistina), endotelina -1 humana (uma serina proteinase do sistema cinina caliceína) e precursores de proteínas da cascata de coagulação do sangue (BEAUSÉJOUR et al., 1998).

As SAPs 4 – 6 são exclusivamente expressas durante a formação da hifa com atividade em pH neutro (WHITE & AGABIAN, 1995; TAVANTI et al., 2006) e nunca encontradas em blastoconídeo. SAP 6 contribui para o sistema de infecção, principalmente sistêmica, incluindo peritonites em camundongos, além de causar danos teciduais no fígado e outros órgãos parênquimais ( HUBE et al., 1994).

Estudos *in vitro* demonstraram que a expressão do mRNA da SAP7 nunca foi detectado em condições laboratoriais testadas. Entretanto, a SAP8 foi detectada em leveduras cultivadas a 25 °C em um meio definido (HUBE et al., 1994), além de ser eficientemente expressa em temperaturas fisiológicas durante infecções em humanos e animais (RIPEAU et al., 2002). Contudo, SAP9 e 10 são expressas tardiamente nas mesmas condições de crescimento da SAP8 (MONOD et al., 1998).

Em modelos animais, o nível de atividade de SAPs correlaciona-se diretamente com o grau de virulência. Cepas de *C. albicans* mutantes para proteases são menos virulentas e mais facilmente fagocitadas. Chung et al. (1985), demonstraram que um mutante deficiente de proteinases, derivado de uma cepa produtora de proteinases, teve reduzido a sua virulência em camundongo e foi mais facilmente fagocitada por leucócitos polimorfonucleares de camundongos.

Estudos realizados por Andrade & Felipe (1992) demonstraram “*in vitro*” que proteinases de *C. albicans* participam na morte precoce de macrófagos peritoneais, e que adição de albumina ou pepstatina ao meio de incubação protege as células fagocíticas dos efeitos deletérios das proteinases.

Cassone et al. (1999) verificaram que o tratamento com inibidores de proteases diminui a adesão de *C. albicans* em células epiteliais, mostrando serem essas enzimas importantes para uma efetiva adesão. Pacientes aids submetidos à terapia anti-retroviral com inibidores de proteases do HIV (ritonavir, indinavir) recuperam-se dos episódios de candidíase orogástrica, evidenciando a contribuição das proteases para virulência da *C. albicans* (Arribas et al., 2000).

#### 1.2.4 Alteração Fenotípica

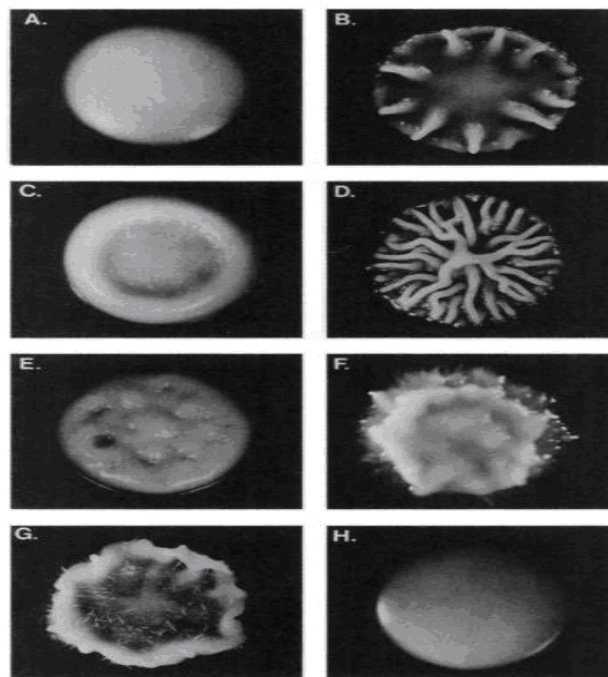
*Switching* fenotípico é a capacidade de mudança visível entre dois tipos celulares (MILLER & JOHSON, 2002), por exemplo, células brancas e opacas descrita por Soll (2002a) e já observada em alguns isolados clínicos de *C. albicans* (SLUTSKY et al., 1987).

Essa capacidade de alteração fenotípica ocorre em frequência extremamente alta podem ser distinguidos por diferentes morfologias de colônias. O processo de mudança fenotípica regula a expressão de um número de genes de fase específica, incluindo PEP1 (SAP1 E SAP3) OP4, CDR3, CDR4, NIKI, WH11 E EFG1 (KVAAL et al., 1999).

A alta frequência de mudanças fenotípicas tem sido também demonstrada regular uma transcrição de características fenotípicas implicadas na patogênese, incluindo a antigenicidade, a sensibilidade a neutrófilos, a adesão, a suscetibilidade a agentes antifúngicos, além de participar na transição de levedura

para hifa. Por essa razão, tem sido sugerido que a variação fenotípica representa um fator de virulência devido a combinação de expressão de vários genes (KVAAL et al., 1999).

As colônias de *C. albicans* podem variar entre lisa, áspera, brilhosa, estrelada, anelada e enrugada em alta frequência (SLUTSKY et al., 1985).



**Figura 3** – Características de mudanças morfológicas do grupo 3153<sup>a</sup> de *C. albicans* em ágar zinco: A) Lisa; B) Estrelada; C) Anel; D) Dobras irregulares; E) Cheia de pontos; F) Chapéu; G) Felpuda; H) Lisa. Fonte: SOLL, 2002b.

Entretanto, o mecanismo básico de mudança fenotípica e o papel dessa mudança na virulência de *C. albicans* não está claro. Colônias lisas e brancas com células redondo-oval (branca) podem mudar-se para células achatadas e cinzas; alongadas ou forma de feijão (opaca). SAP1 e SAP3 são expressas especificadamente em células opacas, considerando que SAP2, WH11, e EFG1 são expressas especificadamente por células brancas (SLUTSKY et al., 1985).

### 1.3 MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

Sabe-se que os mecanismos de defesa do hospedeiro influenciam na manifestação e gravidade de infecções fúngicas, de tal modo que a forma clínica da doença depende da resposta imune do paciente (PUCCETTI et al., 1995). Estes mecanismos de defesa são constituídos pela imunidade inata e adaptativa (HUFFNAGLE & DEEP, 2003).

Mecanismos de defesa inata estão presentes em locais de interações continua com o fungo incluindo a superfície do corpo, que funciona como barreira, a superfície epitelial da mucosa do trato respiratório, gastrintestinal e trato geniturinário (ROMANI, 2002).

A defesa inata contra fungos em mamíferos é mediada por células e fatores humorais. Dentre as células, as mais importantes são fagócitos profissionais, neutrófilos, leucócitos mononucleares (monócito e macrófagos), células dendríticas (DC), célula Natural Killer (NK), e células não hematopoiéticas, como células epiteliais e endoteliais (ROMANI, 2002).

A resposta da imunidade inata para fungos é essencial devido sua atividade efetora direta que pode levar a destruição completa por um processo fagocítico, ou então por secreção de componentes microbicidas. Além disso, a cooperação com células dos mecanismos adaptativos leva a produção de mediadores pró - inflamatórios, incluindo quimiocinas e citocinas, e a indução de atividade co-estimulatória por células fagocíticas (ROMANI, 2002).

Macrófagos têm um importante papel nos mecanismos de defesa, fagocitando e apresentando antígenos, liberando citocinas e interagindo com outras células de defesa (MURPHY et al., 1994; MARODI et al., 1998; VAZQUES–TORRES & BALISH, 1997).

QUIAN et al. (1994) realizaram um estudo que mostra a importância de macrófagos no controle da infecção de *C. albicans* especialmente na candidíase sistêmica. Os macrófagos do baço foram eliminados tratando os animais com LC12MDP (conjunto de lipossomo diclorometileno difosfonato), o que levou à redução do número desses macrófagos, e então desafiaram os animais com *C. albicans*. Os autores observaram que *C. albicans* disseminava sistemicamente chegando aos rins.

Além disso, observaram que os camundongos que receberam o tratamento para eliminar os macrófagos morreram muito mais cedo do que os camundongos controle.

A restrição do crescimento fúngico no hospedeiro ocorre por combinação dos mecanismos oxidativos e não oxidativos, no qual mais tarde consistem da desgranulação intracelular, ou da liberação de moléculas efetoras extracelular, tais como defensinas, peptídeos catiônicos neutrofilicos e sequestramento de ferro (ROMANI, 2002; HERING & SHENG, 2001).

Intermediários reativos de oxigênio (ROIs) são muito importantes para a destruição dos microrganismos. Um sistema muito importante é da NADPH oxidase que é uma enzima de múltiplas subunidades que são reunidas nos fagócitos ativados. A NADPH oxidase é induzida por sinais como receptores semelhantes a Toll (TLRs) e Interferon - gama ( $\text{INF-}\gamma$ ). Essa enzima tem a função de reduzir o oxigênio molecular em ROIs, em radicais superóxido, como forma induzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), que agem como co-fator. O nome dado ao processo para formação de ROIs é chamado de explosão respiratória (MANSUR & LEVITZ, 2002).

ROIs são prejudiciais aos fungos modificando suas proteínas, como quebra de ácidos nucléicos e lipoperoxidação (MANSUR & LEVITZ, 2002).

Macrófagos também podem produzir reativos intermediários de nitrogênio como o óxido nítrico que forma peróxido nitrito, uma potente molécula que pode destruir blastoconídeos de *C. albicans* (MARÓDI et al., 1998).

Mais especificamente blastoconídeos de *C. albicans* foram mais susceptíveis à morte por radicais livres em células fagocíticas mononucleadas através do sistema haleto-peróxido de hidrogênio e mieloperoxidase, e intermediários reativos de nitrogênio (RNI). As atividades candidacida de células fagocíticas mononucleadas têm sido associadas também com a produção de ânion superóxido, um dos produtos do metabolismo dos reativos intermediários de oxigênio (ROI) que é essencial para macrófagos na “morte oxidativa” (MARÓDI et al., 1991). Muitos dos metabólitos candidacidas produzidos pelos macrófagos (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, NO e peróxido nitrito) são moléculas solúveis e podem reagir com um grande número de moléculas alvos (MILLER & BRITIGAN, 1997). A destruição de hifas e leveduras por neutrófilos envolve a liberação de oxidantes (por exemplo, ácido hipocloroso) que causam destruição do DNA e proteínas (ROILIDES et al., 1992).

A ativação de macrófagos é importante para a atividade candidíada. Algumas citocinas ativam macrófagos; especialmente interferon-gama (INF- $\gamma$ ). Essa citocina é um potente estimulador da capacidade do macrófago em destruir a *C. albicans* (MURPHY et al., 1994).

Outras citocinas que podem ativar macrófagos são GM – CSF, M-CSF, IL-1, IL-13 e IL-4. Essas citocinas têm sido identificadas por estudos realizados *in vivo* e *in vitro* em humanos e animais (ODDS, 1998; VAZQUEZ-TORRES & BALISH, 1997; MURPHY et al., 1994). A imunidade mediada por macrófagos envolve a participação de células Th1 e isso é considerado importante para resistência nas candidíase sistêmica e mucocutâneas (JENSEN et al., 1996).

Monócitos obtidos de sangue periférico humano utilizam receptores para complemento para fagocitose de *C. albicans* enquanto que macrófagos diferenciados a partir de monócitos expressam também receptores para manose (MARÓDI et al., 1991). Diversos trabalhos mostram que opsoninas do complemento aumentam a fagocitose de *C. albicans* pelos macrófagos (LEIJH et al., 1977; GAZIRI et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2002).

A relevância do componente de C3 na fagocitose de *C. albicans* pelos macrófagos é enfatizada pelo fato que blastoconídeos são capazes de ativar a via das lectinas do complemento. Especialmente as mananas e as glucanas ( $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  3) e  $\beta$ -D (1,6)) podem ativar o complemento pela via das lectinas (DOS SANTOS et al., 2002).

O mecanismo inato reage à presença de fungos por mecanismos que permite a identificação não só de fungos, mas de um amplo espectro de patógenos pelo reconhecimento de padrões moleculares típicos presente nestes microrganismos (PAMPS). Este reconhecimento de PAMPs por células do mecanismo inato é feito por receptores de superfície celular por um repertório de proteínas codificadas na fase germinativa, designados receptores de reconhecimento padrão (PRRS) onde se incluem os receptores Tipo Toll (TLRs) (GIL & GOZALBO, 2006).

A ligação de PAMPs de fungos ao receptor “Toll Like” 2 (TLR2) sinaliza para produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina - 1 $\beta$  (IL -1 $\beta$ ) e a IL-10 (NETEA et al., 2002). A sinalização completa do TLR2 pelo zimosan ocorre depois que a  $\beta$ -glucana é reconhecida pelo receptor dectin-1 (GANTNER et al., 2003), o qual reconhece distintos componentes microbicidas por diferentes classes de receptores do sistema imune inato (LEBRON et al., 2003).



A produção de TNF- $\alpha$  e IL-8 em resposta a *C. albicans* pode também ocorrer de maneira dependente em TLR4, ocasionando diminuição da resistência à infecção em ratos com deficiência em TLR4, juntamente com a liberação de quimiocinas. Conseqüentemente ambos os receptores TLR2 e TLR4 estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra fungos (BELLOCCHIO et al.; 2004).

Outros receptores como, por exemplo, receptor de manose e Dectin-1 são utilizados pelos fagócitos para o reconhecimento de *C. albicans*. Receptores de manose na superfície de macrófagos participam na fagocitose de microrganismos com a superfície celular rica em manose. A fagocitose mediada por receptores de manose pode ser especialmente importante para *C. albicans* que apresenta manose na camada externa da parede celular de levedura (EZEKOWITZ, 1992; MARÓDI & JOHNSTON, 1993; GAZIRI et al., 1999; MORESCO et al., 2002; LOYOLA et al., 2002).

Na parede de *C. albicans* há grande quantidade de  $\beta$ -glucanas inacessível ao receptor Dectin-1. Durante o crescimento da levedura esta termina por apresentar deformidades na parede celular que expõe  $\beta$ -glucanas ao qual o receptor termina se ligando. A cicatriz da levedura é suficiente para permitir a ativação de Dectin-1. Ficou demonstrado também que Dectin-1 além de ativar macrófagos na produção de espécies reativas de oxigênio, aumenta também a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas. Com a ativação dos macrófagos devido ao receptor Dectin-1 há um aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IL-12. *C. albicans* na forma filamentosa não expõe  $\beta$ -glucana, pois não há neste caso separação da célula mãe e filha e, portanto não há ativação do receptor Dectin-1 (GANTNER et al., 2003).

Segundo Romani et al. (2002), a IL-10 produzida por células da imunidade inata previne a ativação excessiva das funções efetoras inatas, enquanto que a produção de IL-10 secretada pelas células T é a principal responsável para o estabelecimento do comensalismo e talvez latência e persistência fúngica.

O IFN- $\gamma$  é considerado um excelente estimulador da capacidade de macrófagos para matar *C. albicans*. O IFN- $\gamma$  ativa células fagocíticas mononucleadas de diferentes hospedeiros, e sítios anatômicos, estimulando os mecanismos dependentes de oxigênio e independente de oxigênio (ROI e RNI) (VECCHIARELLI et al., 1989). A síntese de IFN- $\gamma$  serve como um sinal de ativação para aumentar a capacidade candidacida de células efetoras como macrófagos (CENCI et al., 1989).

Provas adicionais do papel protetor da resposta Th1 na candidíase sistêmica originam de estudos com camundongos imunizados com uma cepa atenuada de *C. albicans* mantendo uma infecção crônica dos rins e subseqüentemente desafiado i.v. com uma cepa virulenta de *C. albicans*. A depleção de células CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  de camundongos imunes a *C. albicans* causou uma maior suscetibilidade para o segundo desafio com *C. albicans*. Tratamento de camundongos com IFN- $\gamma$  aumentou a defesa para o segundo desafio com *C. albicans*. Devido a isso esses estudos indicam a importância da síntese de IFN- $\gamma$  pelas células T para ativação de macrófagos para um estado de resistência à candidíase sistêmica. Resistência a candidíase sistêmica pelo sistema imune parece estar relacionada com o IFN- $\gamma$  e resposta imune Th1 além do desenvolvimento de hipersensibilidade tipo tardia para antígenos de *C. albicans* (ROMANI et al., 1991).

Mecanismos independentes de células T podem resultar na síntese de IFN- $\gamma$  por células Natural Killer (NK) que ativam os macrófagos aumentando a produção de TNF- $\alpha$ . No início de uma candidíase sistêmica o TNF- $\alpha$  tem função protetora (VAZQUEZ-TORRES & BALISH, 1997).

Administração de IFN- $\gamma$  foi associada com a melhora na sobrevivência de camundongos desafiados com uma dose letal de *C. albicans* e correlacionado com atividade candidíaca de macrófagos peritoneais (REDMOND et al., 1993). E ainda, camundongos nocautes para IFN- $\gamma$  tiveram redução na sobrevivência para 16,7% versus 55% para camundongos controle. Impedimento na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais foi mostrado apenas no grupo IFN- $\gamma$ -/- . Os resultados evidenciam o importante papel de IFN- $\gamma$  em candidíase sistêmica murina (KÁPOSZTA et al., 1998). A produção de IFN- $\gamma$  por LT e células NK dependem da produção de IL-18 e IL-12 por macrófagos, desde que camundongos nocautes para estas citocinas têm significativa redução nos níveis de IFN- $\gamma$  e aumentado número de UFC nos rins (KULLBERG et al., 2002).

#### 1.4 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO IMUNOMODULADOR CONCAVALINA-A (CON-A)

Os linfócitos iniciam um importante papel no sistema imune contra invasão de microrganismos. Quando o sistema imune encontra um antígeno, ocorre proliferação de linfócitos, maturação e produção de linfocinas. (PERLMUTTER et al., 1989).

A lectina mitogênica concanavalina-A (Con-A), isolada de *Canavalia ensiformis* mimetiza a ativação por antígenos e induz ativação policlonal de linfócitos (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1968). Con-A se liga diretamente às moléculas de carboidratos (D-glucopiranosídeo e D-manopiranosídeo) do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e no receptor de linfócito T (TCR), e induz a resposta celular pela oligomerização de TCRs na superfície celular, resultando na indução da resposta celular (ANDERSON & MELCHERS, 1976). A ativação de células Th1 induz produção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$  (BERTRAN et al., 1997; BARBUTO, 2001).

Felipe et al. (1995), demonstraram que os camundongos tratados com Con-A, apresentaram maior capacidade em eliminar o inóculo de *C. albicans* da cavidade peritoneal, baço, fígado e rim, em relação aos animais controle.

Posteriormente, Arraes et al. (1997), mostraram que macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados com Con-A, foram capazes de fagocitar *Serratia marcescens* tanto *in vivo* e *in vitro*, enquanto fagócitos de camundongos controle não foram capazes. Além disso, camundongos pré-tratados com Con-A sobreviveram após um inóculo letal de *S. marcescens* e animais do grupo controle morreram 15 h após a inoculação.

Em 1999, Gaziri et al., observaram que 4 dias após a administração de uma única dose de Con-A em camundongos houve uma predominante ativação nos macrófagos do exsudato peritoneal e que esses macrófagos aumentaram significativamente fagocitose do isolado 577 de *C. albicans* quando comparados com macrófagos do controle. Foi descrito também que essa fagocitose é mediada por receptores de manose ativados por Con-A que aumentou a população de macrófagos que expressa receptores de manose. Como Con-A induz a produção de IFN- $\gamma$  via resposta Th1, o inóculo intraperitoneal de *C. albicans* após 48 h foi

eliminado completamente e nos camundongos controles foi encontrado na cavidade peritoneal, baço, fígado, rim e fígado após 72h da inoculação (FELIPE et al., 1995).

Loyola et al. (2002), demonstraram que 6 horas após administração de Con-A havia uma migração de neutrófilos ativados para cavidade peritoneal. Um grupo de camundongos submetidos a este tratamento sobreviveu ao inóculo de  $1 \times 10^8$  do isolado 577 de *C. albicans*, enquanto 50% dos não tratados morreram. Também foi observado que os macrófagos além de terem um importante papel na defesa contra candidíase tiveram um aumento de atividade de receptores de manose evidenciado pelo aumento de interiorização do ligante albumina-manose-FITC, comparado aos macrófagos de animais tratados com PBS. Esse aumento de atividade de receptores de manose foi também evidenciado pelo aumento de fagocitose de *C. albicans* atingindo o máximo pelo tratamento com Con-A 72 a 96 horas antes da retirada dos macrófagos para ensaios fagocíticos. A adição de Con-A sobre os macrófagos de animais com PBS não alterou a fagocitose, sugerindo que a ativação de macrófagos pela Con-A é mediada por citocinas de linfócitos Th1.

Ainda em 2002, Moresco et al., demonstraram que o tratamento com Con-A de camundongos adultos ou na fase de lactação, provavelmente por Con-A se ligar a resíduos de carboidratos em linfócitos Th1 estimulou a liberação de  $\text{INF-}\gamma$ , qual ativou os macrófagos e resultou em uma melhor atividade fagocítica e candidacida via receptores de manose. A maior atividade de receptores de manose foi evidenciada usando inibidores específicos de receptores de manose (manana e manose).

Em 2007, Conchon-Costa et al., demonstraram que Con-A, exerceu um efeito protetor contra *C. albicans* (CR15), e que a proteção exercida por Con-A era tempo dependente, onde camundongos infectados após 3 dias de tratamento com Con-A, sobreviveram 100% enquanto que os camundongos do grupo controle somente 20% sobreviveram em um período de 28 dias. Camundongos que receberam um inóculo de  $10^7$  blastoconideo mantiveram sua atividade inalterada de alanina transaminase (ALT) em 24 e 72 horas, porém com inóculo superior de  $5 \times 10^7$  os camundongos controles morreram enquanto que os tratados com Con-A apresentaram ALT inalterado.

Conchon-Costa et al., (2007), observaram que no sobrenadante das células do exsudato peritoneal, fígado e baço, o  $\text{TNF-}\alpha$  aumentou significativamente quando tratados com Con-A, porém não nos animais controle. No plasma sanguíneo

não foi detectado durante o curso da infecção, sugere que TNF- $\alpha$  foi produzido em níveis fisiológicos em todos os sítios anatômicos estudados. Em resumo o trabalho mostra que Con-A tem efeito protetor, evidenciado pela sobrevivência, índice normal de ALT, ativação de macrófagos, e produção de TNF- $\alpha$ .

### **1.5 MORTE CELULAR: APOPTOSE E NECROSE**

A morte celular pode ocorrer pela via necrótica ou via apoptótica, estas podem ser discriminadas através de estudos morfológicos e bioquímicos (GREEN & BEERE, 2000).

A necrose parece resultar de uma disfunção celular aguda em resposta a condições estressantes ou após agentes tóxicos e processos passivos com rápida depleção de ATP celular (GORES et al., 1990). A liberação dos conteúdos celulares seguido da morte celular para o espaço extracelular pode causar além de danos teciduais, injúrias em células vizinhas ou então ataque de células pró-inflamatórias em lesões (HASLETT et al., 1992).

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

A apoptose é um processo altamente regulado de morte celular e está envolvida na embriogênese e na homeostasia tecidual (FADEEL et al., 1999). Apoptose ocorre também durante situações patológicas em organismo multicelular e mecanismo comum de reposição celular, remodelamento tecidual, remoção de células injuriadas (DELONG, 1998) e patogênese microbiana (ZYCHLINSKY et al., 1992; RODRIGUES et al., 1999).

Apoptose ocorre em dois estágios; o primeiro estágio é de sinalização e o segundo é o da execução final. A apoptose apresenta um processo caracterizado pela redução celular, condensação de cromatina, fragmentação do DNA internucleossomal e a formação de corpos apoptóticos (ALNEMRI et al., 1996). Mudanças bioquímicas também são observadas devido à perda da assimetria da

membrana e externalização da fosfatidilserina para superfície celular (EARNSHAW et al., 1999); além da exposição da trambospondina que é uma glicoproteína trimérica que faz a ligação entre células apoptóticas e fagócitos (SAVILL et al., 1992).

As caspases são cisteínas proteases (em torno de 14) com preferência em clivar produtos na porção a C-terminal de resíduos de aspartato (COHEN, 1997). Existem como pró-zimogênio solúvel no citoplasma, mitocôndria, espaço intermembranoso e matriz nuclear de praticamente de todas as células (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997); sendo processadas e ativadas em resposta a diversos estímulos pró-apoptóticos (EARNSHAW et al.; 1999). A importância das caspases no processo apoptótico foi documentada pelo efeito da superexpressão de caspases na morte celular da ação de inibidores sintéticos ou naturais de caspases que inibiram a apoptose induzida por diversos estímulos, e em animais nocautes deficientes de certas caspases que apresentaram defeito na apoptose (EKERT et al., 1999; CHANG & YANG, 2000; FADEEL, et al., 2000).

Há também outros modelos de apoptose onde caspases ativadas liberam da mitocôndria o fator indutor de apoptose (AIF) (VERHAGEN et al., 2000).

AIF é uma flavoproteína de 57 kDa, localizado na mitocôndria, e é liberado da mitocôndria antes do citocromo c. Esta via é independente de caspases pelo qual transloca-se para o núcleo onde induz fragmentação do DNA em grande escala (50 kDa) e condensação de cromatina periférica (DAUGAS et al., 2000, JOZA et al., 2001). AIF é um fator que pode também causar liberação de citocromo c (DAUGAS et al., 2000). Com a liberação do citocromo c este se liga a APAF-1, qual se liga a pro-caspase - 9 formando um complexo chamado apoptosomo. Isto leva a subsequente ativação da pro-caspase - 9. Caspase - 3 é ativada durante muitos processos apoptóticos e acredita-se ser o principal executor de caspase. Essa ativação têm sido essencial para fragmentação do DNA como condensação da cromatina da membrana plasmática (SAHARA et al., 1999; WOLF et al., 1999; SEBBAGH et al., 2001).

Através de uma verdadeira cascata, as caspases vão sendo ativadas (GROSSMANN et al., 1998; HIRATA et al.; 1998). Essa cascata ocorre por ativação autocatalítica de caspases iniciadoras que tornam a transmitir sinais pela clivagem e, além disso, ativação de caspases efetoras (SALVESEN & DIXIT, 1999). Caspases iniciadoras (2, 8,9 ,10 e talvez 12) contém um pró domínio longo com

mais de 100 aminoácidos, incluindo os domínios efetores de morte (DEDs) e domínio de recrutamento de caspases (CARDs).

As caspases podem ser iniciadas por duas vias de ativação de caspases iniciadoras, ativação de receptores de superfície (Fas, TNFR, TRAIL, outros) ou por liberação de citocromo c da mitocôndria e proteínas pró apoptóticas; (HSPs, AIF, DIABLO/Smac) (HENGARTNER, 2000).

A ligação de receptores com TNF ou Fas/ Apo-1 resultam na reunião do então chamado complexo de sinalização de indução de morte (DISC). A Pro - caspase - 8 é recrutada para via DISC via interação com DEDs, e torna-se ativado. A ativação da caspase-8 cliva e ativa pró-caspase-3, levando ao aumento de uma cascata proteolítica. Além disso, caspase - 8 cliva uma proteína citosólica chamada tBid, - truncada- pelo qual transloca para mitocôndria e induz a liberação do citocromo c (GROSS et al., 1999).

As caspases depois de ativadas são translocadas para outro compartimento celular, como o retículo endoplasmático e o núcleo, onde elas clivam proteínas alvo. A clivagem pode resultar em inativação ou ativação de proteínas alvo. Entre as proteínas que são inativadas pela clivagem são proteínas do cito esqueleto, incluindo laminina,  $\alpha$ -fodrina e actina e proteínas envolvidas no reparo do DNA e na regulação do ciclo celular, como a polimerase poliADP-ribose (PARP) e proteínas do retinoblastoma respectivamente ( FADEEL et al., 2000).

As proteínas clivadas pelas caspases durante a morte celular são: proteínas estruturais, proteínas sinalizadoras; reguladores de transcrição e translação; proteínas reguladoras de DNA e clivagem (PARPe CAD); proteínas reguladoras do metabolismo do RNA; proteínas reguladoras da interação celular; proteínas reguladoras de citocinas pró inflamatórias e proteínas reguladoras de apoptose (SIES, 1985).

O intrínseco balanço entre vida e morte pode ser influenciada também pelo acúmulo de stress intracelular e de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, e radical peroxil, procedentes de produtos tóxicos ou processo metabólico normal. Stress oxidativo tem sido definido como um distúrbio no balanço pró-oxidante, resultando em um dano celular (SIES, 1985).

Apoptose pode ser induzida pela ligação de receptores de superfície celular Fas ou receptor de TNF (TNF-R), chamados receptores de morte, pelo qual

representam uma via exclusivamente controlada pelas caspases. Nesse cenário de ligação–ligante do receptor causa uma de séries de proteínas chamadas DISC (complexo de sinalização de indução de morte) que têm atividade na caspase inicial, pró-caspase-8 (PETER & KRAMMER, 1998). Caspase-8 causa a ativação da caspase-3, entretanto pode ativar outras caspases e clivar vários substratos. Um desses substratos é uma endonuclease caspase-dependente que está livre de inibidores pela caspase-3 no citoplasma. Todavia, esta segue ao núcleo e fragmenta o DNA em fragmentos oligonucleossomal (180pb) (SAKAHIRA et al., 1998).

Um modelo diferente para ativação das caspases tem sido proposto para numerosos agentes que disparam apoptose sem envolvimento de receptores de superfície. Essa via foca na mitocôndria e que contém disfunção mitocondrial ocorrido durante a apoptose e causa a liberação do citocromo c dentro do citosol, e se liga a Apaf-1 ( fator -1 de ativação de protease apoptótico) (ZOU et al., 1999). Apaf-1 contém sítios de ligação para o citocromo c e dATP, e oligomerização com outras moléculas Apaf. A este complexo deu-se o nome de apoptossomo, onde recruta e liga pró-caspase-9 pelo uso de CARD (domínio de recrutamento de caspases) de Apaf-1 (SALEH et al., 1999). Caspase -9 é liberada do complexo multimérico e ativa caspases-3 e 7 que se encontram mais distante.

Finalmente a terceira via que pode ativar a casacata das caspase é iniciada pelas células T citotóxica (YANG et al., 1998). Perforina e granzima B cooperam para induzir apoptose em células tumorais e células infectadas com patógeno intracelular. Perforina permeabiliza as células, seguidamente granzima entra no citosol e ativa caspase-3 (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997).

O papel para o stress oxidativo na apoptose têm sido sugerido de maneiras independentes. Sugere-se que a geração de ROS intracelular possa constituir um evento apoptótico conservado, e a produção de ROS como um determinante da toxicidade associada com exposição a radiação e drogas quimioterápicas (ZAMZAMI et al., 1995). Na mitocôndria são produzidos muitos ROS ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ). Um modelo proposto para indução de  $H_2O_2$  da apoptose é a regulação do sistema Fas-FasL, o que leva ativação da caspase-8 dentro do citosol. No citosol, citocromo c liga-se a Apaf-1 no qual é um passo importante na formação do apoptossomo. O complexo apoptossomo ativa caspase-9 que ativa caspase-3.  $H_2O_2$  pode também ativar fatores transcricional, NF $\kappa$  B, AP-1 e p53 que pode regular proteínas de morte ou produzir inibidores de proteínas de sobrevivência. Defesas



celulares contra ROS incluem GSH (glutationa) a qual é sintetizado no citosol, mas é transportado para mitocôndria. A enzima SOD (superóxido dismutase) também é um importante antioxidante. Mn SOD é localizada na mitocôndria enquanto Cu, Zn, SOD existem no citosol (CHANDRA et al.; 2000).

A presença de células apoptóticas aumenta a secreção de citocinas antiinflamatória, imunoregulatória e IL-10 além da diminuição da secreção de citocinas pro inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12, o que pode inibir a inflamação e contribuir para o enfraquecimento da imunidade mediada por células (SAVILL et al., 1992).

Em 2002, PANAGIO et al., verificaram a exposição de fosfatidilserina na superfície de macrófagos co-incubados com isolado CR1 de *C. albicans* de pacientes HIV sintomáticos após 5 a 15 minutos. Estas células evoluíram para necrose entre 30 -120 minutos. No entanto células no estágio de exposição da fosfatidilserina eram positivas para Anexina V ligada a Fluoresceína (FITC) e não era positivas ao teste TUNEL; não tinham o DNA degradado em 180 pares de base (pb). Os eventos de apoptose e necrose não ocorriam quando macrófagos eram co-incubados com outro isolado de *C. albicans* (577), sugerindo que a cepa *C. albicans* CR1 produzia molécula(s) específica(s) para indução de apoptose.

Gasparoto et al. (2004), verificaram que macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos que receberam um inóculo de *C. albicans* (CR1) apresentaram ligação a anexina V-FITC e se tornaram permeáveis ao iodeto de propidium, essas mudanças ocorreram entre 30 minutos e 2 horas após infecção *in vivo*. A apoptose ocorrida aos 30 minutos aumentou com o tempo e evoluiu para necrose após 2 horas de infecção. Também foi observado baixo nível de IL-10 no exsudato peritoneal de camundongos infectados com células viáveis de *C. albicans* (CR1) após 6 horas de infecção. Porém 24 horas após a infecção com *C. albicans* viável aumentaram os níveis de IL-10 e de neutrófilos. Esses resultados sugerem que a capacidade de *C. albicans* (CR1) induzir apoptose em macrófagos poderia também induzir ou modular padrão antiinflamatório da resposta imune, desde que *C. albicans* CR1 tratado com pepstatina antes do inóculo, não induziu apoptose de macrófagos, nem aumentou produção de IL-10.

## **2 OBJETIVOS**

**Geral**

Estudar a indução de apoptose de macrófagos por isolados de *C. albicans*

**Específicos**

- a) Avaliar a indução de apoptose de macrófagos por *C. albicans*;
- b) Avaliar o efeito da opsonização de *C. albicans* sobre a fagocitose de macrófagos;
- c) Avaliar a ação fungicida de macrófagos sobre *C. albicans*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### Cultura de *C. albicans*

Os isolados CR1 e CR15 de *C. albicans* foram obtidos da mucosa oral de indivíduos portadores do vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV), internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O isolado 577 de *C. albicans* 577 foi obtido da pele de paciente HIV-negativo apresentando candidíase mucocutânea.

As culturas de *C. albicans* foram feitas em caldo Saboraud dextrose a 28 °C por 24 horas e os blastoconídeos foram coletados por centrifugação, lavados 3 vezes em salina tamponada com fosfato em pH 7,0 (PBS) e quantificados em câmara de Neubauer. No momento dos ensaios foram separadas duas alíquotas de *C. albicans* ( $2 \times 10^6$ ). Uma alíquota contendo 2,5% de soro fresco de camundongo para opsonização e a outra sem soro fresco, diluídas em meio RPMI (Gibco BRL, New York, USA) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, New York, USA), inativado a 56 °C, durante 5 minutos antes da adição a monocamada.

#### Tratamento dos Animais

Utilizou-se 2 grupos de camundongos machos suíços, com peso aproximadamente 28-32 g e 60-80 dias de idade. Um grupo de camundongos foi inoculado intraperitonealmente com 250 µl de PBS e outro grupo com 250 µg de concanavalina-A (Sigma) em 250 µl PBS.

## Ensaio Fagocítico

Animais tratados com Con-A e PBS anteriormente foram sacrificados depois de 72 horas com éter etílico. Em seguida foi realizada a assepsia da pelagem com álcool 70%; e inoculado 3 ml na cavidade peritoneal de RPMI tamponado com hepes pH 7,0 com 5% soro fetal bovino (SFB) contendo 70 µg de gentamicina.

Os macrófagos da cavidade peritoneal foram coletados e colocados em frasco estéril imerso em gelo. Após a coleta, esses macrófagos foram quantificados em câmara de Neubauer, sendo necessário para o ensaio uma concentração de  $4 \times 10^5$  células fagocíticas.

Após obter a concentração necessária, as células fagocíticas foram colocadas em lamínulas (18x18mm), contidas em placas de cultura de 6 poços (Costar, New York, USA) e foram incubadas a 37 °C. Após uma hora, as células foram lavadas com meio RPMI para remoção de células não aderentes. Realizada a lavagem, foram adicionadas sobre a monocamada de fagócitos *C. albicans* opsonizadas ou não opsonizadas com soro fresco de camundongo e incubadas novamente a 37 °C, por 1 hora. Para controle, 2 lamínulas contendo macrófagos de animais tratados com PBS ou CON-A foram mantidas sem o fungo.

## Avaliação de células fagocíticas e em apoptose

Após 1 hora de incubação (macrófagos mais *C. albicans*) as células foram lavadas com meio RPMI e fixadas em metanol absoluto (Merck) por 20 minutos. Seguidamente as células foram lavadas novamente com PBS e coradas com May – Grunwald e Giemsa, para análise em microscopia óptica em 40x.

Para confirmação de apoptose além da análise da condensação de cromatina feita pela coloração acima, foi utilizado o kit de anexina V-FITC (R&D systems, Mmineapolis, MN, USA). Os fagócitos incubados com *C. albicans* por 1h a 37° C foram lavados com PBS – cálcio gelado, e incubados com anexina V- FITC por 15 minutos a 18 – 24 °C e lavados com tampão do kit. Após, foi colocado sobre as células glicerina com PBS 1:1 e realizada imediatamente a análise de apoptose em

microscópio de fluorescência (Zeiss) e fotografadas. Foram utilizados também *C. albicans* CR15 morta pelo calor (60 ° C) ou tratados com pepstatina 5µg durante 15 minutos antes da co-incubação com macrófagos.

### **Análise de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)**

Para a análise das (UFC), realizou-se o mesmo ensaio fagocítico, porém utilizando placas de cultura (Costar, New York, USA) com 6 orifícios, sem a presença de lamínulas. Após 1 hora de incubação dos macrófagos com *C. albicans*, foi adicionado à monocamada 1000µl de água destilada gelada para ocorrer a lise dos macrófagos. Com a pipeta Pasteur foi agitado cada orifício da placa de cultura para ressuspender as células, e em seguida realizou-se uma diluição de 1:100. Para obter as UFC, foram plaqueadas *C. albicans* no volume de 10 e 25µl para controle (*C. albicans* sem macrófagos) e 25 e 50 µl das amostras (macrófagos com *C. albicans*), e foram incubadas a 37 °C durante 24 - 48 horas, para a contagem das UFC.

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada usando os testes ANOVA e Tukey para avaliar as diferenças entre as medias (em 5%).

## 4 RESULTADOS

### **Aparência morfológica dos isolados de *C. albicans***

A figura 1 mostra os 3 isolados de *C. albicans* após remoção do estoque (ágar Sabouraud dextrose cobertas com óleo mineral). Foram crescidas em Sabouraud dextrose a 28 ° C e durante o crescimento foram centrifugadas 2 vezes para remoção do óleo mineral e adicionado meio fresco. A aparência morfológica entre elas é completamente distinta, desta forma, blastoconídeos de *C. albicans* 577 são ovais, CR1 são esféricas e pequenas e *C. albicans* CR15 são grandes, o dobro da CR1.

### **Análise da porcentagem de macrófagos fagocitando *C. albicans* opsonizadas e não opsonizadas.**

A porcentagem de macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos pré-tratados com Con-A foi maior e também o número de candida fagocitada em relação aos macrófagos de animais pré-tratados com PBS. Quando os fagócitos receberam *C. albicans* opsonizadas, os macrófagos de animais tratados com Con-A apresentaram maior fagocitose, com significância estatística  $p < 0,05$  (Figura 2), em relação aos macrófagos do grupo tratado com PBS.

### **Ação fungicida de macrófagos sobre *C. albicans***

A contagem de UFC de *C. albicans* após co-incubação com macrófagos permitiu a análise de resistência dos três isolados à atividade candidicida dos macrófagos provenientes de 2 grupos distintos de camundongos, sendo um grupo tratado com PBS e outro grupo tratado com Con-A.

A porcentagem de UFC de *C. albicans* após a fagocitose pelos macrófagos mostrou-se significativamente elevada em presença de macrófagos controle em relação aos macrófagos tratados com Con-A. Os macrófagos tratados com Con-A chegaram a reduzir as UFC duas vezes mais do que os macrófagos controle, porém não houve diferença quando estes macrófagos receberam *C. albicans* opsonizadas ou não opsonizadas (Figura 3).

### **Porcentagem de macrófagos com condensação de cromatina após fagocitose de *C. albicans***

As células fagocíticas de camundongos tratados com Con-A ou PBS fagocitaram CR15, e CR1 opsonizadas com soro e apresentaram uma condensação de cromatina significativamente maior em relação aos que fagocitaram *C. albicans* sem soro. Isso se deve ao fato da população de macrófagos serem heterogênea, ou seja, tendo macrófagos ativados e recém chegados. Portanto, células CR15 e CR1 acabaram matando mais macrófagos recém chegados por indução de apoptose; enquanto que macrófagos ativados foram eficazes em matar mais *C. albicans*, resistindo melhor à indução de apoptose. Em contraste, a cepa 577 não induziu apoptose em todas as situações apresentadas (Tabela 1).

A condensação de cromatina pode ser observada na figura 4 em macrófagos de camundongos tratados com PBS ou macrófagos pequenos da população heterogênea dos tratados com Con-A.

### **Ligação de Anexina V- FITC em macrófagos**

Monocamada de macrófagos co-incubados com CR15 mostrou a exposição da fosfatidilserina, pela qual a anexina V - FITC se ligou (Figura 4). A exposição da fosfatidilserina é uma característica que ocorre no início de apoptose. As setas indicam interiorização de *C. albicans*. Os macrófagos que não interiorizaram o

isolado CR15 não entraram em apoptose como pode ser observado nas Figuras 4b e 4 d, micrografias dos mesmos campos Figura 4 a , 4 c , porém em luz branca.

Quando *C. albicans* CR15 foram previamente tratadas com pepstatina (um inibidor de proteinases), antes da incubação com macrófagos, não houve indução de apoptose (micrografia não mostrada).



## 5 DISCUSSÃO

A eliminação de *C. albicans* de um hospedeiro infectado requer a cooperação de diferentes populações de células do sistema imune e seus produtos. Como não há evidência que os anticorpos e o complemento podem mediar a lise de *C. albicans*, os fagócitos são provavelmente as primeiras células efetoras na resistência à candidíase (VAZQUEZ-TORRES & BALISH, 1997). Blastocónídeos de *C. albicans* podem ser fagocitados na presença ou na ausência de opsoninas do soro (MARÓDI et al., 1991). Outros receptores podem ser utilizados como os receptores de manose, “Toll Like” e Dectin-1 presente nos fagócitos e quando há opsoninas do complemento há também participação de receptores para opsoninas c3b, ic3b, como CR1, CR3 e CR4 (GAZIRI et al.; 1999; BARBUTO, 2001).

O tratamento dos camundongos com Con-A, a qual se liga diretamente as moléculas de carboidratos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e receptores de células T (TCR) em células T auxiliar, resulta na ativação de células TH1, e produção de citocinas como, IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$  (BERTRAM et al., 1997; BARBUTO, 2001). A liberação de citocinas aumenta a ativação de macrófagos, conseqüentemente melhora a fagocitose.

Algumas características de macrófagos ativados são visíveis em nossos ensaios, como, aumento do espraiamento sobre o vidro e aumento da capacidade fagocítica (Figura 4). Outras características não analisadas em nossos ensaios, porém evidenciado em outros trabalhos do laboratório corresponde ao aumento de expressão e atividade de receptores de manose e capacidade candidacida (Gaziri et al., 1999; Loyola et al., 2002; Moresco et al., 2002). Ainda verificado por outros autores, os macrófagos ativados apresentam aumento da produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, produção de NO, conteúdos enzimáticos de lisossomas e conseqüente aumento do poder microbicida (BARBUTO, 2001).

O NO é sintetizado a partir da ação das enzimas do oxido nítrico síntase que usa arginina, oxigênio molecular e NADPH como substratos. Quando a produção deste agente foi inibida pela N<sup>G</sup>- monometil-L-arginina (MNLA) macrófagos esplênicos e peritoneais pré-tratados com INF- $\gamma$  tiveram uma diminuição na liberação de nitrito e na atividade candidacida (CENCI et al., 1993). A administração de MNLA

em camundongos resultou num aumento do número de UFC nos rins destes animais, junto com a diminuição da hipersensibilidade do tipo tardia em relação aos animais controle. Estes resultados demonstraram que NO é essencial na morte de *Candida* e na resistência à candidíase (CLARK & ROCKETT, 1996).

Células Th1 medeiam proteção dependente de fagócitos e são os principais mediadores da imunidade adquirida (ROMANI et al., 1996; ROMANI, 1999).

Como observado em nossos ensaios, a ativação de macrófagos de animais tratados com Con-A, tornou-os melhor para fagocitar e matar *C. albicans* para os 3 isolados (CR15, 577 e CR1), do que os macrófagos de animais controles (Figura 2 e 3). A figura 4e mostra macrófagos ativados através do tratamento com Con-A e pode ser observado um grande número de leveduras interiorizadas, e a cromatina tem aparência normal, enquanto que os menores são menos espalhados e sugerem que tenham chegado ao local recentemente e não houve tempo para ativação. Ao lado, na figura 4f podem-se observar macrófagos pequenos, com condensação de cromatina, e apesar de fagocitarem menos *C. albicans*, o dimorfismo pode ser notado.

Nesse trabalho foi observado que macrófagos co-incubados com CR15 apresentaram a exposição da fosfatidilserina na superfície externa da membrana dos macrófagos o que corresponde ao início da apoptose (Figura 4). *C. albicans* CR15 foi pré-incubada com pepstatina antes de ser adicionada aos macrófagos e não induziu apoptose, sugerindo que proteinases liberadas por *C. albicans* CR15 possa estar relacionada com a sinalização para apoptose. As aspartilproteinases secretadas constituem importante fator de virulência de *C. albicans* e a produção de proteinases, provavelmente SAP2, por CR15, 577 e CR1 foram detectadas em placas de Agar com meio mínimo e albumina como fonte de nitrogênio (ALMEIDA, et al., Biosáude in press). Qual das SAPs está envolvida com a sinalização de apoptose de macrófagos merece esclarecimento.

Foi constatado que nem todos os fagócitos de camundongos tratados com Con-A estavam ativados, havendo também macrófagos recém chegados que apresentavam poder microbicida menor. Conseqüentemente *C. albicans* fagocitadas por esses macrófagos residentes, tiveram melhor oportunidade para induzir apoptose. Por outro lado, os macrófagos ativados impediram o dimorfismo e também a secreção de aspartilproteinases, e eliminaram os blastoconídeos dentro de seus fagolisossomos.

Romani et al. (1997a), demonstraram que formas filamentosas são necessárias para invadir células do sistema imune, enquanto que a forma leveduriforme pode ser o modo de proliferação em tecidos infectados, ou seja, ambas as formas tem potencial patogênico.

Fè D`Ostiani et al. (2000) demonstraram que células dendríticas da pele de camundongos fagocitaram ambas as formas de *C. albicans* (levedura e hifas), por mecanismos distintos. Ambas as formas do fungo foram encontrados dentro de fagossomos, porém a hifa escapava do fagossomo e vivia livre no citoplasma e a levedura era degradada. Isso explica a versatilidade de *C. albicans* se adaptar e sobreviver no ambiente intracelular de macrófagos. A forma leveduriforme induziu a produção de IL-12, enquanto que a hifa inibiu IL-12 e induziu a produção de IL-4. É bem conhecido que a IL-12 sinaliza para Th1 e estas células liberam IFN- $\gamma$  ativando os macrófagos enquanto que a produção de IL-4 sinaliza para Th2 que libera IL-10 desativando as funções efetoras de macrófagos.

Células dendríticas produziram menor concentração de NO na fagocitose de hifas ao serem comparadas com a fagocitose de leveduras. Entretanto, quando a hifa foi fagocitada ela inibiu a produção de iNOS, portanto não houve ativação de gene para produção de IL-12, então mecanismos microbicidas foram totalmente inativados para matar as hifas (FÈ D` OSTIANI et al., 2000).

Zepelin et al. (1998), demonstraram que SAP 4 e SAP 6, foram expressadas em *Candida* na forma de hifa após a fagocitose pelos macrófagos e que essas proteinases iniciaram uma ação importante na sobrevivência do fungo dentro de macrófagos. FELK et al. (2002), sugeriram que proteinases específicas a hifas, SAP 6 em particular, iniciam um mecanismo dominante durante infecções sistêmicas, iniciando a penetração dos tecidos e sobrevivência do fungo em fagócitos.

Macrófagos são essenciais componentes da resistência inata do hospedeiro para *C. albicans*, pois iniciam um papel significativo confinando o agente infeccioso no local da colonização e infecção, controlando assim, a invasão de leveduras em tecidos profundos, prevenindo que estas migrem para corrente sanguínea (VÁSQUEZ – TORRES & BALISH, 1997). Por outro lado *C. albicans* pode se adaptar e sobreviver no ambiente intracelular de macrófagos (LORENZ & FINK, 2001).

Segundo Tavanti et al. (2006) em um estudo usando *C. albicans* com dois distintos cariótipos designados b e c demonstraram que b e c são caracterizados

pelas diferenças morfológicas dentro dos macrófagos, e que está associado com diferentes capacidades em resistir à morte intracelular e replicar dentro dos macrófagos. Eles sugeriram que o perfil do cariótipo tipo c poderia comportar-se como um grupo patogênico, uma vez que ele resistiu à morte intracelular, replicou-se dentro do macrófago e sofreu diferenciação morfológica de levedura para hifa.

Em trabalho anterior foi demonstrado por Conchon-Costa et al. (2007) que 100% dos animais tratados com Con-A por 72 horas sobreviveram ao inóculo letal com *C. albicans* CR15 enquanto 20% dos animais tratados com PBS sobreviveram. Além disso, houve uma redução significativa do inóculo de *C. albicans* quando os animais foram pré-tratados com Con-A, em relação aos controles. Também foi observado que a produção de TNF- $\alpha$  no fígado e baço e células do exsudato peritoneal foi significativamente mais elevadas quando comparados aos animais tratados com PBS. Sugeriu-se então, que macrófagos peritoneais de camundongos tratados com PBS não conseguiram depurar *C. albicans* do local da infecção, que por sua vez disseminaram para outros órgãos como fígado e baço. Uma hipótese seria a presença de macrófagos residentes que por não conseguirem matar *C. albicans*, passaram a secretar proteinases, e conseguiram sair dos fagossomos e, induziram morte de macrófagos após 30 minutos de infecção. Entretanto, neste trabalho, ficou bem demonstrado que a indução de apoptose de macrófagos por *C. albicans* CR15, constitui um fator de virulência e que poderia explicar a perda de macrófagos na cavidade peritoneal entre 30 minutos e 2 horas de infecção observado no trabalho anterior, o que não exclui a possibilidade dos outros fatores mencionados estarem atuando.

Com relação aos macrófagos de animais tratados com Con-A, apesar de constituírem uma população heterogênea, os macrófagos menores, recém chegados ao local (cavidade peritoneal) tiveram uma atuação semelhante aos macrófagos de camundongos tratados com PBS e foram susceptíveis a indução de apoptose por *C. albicans* CR15, cujo resultado estão de acordo com Conchon-Costa et al. (2007), após 30 minutos de infecção observaram também perda de macrófagos no grupo de camundongos tratados com Con-A. Entretanto, havia também macrófagos grandes e ativados, que contribuíram com a produção de TNF- $\alpha$ , redução do inóculo de *C. albicans* e sobrevivência de camundongos. No presente estudo, *In vitro*, foi observado que macrófagos grandes fagocitaram um número maior de CR15 e não tiveram condensação de cromatina nuclear como mostra a figura 4. A melhor

evidência da ativação de macrófagos por Con-A está apresentado na figura 3, que mostra o grande potencial fungicida destes, inibiu o crescimento de *C. albicans* CR15  $p < 0,01$  em relação aos macrófagos de animais tratados com PBS.

A cepa CR1 também induziu apoptose em macrófagos, como demonstrado por Panagio et al., 2002; Gasparoto et al., 2004 através da exposição de fosfatidilserina com ligação à anexina V-FITC. Além disso, durante o processo infeccioso houve produção de IL-10, que foi dependente de apoptose desde que o tratamento de CR1 com pepstatina inibiu a apoptose de macrófagos peritoneais e também a produção de IL-10.

Apesar da cepa 577 secretar proteinases, ela não induziu a apoptose em macrófagos, uma hipótese para isto é o fato desta cepa não ser de paciente HIV+, uma vez que glicoproteínas do vírus da imunodeficiência humana, como a gp 41 e a gp 160 ativam a produção de SAPs em *C. albicans* (GRUBER et al., 1998), o que não permitiu que essa cepa se tornasse tão virulenta quanto a CR15 e CR1, produzindo seus níveis de proteinases e mudança genotípica ainda em níveis menores. Outros estudos deverão ser feitos para responder esta questão.

A relação entre candidíase e comprometimento do sistema imune é o objetivo para investigar a interação entre fatores de virulência e a resposta do hospedeiro, assim como a utilização de substâncias que possam melhorar a resposta imune durante as infecções fúngicas. Por essa razão, conclui-se que apesar da cepa CR15 de *C. albicans* apresentar fatores de virulência e induzir apoptose em macrófagos não ativados, a utilização de Con-A, mostrou-se eficaz na proteção do hospedeiro, reduzindo o inóculo de *C. albicans* independentemente do uso de receptores para opsoninas. Portanto Con-A, é um imunomodulador eficiente para ativar macrófagos com aumento do potencial candidacida.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. S.; GAZIRI, D. A.; GAZIRI, L. C. J.; FELIPE, I. Produção de aspartilproteinasas por isolados de *Candida albicans* de pacientes HIV positivo. **Biosaúde**, in press.

ALNEMRI, E. S.; LIVINGSTON, D. J.; NICHOLSON, D. W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N. A.; WONG, W. W.; YUAN, J. Human ICE/CED-3 Protease nomenclature. **Cell.**, 87: 171, 1996.

ANDERSON, J.; MELCHERS, F. In: WHILEY & SONS. **Concanavalin- A as a Tool**. London, New York, Sydney, Toronto. 1976 p. 505-522.

ANDRADE, G. M.; FELIPE, I. Evidence for the participation of proteinases released by *Candida albicans* in the early killing of peritoneal macrophages in vitro. **Braz. J. Med. Res.**, 25: 167-174, 1992.

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

ARRIBAS, J. R.; HERNANDEZ-ALBUJAR, S.; GONZALES-GARCIA, J. J.; PENA, J. M.; GONZALEZ, A.; CANEDO, T.; MADERO, R.; VAZQUEZ, J. J.; POWDERLY, W. G. Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis. **AIDS**, 14: 979-985, 2000.

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin-A polysaccharide interaction. **Can. J. Biochem.**, 9: 1147-1150, 1968.

BARBUTO, J. A. M. Imunidade Celular. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 1. ed. Revinter Ltda, Rio de Janeiro. 2001.p. 179-193.

BEAUSÉJOUR, A.; GRENIER, D.; JEAN-PAUL, G.; DESLAURIERS, N. Proteolytic Activation of the Interleukin-1 $\beta$  Precursor by *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, 66: 676-681, 1998.

BELLOCHIO, S.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; MAMBULA, S. S.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A.; LEVITZ, S. M.; ROMANI, L. The contribution of the Toll-like receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. **J. Immunol.**, 172: 3059-3069, 2004.

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

BORG-VON ZEPELIN, M.; BEGGAH, S.; BOGGIAN, K.; SANGLARD, D.; MONOD, M. The expression of the secreted aspartic proteinases Sap 4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Mol. Microbiol.**, 28: 543-554, 1998.

CALDERONE, R. A.; BRAUN, P. C. Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, 35: 543-563, 1991.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, 9: 327-335, 2001.

CALDERONE, R. A.; PHYLLIS, B. C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, 55: 1-20, 1991.

CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; TOROSANTUCCI, A.; TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; CAUDA, R. *In Vitro* and *In Vivo* Anticandidal Activity of Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors. **J. Inf. Dis.**, 180: 448-453, 1999.

CENCI, E.; ROMANI, L.; MENACACCI, A.; SPACCAPELO, R.; SCHIAFFELLA, E.; PUCCHETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. **Eur. J. Immunol.**, 5: 1034-1038, 1993.

CENCI, E.; ROMANI, L.; VECCHIARELLI, A.; PUCCHETTI, P.; BISTONI, F. Role of L3T41 lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice. **Infect. Immun.**, 57: 3581-3587, 1989.

CHAFFIN, L. W.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62: 130-180, 1998.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol. Biol. Rev.**, 64: 821-846, 2000.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, 29: 323-333, 2000.

CHUNG, K. J. K.; LEHMAN, D.; GOOD, C.; MAGEE, P.T. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, 49: 571-575, 1985.

CLARK, I. A.; ROCKETT, K. A. Nitric oxide and parasitic disease. **Advances in parasitology**, 37: 1-56, 1996.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biolchem. J.**, 326: 1-16, 1997.

COLE, G. T. (2000) **Baron`s Medical Microbiology**. Disponível em: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch073.htm>

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

DAUGAS, E.; SUSIN, S. A.; ZAZAMI, N.; FERRI, K.; IRINOPOULOS, T.; LAROCLETTE, N.; PREVOST, M. C.; LEBER, B.; Andrews, D.; PENNINGER, J.; KROEMER, G. Mitochondria-nuclear redistribution of AIF in apoptosis and necrosis. **FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.**, 14: 729-739, 2000.

DELONG, M. J. Apoptosis: A Modulator of Cellular Homeostasis and Disease States. **Ann. N Y Acad. Sci.**, 842: 82-90, 1998.

DOS SANTOS, A. A.; DE SÁ, E. A. C.; GAZIRI, L. C. J.; FELIPE, I. Treatment of serum with supernatants from cultures of *Candida albicans* reduces its serum-dependent phagocytosis. **Brazilian J. Microbiol.**, 33: 79-83, 2002.

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



EKERT, P. G., SILKE, J., VAUX, D. L. Caspase inhibitors. **Cell Death Differ**, 6: 1081-1086, 1999.

EZEKOWITZ, R. A. B. The mannose receptor and phagocytosis. In: VAN R. **Mononuclear phagocytes**. 4 ed. Boston: Kluwer Academic Publishers. p. 208–213, 1992.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. The unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. **Leukemia**, 14: 1514-1525, 2000.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Apoptosis in Human Disease: A New Skin for the Old Ceremony? **Bioch. Biophys. Research Commun.**, 266: 699-717, 1999.

FÈ d'OSTIANI, C.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.; MENCACCI, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of fungus *Candida albicans*: Implications for initiation of helper cell immunity in vitro and in vivo. **J. Exp. Med.**, 191: 1661-1673, 2000.

FELIPE, I.; BIM, S.; SOMENSI, C. C. Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin A or jacalin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 4: 477-483, 1995.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAUER, 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. **Infect. Immun.**, 70: 3689-3700, 2002.

FELK, A.; SCHAFER, W.; HUBE, B. ***Candida albicans* secretory aspartic proteinase (SAP10) gene**. Accession No. AFI 146440, 2000.

FILLER, S. G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, 9: 333-339, 2006.

FU, Y.; RIEG, G.; FONZI, W. A.; BELANGER, P. H.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G. Expression of the *Candida albicans* Gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* Induces Adherence to Endothelial and Epithelial Cells. **Infect. Immun.**, 66: 1783-1786, 1998.

GALE, C. A.; BENDEL, C. M.; MCCLELLAND, M.; HAUSER, M.; BECKER, J. M.; BERMAN, J.; HOSTETTER, M. K. Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, *INT1*. **Science**, 279: 1355-1358, 1998.

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. **J. Exp. Med**, 197: 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**, 24: 1277–1286, 2005.

GASPAROTO, T. H; GAZIRI, L. C. J.; BURGER, E.; ALMEIDA, R. S. C.; FELIPE, I. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. **FEMS Immunol. Medical Microbiol.**, 2: 219-224, 2004.

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

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13: 122-143, 2000.

GIL, L. M.; GOZALBO, D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. **Microbes and Infection**, 8: 2299-2304, 2006.

GORES, G. J.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. **Hepatology**, 4: 690-698, 1990.

GREEN, D. R.; BEERE, H. M. Apoptosis: Gone but not forgotten. **Nature**, 405: 28-29, 2000.

GROSS, A.; YIN, X. M.; WANG, K.; WEI, M. C.; JOCKEL, J.; MILLIMAN, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; KORSMEYER, S. J. Caspase cleaved BID targets mitochondria and required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. **J. Biol. Chem.**, 274: 1156-1163, 1999.

GROSSMANN, J.; MOHR, S.; LAPENTINA, E. G.; FIOCCHI, C.; LEVINE, A. D. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. **Am. J. Physiol.**, 274: G1117-G1124, 1998.

GRUBER, A.; BERLIT, J.; SPETH, C.; LASS-FLÖRL, C.; KOFLER, G.; NAGL, M.; BORG-von ZEPPELIN, M.; DIERICH, M.P.; WÜRZNER, R. Dissimilar attenuation of *Candida albicans* virulence properties by human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. **Immunobiology**, 201: 133-144, 1999.

HASLETT, C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in tissue fate of granulocytes. **Clin. Sci.**, 83: 639-648, 1992.

HENGARTNER, M. O. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407: 770-776, 2000.

HERING, H.; SHENG, M. Dendritic Spines: Structure, Dynamics and Regulation. **Nature**, 2: 880-888, 2001.

HIRATA, H.; TAKAHASHI, A.; KOBAYASHI, S.; YONEHARA, S.; SAWAI, H.; OKAZAKI, T.; YAMAMOTO, K.; SASADA, M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. **J. Exp. Med.**, 187: 587-600, 1998.

HOSTETTER, M. K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clin. Microbiol. Rev.**, 7: 29-42, 1994.

HUBE, B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, 15: 65-68, 1998.

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

HUBE, B.; MONOD, M.; SCHOFIELD, D. A.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Mol. Microbiol.**, 14: 87-99, 1994.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEPE, G. S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, 6: 344-350, 2003.

JENSEN, J.; WARNER, T.; JOHNSON, C.; BALISH, E. Oral immunization of mice against candidiasis. **J. Infect. Dis.**, 174: 133–140, 1996.

JOZA, N.; SUSIN, S. A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W. L.; CHO, S. K.; LI, C. Y. J.; SASAKI, T.; ELIA, A. J.; CHENG, H. Y. M.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K. F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, Y. Y.; MAK, T. W.; PFLUCKER, J. C. Z.; KROEMER, G.; ENNINGER, J. M. Essential role of mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, 410: 549-554, 2001.

KÁPOSZTA, R.; TREE, P.; MARÓDI, L.; GORDON, S. Characteristics of Invasive Candidiasis in gamma interferon - and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, 66:1708-1717, 1998.

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

KULLBERG, B.; NETEA, M. G.; VONK, A. G.; VERSCHUEREN, I. C.; VAN DER MEER, J. W. The role of interleukin-18 (IL-18) and IL-12 in host defense against disseminated *Candida albicans* infection. Abstr. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother Intersci. Conf. Antimicrob. **Agents Chemother**. 2002, set. 27-30; resumo número M-470.

KVAAL, C.; LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; DANIELS, K.; McCoy, J.; SOLL, D. R. Miss expression of the Opaque-Phase-Specific Gene *PEP1* (*SAP1*) in the White Phase of *Candida albicans* Confers Increased Virulence in a Mouse Model of Cutaneous Infection. **Infect. Immun.**, 67: 6652-62, 1999.

LEBRON, F.; VASSALLO, R.; PURI, V.; LIMPER, A. H. *Pneumocystis carinii* Cell Wall  $\beta$ -Glucans Initiate Macrophage Inflammatory Responses through NF- $\kappa$ B Activation. **J. Biol. Chem.**, 278: 25001–25008, 2003.

LEIJH, P. C. J.; VAN DEN BARSELAAR, M. T.; VAN FURTH, R. Kinetics of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. **Infect. Immun.**, 17: 313–318, 1977.

LO, H.; KÖHLER, J. R.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A.; FINK, G. R. Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent. **Cell**, 90: 939-949, 1997.

LÓPEZ-RIBOT, J. L.; GOZALBO, D.; SEPÚLVEDA, P.; CASANOVA, M.; MARTÍNEZ, J. P. Preliminary characterization of the material released to the culture medium by *Candida albicans* yeast and mycelial cells. **Antonie van Leeuwenhoek**, 68: 195-201, 1995.

LORENZ, M. C.; FINK, R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, 412: 83-86, 2001.

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. **FEMS Immunol. Medical Microbiol.**, 33: 201-208, 2002.

LYON, J. P.; RESENDE, M. A. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 102: 632-638, 2006.

MANSOUR, M. K.; LEVITZ, S. M. Interactions of fungi with phagocytes. **Curr. Opin. Microbiol.**, 5: 359–365, 2002.

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

MARÓDI, L.; JOHNSTON, R. B. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon- $\gamma$ . **Immunodeficiency**, 4: 181–185, 1993.

MARÓDI, L.; TOURNAY, C.; KÁPOSZTA, R.; JOHNSTON, R.B.; MOGUILEVSKY, N. Augmentation of Human Macrophage Candidacidal Capacity by Recombinant Human Myeloperoxidase and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **Infect Immun**, 66: 2750-2754, 1998.

MCLAIN, N.; DOLAN, J. W. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. **Microbiology**, 143: 3521-3526, 1997.

MILLER, R. A.; BRITIGAN, B. E. Role of Oxidants in Microbial Pathophysiology. **Clin. Microbiol. Rev.**; 10: 1–18, 1997.

MILLER, M. G.; JOHNSON, A. D. White-Opaque Switching in *Candida albicans* is controlled by Mating-Type Locus Homeodomain Proteins and Allows Efficient Mating. **Cell**, 110: 293-302, 2002.

MONOD, M.; HUBE, B.; HESS, D.; SANGLARD, D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology**, 144: 2731-2737, 1998.

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

MURPHY, J. W.; WU-HSIEH, B. A.; SINGER-VERMES, L. M.; FERRANTE, A.; MOSER, S.; RUSSO, M.; VAZCA, B. E.; CALICH, V. L.; KOWANKO, I. C. Cytokines in the host response to mycotic agents. **J. Med. Vet. Mycol.**, 1: 203-210, 1994.

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

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 67: 400-428, 2003.

NETEA, M. G.; VAN DER GRAAF, C. A. A.; VONK, A. G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J. W. M. ; KULLBERG, B. J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **J. Infect. Dis.**, 185: 1483–1489, 2002.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: Killer proteases. **Trends Biochem. Sci.**, 22: 299-306, 1997.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Regulation of Cell-Surface Genes and Biofilm Formation by the *C. albicans* Transcription Factor Bcr1p. **Curr. Biol.**, 15: 1150-1155, 2005.

ODDS, F. C. Pathogenesis of candidosis. In: Odds, FRANK C. **Candida and candidosis**. 2. ed. London: Bailliere Tindall, 1998. p. 252-278.

PANAGIO, L. A.; FELIPE, I.; VIDOTTO, M. C.; GAZIRI, L. C. J. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. **J. Med. Microbiol.**, 51: 929-936, 2002.

PARDI, G.; CARDOZO, E. I. Algumas considerações sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidíase bucal. **Acta odontol.**, 40: 9-17, 2002.

PERLMUTTER, R. M.; MARTH, D. J.; ZIEGLER, S. F.; GARVIN, A. M.; PAWAR, S.; COOKE, M.P.; ABRAHAM, K.M. Specialized protein tyrosine kinase proto-oncogenes in hematopoietic cells. **Biochim. Biophys. Acta**, 948: 245-262, 1989.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. **Curr. Opin. Immunol.**, 10: 545-551, 1998.

PUC CETTI, P.; ROMANI, L.; BISTONI, F. A Th1-Th2- like switch in candidíase: a new perspective for Therapy. **Trends Microbiol.**, 3: 237-240, 1995.

QUIAN, Q.; JUTILA, M. A.; VAN ROOIJEN, N.; CUTLER, J. E. Elimination of mouse macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidíase. **J. Immunol.**, 152: 5000-5008, 1994.

RAY, T. L.; PAYNE, C. D. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. **Infect. Immun.**, 58: 508-514, 1990.

REDMOND, H. P.; SHOU, J.; GALLAGHER, H. J.; KELLY, C. J.; DALY, J. M. Macrophage-dependent candidacidal mechanisms in the murine system. Comparison of murine Kupffer cell and peritoneal macrophage candidacidal mechanisms. **J. Immunol.**, 150: 3427-3433, 1993.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; CARDOSO, M. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab**, Goiás, n.64, 2004.

RIPEAU, J. S.; AUMONT, F.; BELHUMEUR, P.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; REPENTIGNY, L. Effect of the Echinocandin Caspofungin on Expression of *Candida albicans* Secretory Aspartyl Proteinases and Phospholipase *In Vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 3096-3100, 2002.

RODRIGUES, V. S.; DIDOTTO, M. C.; FELIPE, I.; SANTOS, D. S.; GAZIRI, L. C. J. Apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by an avian pathogenic strain of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 179: 73-78, 1999.

ROILIDES, E.; UHLIG, K.; VENZON, D.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J. Neutrophil oxidative burst in response to blastoconidia and pseudohyphae of *Candida albicans*: Augmentation by granulocyte colony-stimulating factor and interferon- $\gamma$ . **The journal of infectious Diseases**, 166: 668-673, 1992.

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

ROMANI, L. Inata immunity against Fungal Pathogens. In: CALDERONE, Richard A.; CIHLAR, Ronald L.A. **Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications**. New York: MARCEL DEKKER, 2002. p. 401–432.

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

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; DEL SERO, G.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. **J. Immunol.**, 5: 2356-2362, 1997a.

ROMANI, L.; MOCCI, S.; BIETTA, C.; LANFALONI, L.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Th1 and Th2 Cytokine Secretion Patterns in Murine Candidiasis: Association of Th1 Responses with Acquired Resistance. **Infect. Immun.**, 59: 4647–4654, 1991.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Biological role of helper T-cell subsets in candidiasis. **Chem. Immunol.**, 63: 113-137, 1996.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-12 in infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, 10: 611–636, 1997b.

SAHARA, S.; AOTO, M.; EGUCHI, Y.; IAMAMOTO, N.; YONED, Y.; TSUJIMOTO, Y. Acinus is a caspase-3 activated protein required for apoptotic chromatin condensation. **Nature**, 401: 168-173, 1999.

SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, 391: 96-99, 1998.

SALEH, A.; SRINIVASULA, S. M.; ACHARYA, S.; FISHEL, R.; ALNEMRI, E. S. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. **J. Biol. Chem.**, 274: 17941-17945, 1999.



SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M., Caspases activation: the induced proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 10964-10967, 1999.

SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. Factors affecting the in vitro adherence of fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. *Arch. Oral. Biol.*, 27: 873-82, 1982.

SAVILL, J.; HOGG, N.; REN, Y.; HASLETT, C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest.*, 4: 1513-1522, 1992.

SCHALLER, M.; SCHÄFER, W.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol. Microbiol.*, 29: 605-615, 1998.

SEBBAGH, M.; RENVOIZE, C.; HAMELIN, J.; RICHE, N.; BERTOGLIO, J.; BREARD, J. Caspase-3 – mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and membrane blebbing. *Nat. Cell. Biol.*, 3: 346-352, 2001.

SHEPPARD, D. C.; YEAMAN, M. R.; WELCH, W. H.; PHAN, Q. T.; FU, Y.; IBRAHIM, A. S.; FILLER, S. G.; ZHANG, M.; WARING, A. J.; EDWARDS, J. E. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, 279: 30480-30489, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. **Oxidative stress**. EDIÇÃO. London: Academic Press. 1985.

SLUTSKY B.; BUFFO J.; SOLL, D. R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*, 230: 666-669, 1985.

SLUTSKY, B.; STAEBELL, M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D. R. "White- opaque transition": a second high- frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, 1: 189-197, 1987.

SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.*, 81: 101-110, 2002a.

SOLL, D. R. Molecular biology of switching in *Candida* IN: CALDERONE, Richard A.; CIHLAR, Ronald L. A. **Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications**. New York: MARCEL DEKKER, 2002 p.161-162b.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Gynecol. Obst. Invest.**, 2: 317-324, 2004.

SUNDSTROM, P. Adhesins in *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2: 353-357, 1999.

TAVANTI, A.; CAMPA, D.; BERTOZZI, A.; PARDINI, G.; NAGLIK, J. R.; BARALE, S.; SENESI, S. *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. **Microbes and Infection**, 8: 791- 800, 2006.

TRONCHIN, G.; POULAIN, D.; VERNES, A. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. **Arch. Microbiol.**, 139: 221-224, 1984.

VAZQUEZ-TORRES, A.; BALISH, E. Macrophages in resistance to candidiasis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 61: 170-92, 1997.

VECCHIARELLI, A.; CENCI, E.; PULITI, M.; BLASI, E.; PUC CETTI, P.; CASSONE, A.; BISTONI, F. Protective immunity induced by low-virulence *Candida albicans*: cytokine production in the development of the anti-infectious state. **Cell. Immunol.**, 2: 334-344, 1989.

VERHAGEN, A. M.; EKERT, P. G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L. M.; REID, G. E.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; VAUX, D. L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell.**, 102: 43-53, 2000.

WHITE, T. C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases: Isoenzyme Pattern Is Determined by Cell Type, and Levels Are Determined by Environmental Factors. **J. Bacteriol.**, 177: 5215-5221, 1995.

WOLF, B. B.; SCHULER, M.; ECHEVERRI, F.; GREEN, D. R. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. **J. Biol. Chem.**, 274: 30651-30656, 1999.

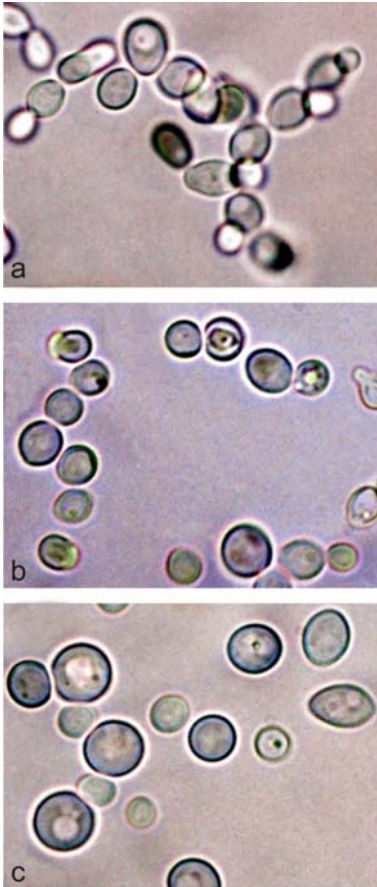
YANG, X.; STENNICKE, H. R.; WANG, B.; GREEN, D. R.; JANICKE, R. U.; SRINIVASAN, A.; SETH, P.; SALVESEN, G. S.; FROELICH, C. J. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. **J. Biol. Chem.**, 273: 34278-34283, 1998.

ZAMZAMI, N.; MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; DECAUDIN, D.; MACHO, A.; HIRSCH, T.; SUSIN, S. A.; PETIT, P. X.; MIGNOTTE, B.; KROEMER, G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. **J. Exp. Med.**, 182: 367-377, 1995.

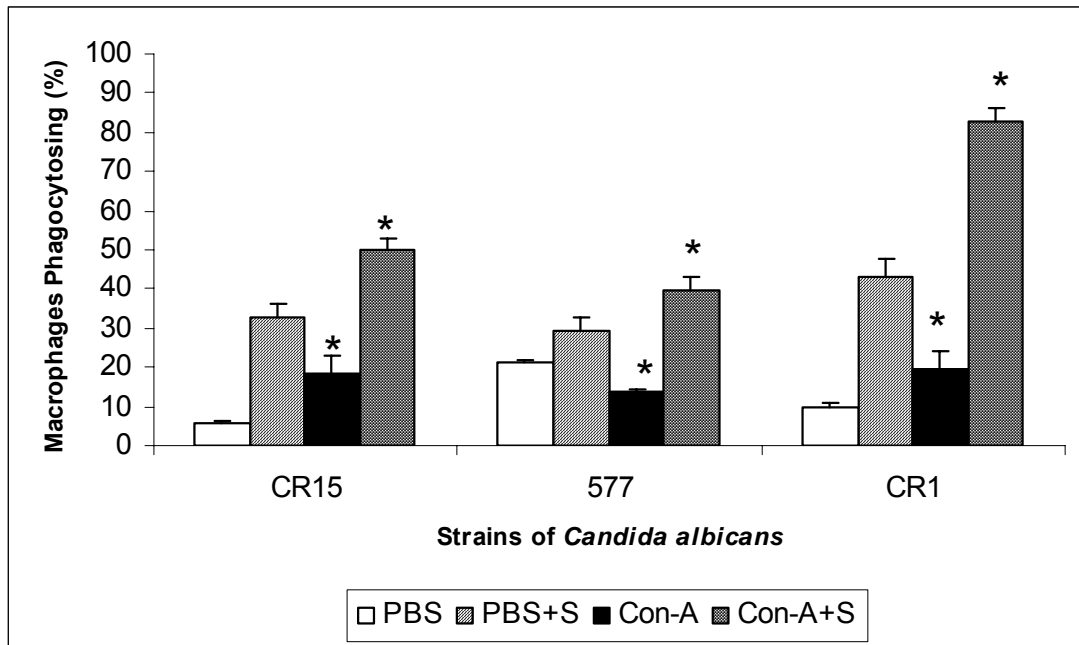
ZOU, H.; LIU, X.; WANG, X. Na APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J. Biol. Chem.**, 274: 11549-11556, 1999.

ZYCHLINSKY, A.; PREVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature**, 358: 167-169, 1992.

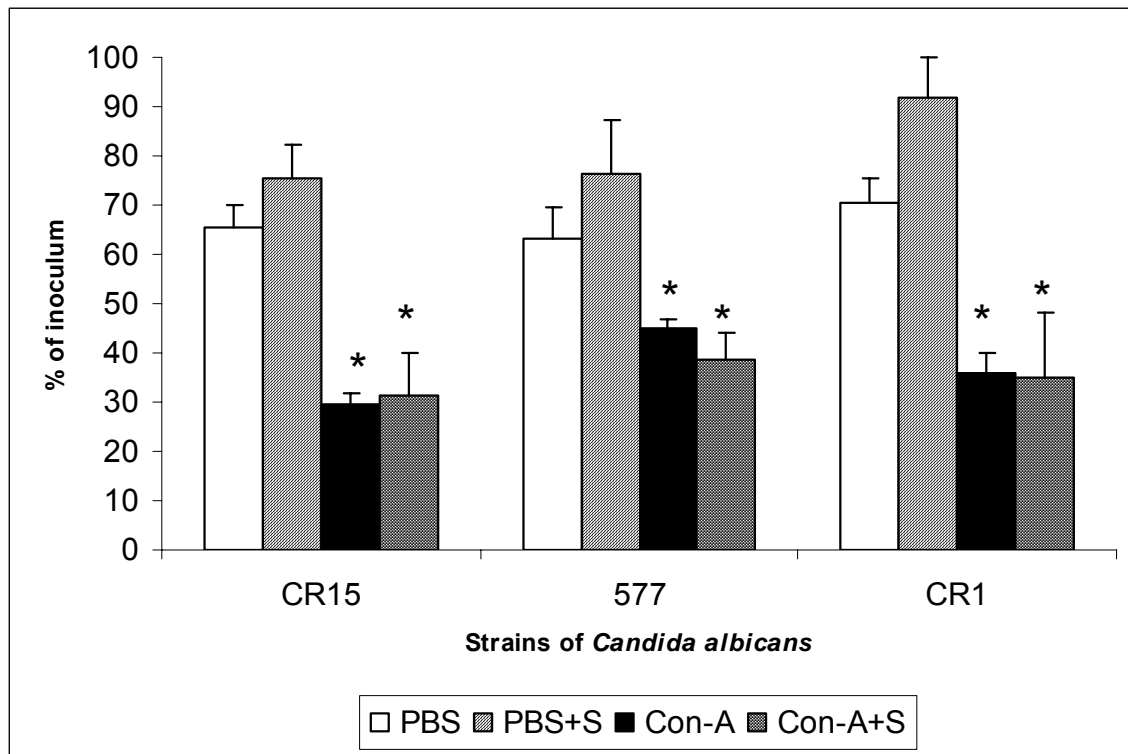
**ANEXOS**



**Figura 1.** Aparência morfológica dos isolados de *C. albicans*. Os isolados 577, CR1 e CR15 foram crescidos em caldo Sabouraud dextrose por 24 horas a 28°C respectivamente.



**Figura 2.** Efeito da Concanavalina-A na fagocitose de *C. albicans*. Macrófagos de camundongos tratados com PBS ou com Con-A foram co-incubados com *C. albicans* não opsonizadas ou opsonizadas por 1 hora a 37 °C e a porcentagem de macrófagos fagocitando foi determinada pela contagem de 200 macrófagos. Dados constituem média e erro padrão de 5 experimentos \* P<0,05 comparados com macrófagos residentes.



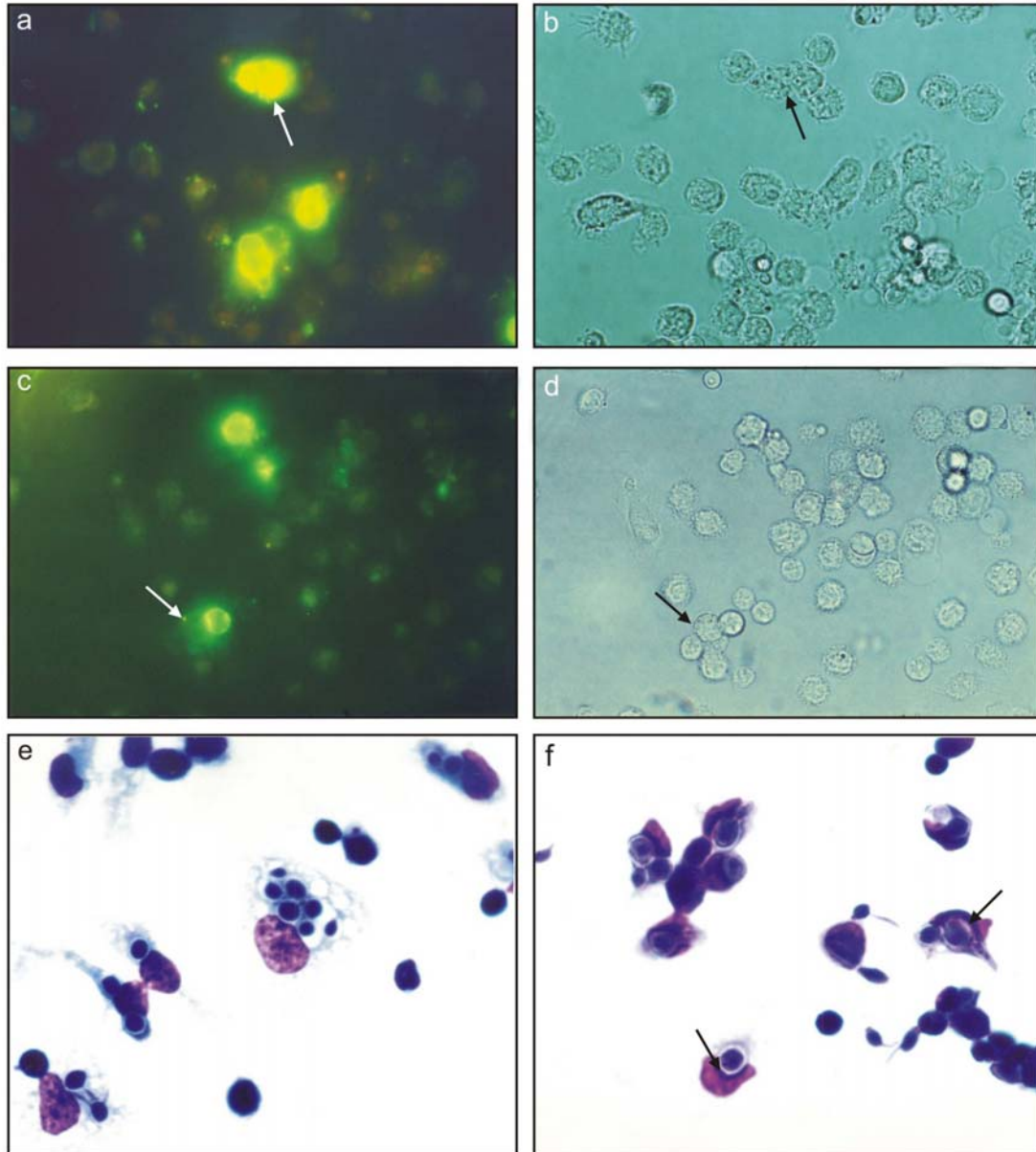
**Figura 3.** Viabilidade de *C. albicans* co-incubados com macrófagos residentes ou ativados por Con-A. Porcentagem do inóculo após 1 hora de co-incubação por macrófagos residentes ou ativados por Con-A. Dados constituem média e erro padrão de 5 experimentos \*  $P < 0,05$  comparados com macrófagos residentes.

**Tabela 1.** Porcentagem de macrófagos com condensação de cromatina nuclear.

Cepa	ConA 1h		PBS 1h	
	Sem Soro	Com Soro	Sem Soro	Com Soro
<b>CR15</b>	<b>9,62 ± 1,82</b>	<b>29,10 ± 4,64</b>	<b>6,15 ± 0,44</b>	<b>36,21 ± 1,64</b>
<b>577</b>	<b>2,59 ± 0,41</b>	<b>3,19 ± 0,69</b>	<b>5,22 ± 0,89</b>	<b>5,47 ± 1,26</b>
<b>CR1</b>	<b>7,47 ± 0,48</b>	<b>31,73 ± 5,54</b>	<b>3,20 ± 0,32</b>	<b>29,76 ± 3,85</b>

A porcentagem de macrófagos apoptóticos foi determinada 1 hora após infecção com *C. albicans* e os valores são média ± erro padrão para 5 experimentos.





**Figura 4.** Exposição de fosfatidilserina e condensação de cromatina de macrófagos após infecção com CR15.

Monocamadas de macrófagos foram incubadas com CR15 1:5 por 1 hora a 37 °C e marcados com Anexina V-FITC. Macrófagos de camundongos pré - tratados com Con-A (a); campo claro do mesmo campo de a (b); macrófagos de camundongos pré-tratados com PBS (c); campo claro do mesmo campo de c (d). As setas indicam *C. albicans* fagocitadas. Coloração de May-Grunwald-Giemsa de ensaio fagocítico com CR15 macrófagos ativados com Con-A (e); macrófagos residentes(f). As setas indicam condensação de cromatina nuclear.

## **Apoptosis of Resident and Concanavalin A-activated Macrophages after Phagocytosis of *Candida albicans***

Eliana de Vito<sup>1</sup>, Ivete Conchon-Costa<sup>1</sup>, Luis Carlos Jabur Gaziri<sup>2</sup>, Ionice Felipe<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; <sup>2</sup> Department of Physiological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Correspondence: Ionice Felipe e-mail [ionice@uel.br](mailto:ionice@uel.br)

### **Abstract**

In this study we evaluated the interactions between *C. albicans* and either resident or Concanavalin A-activated macrophages, focusing on the ability of that pathogen to induce macrophage apoptosis and on the differential response of those macrophages to ingest and kill different strains of *C. albicans*. Monolayers of peritoneal murine macrophages were co-incubated with strains CR1 or CR15, both isolated from HIV infected individuals, or with control strain 577, for 1 h at 37°C. Resident macrophages had a low potential to ingest all strains tested, and although the addition of serum increased significantly the percentage of phagocytosing macrophages, their potential to kill the pathogen was maintained low and presented no significant differences concerning the strain of *Candida* phagocytosed. The percentage of macrophages presenting nuclear condensations increased significantly after internalization of *C. albicans* via complement receptors, and several of those macrophages bound annexin V-FITC, which suggests that ingestion of *Candida* is required to trigger apoptosis. This was observed after phagocytosis of strains CR1 and CR15, but not after phagocytosis of strain 577. The ability of Con A-activated macrophages to ingest and kill strains CR1 and CR15 was significantly greater than that of resident macrophages, but not enough to prevent apoptosis of some macrophages. Since the population of macrophages is heterogeneous, containing both small and large cells, it is possible that the larger ones expressing more mannose receptors are more able to kill that pathogen, whereas the smaller ones could be better hosts for induction of apoptosis, survival and replication of *Candida* on their inside.

**Keywords:** apoptosis, macrophages, *Candida albicans*, phagocytosis

## Introduction

*C. albicans* can cause grave infections in patients who are immunocompromised by disease, by more frequent use of surgery, or by immunosuppressive therapy (Rantala et al., 1993; Jarvis, 1995). The high levels of morbidity and mortality resulting from those infections in hospitalized patients show that *C. albicans* became a prominent human pathogen (Pfaller, 1996). Research is currently under way to identify the virulence attributes of *C. albicans* that explain its success as a human pathogen.

Although the host immune system is the major factor balancing the transition from commensalism to pathogenicity, several virulence attributes expressed by *C. albicans*, such as adhesion factors, phenotypic switching, dimorphic behavior, and secretion of hydrolytic enzymes (Fallow et al., 1997; Vargas et al., 2000; Calderone & Fonzi, 2001; Naglik et al., 2003; Romani et al., 2003; Consolaro et al., 2005), might contribute to the persistence of colonization as well as the development of symptomatic episodes.

Microorganism-macrophage interactions play a central role in the pathogenesis of many infections, which might result in a breakdown of the balance between survival and pro-apoptotic cellular pathways, eventually leading to macrophage cell death (Zychlinsky et al., 1992; Rodrigues et al., 1999). It has previously been shown that *C. albicans* CR1 has the capacity to induce macrophage apoptosis to elude innate immune responses for its own benefit (Panagio et al., 2002; Gasparoto et al., 2004). Infection of mice with *C. albicans* CR1 induced apoptosis of macrophages and secretion of IL-10, which modulated an anti-inflammatory pattern of immune response (Gasparoto et al., 2004).

Mice infected with a highly virulent strain of *C. albicans* (CR15), isolated from a HIV-infected individual, presented a differential immune response which depended on the functional state of macrophages, so that activated macrophages from mice treated with Con-A produced TNF- $\alpha$  and contained the transition of yeast to filamentous forms, whereas macrophages from control mice did not make it (Conchon-Costa et al., 2007). Both resident and activated macrophages presented alterations characteristic of apoptosis after phagocytosing strain CR15, which seemed to contradict our previous observation that activated macrophages are better endowed to contain the transition from yeast to the more aggressive filamentous forms. This possible contradiction prompted the present study, in which we investigated interactions between *C. albicans* CR15 and resident or activated-macrophages, concerning the induction of apoptosis, phagocytic capability of macrophages, and resistance of *Candida* to its intracellular killing.

## Materials and methods

### Source of *C. albicans* isolates

The *C. albicans* isolates CR1 and CR15 used in this study were from our strain collection recovered from the oral mucosa from HIV-infected patients at the Dentistry School and at the University Hospital, and maintained on Sabouraud dextrose agar covered with mineral oil. After growth in Sabouraud dextrose broth, the isolates were used after two serial animal passages. *C. albicans* 577, isolated from the skin of a patient with mucocutaneous candidiasis was used as a negative control.

### *Microorganisms and cultivation*

The fungi were maintained at room temperature on Sabouraud dextrose agar; fungal cells were obtained by growth in Sabouraud dextrose broth (Difco) for 24h at 28°C. The blastoconidia were harvested by centrifugation (2000g, 6min), washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and re-suspended at  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) inactivated by heating.

The blastoconidia were opsonized for 5 min at 37°C in RPMI 1640 containing fresh non-immune mouse serum (2.5%), and then immediately co-incubated with the macrophages.

### *Macrophages and phagocytosis assays*

Groups of 6 to 8 male Swiss mice, each weighing 28-32 g, received 250 µg Concanavalin-A ml<sup>-1</sup>PBS intraperitoneally (i.p.) or PBS only. After 3 days the mice were sacrificed and exudates cells were collected by rinsing the peritoneal cavity with 3 ml of RPMI 1640 medium containing 5% FCS and counted in a haemocytometer. The cells were diluted  $4 \times 10^5$  cells/ml and incubated on coverslips for 1 h at 37°C to allow adherence of phagocytic cells onto the glass surface.

Monolayers of normal or activated peritoneal macrophages were co-incubated for 1 h at 37 °C with *C. albicans* CR1, CR15 and 577, either unopsonized or opsonized, in a ratio of 1:5. A total of 200 macrophages were analysed for each preparation, and the percentage of phagocytosing macrophages was determined after staining the cells with May-Grumwald-Giemsa. Microscopic detection of apoptosis (McCarthy & Evan, 1998) was evaluated by identification of cells bearing condensed and distorted nuclei.

### Determination of *C. albicans* killing by macrophages

Exudate peritoneal cells  $4 \times 10^5$  were plated (0.2ml/well) in 6 well plates (Corning Costar, New York, NY, USA) for 1 h at 37 °C and co-incubated with  $2 \times 10^6$  blastoconidia, either unopsonized or opsonized as described above, in RPMI supplemented with 5% FCS for 1 h at 37 °C. Sterile ice-cold twice distilled water (1ml) was added to the wells for 10 min. *Candida* cells were removed by vigorous pipetting, and serial 10-fold dilutions from each well were made in PBS. Aliquots (100 $\mu$ l) were plated on Sabouraud dextrose agar and the number of colony forming units (CFU) was determined after incubation for 48 h at 37°C. Control cultures consisted of *C. albicans* cells incubated in absence of added macrophages. The results represent the average of five independent experiments and two replicates for each preparation

### **Apoptosis assays**

Macrophages were co-incubated with opsonized *C. albicans* (5 yeast/macrophages) in RPMI medium containing FCS for 1h at 37°C, rinsed three times with RPMI medium and immediately washed in buffer and submitted to TACS Annexin V-FITC kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for detection of apoptosis. The cells were stained with propidium iodide and propidium iodide plus 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) (Sigma) to evaluate presence of necrotic and viable cells. All tests using fluorescent stain were observed in a fluorescence microscope (Zeiss) and photographed (Blue-violet irradiation, heat filter, BG-38 and BG-12 excitation filters and 530-barrier filter).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out by ANOVA; the Tukey test was applied to assess the difference between the means (at 5%).

## Results

### Morphologic differences among *C. albicans* isolates

Optical microscopy shows consistent differences in the coarse morphology of the isolates employed in this study. Blastoconidia of *C. albicans* 577 are oval, those of *C. albicans* CR1 are spherical and small, whereas those of *C. albicans* CR15 look like a grain of grape and are about twice as large as CR1 (Fig. 1).

### Apoptosis of macrophages induced by *C. albicans* isolates from HIV-infected patients

*C. albicans* CR1 and CR15 induced condensation of nuclei in both normal and activated macrophages. Opsonization significantly increased the percentage of apoptotic macrophages (Table 1). Strain 577 was used as a control because we previously observed that it did not induce apoptosis (Panagio et al., 2002; Gasparoto et al., 2004). Exposure of phosphatidylserine was observed both in macrophages from control mice and in macrophages from mice pre-treated with Con-A (Fig 2A and 2C). Pre-incubation of *C. albicans* with pepstatin abolished the process of apoptosis (micrographs not shown).

### Effect of Con-A on the phagocytosis and killing of *C. albicans*

The percentage of macrophages phagocytosing *C. albicans* CR1, CR15, and 577 in absence of serum was significantly increased by pre-treatment of mice for 3 days with Con-A (Fig. 3). Opsonization with normal mouse serum increased the internalization of *C. albicans* CR1, CR15 and 577, both by normal peritoneal macrophages and by Con-A activated macrophages (Fig 3).

Treatment of mice with Con-A enhanced the candidacidal potential of macrophages. The three isolates employed were significantly more killed by Con A-activated macrophages than by macrophages from mice treated with PBS, either in presence or absence of added normal mouse serum (Fig 4).

## Discussion

This investigation evaluated interactions between *C. albicans* and either resident or Con-A activated macrophages, concerning the ability of *C. albicans* to induce apoptosis of macrophages, and the ability of macrophages to ingest and kill this pathogen.

Chromatin condensation observed in macrophages infected in vivo with CR15 was also verified in vitro, and the apoptotic process was confirmed by binding of annexin V-FITC to both resident and Con-A activated macrophages (Fig 2A, 2C). Only macrophages that internalized *Candida*

underwent apoptosis (Fig 2B, 2D). Contrariwise, macrophages that presented yeast adhered onto their surfaces, but no internalized yeast cells, did not show signs of apoptosis. Previous studies suggested that secretion of proteinases by *C. albicans* correlated with induction of programmed cell death (Panagio et al., 2002; Gasparoto et al., 2004), and in this investigation we observed that strains CR1 and CR15 inactivated by heating or pre-incubated with pepstatin (an inhibitor of proteinases) were unable to induce apoptosis of macrophages *in vivo* and *in vitro*. In agreement with these results, *C. albicans* aspartyl proteinases Sap4-Sap6 were expressed in murine macrophages (Borg-Von Zapelin et al., 1998), their expression is regulated during *C. albicans* dimorphic transition (Naglik et al., 2003), and SAPs expression was also detected during hypha differentiation *in vitro* (Tavanti et al., 2006). Since the first signs of apoptosis are already identifiable five minutes after macrophages ingest *C. albicans* (Panagio et al., 2002), whereas budding and formation of hypha occur only some 30 min to 2 h afterwards, production of SAPs might be a primary mechanism by which *C. albicans* induces macrophages apoptosis, and thereby curtail the organisms first line of defence.

Resident macrophages had a low potential to ingest all strains tested and, although the addition of serum increased significantly the percentage of phagocytosing macrophages, their potential to kill the pathogen was about the same towards the three strains tested. Whereas about 75% of an inoculum of *Candida* co-incubated with resident macrophages were viable after one hour, only about 25% were viable after co-incubation with Con-A activated macrophages (Fig. 4). Macrophages from mice pretreated with Con-A for 3 days presented higher activity of mannose receptors and greater potential to kill *C. albicans* strain 577 in comparison to resident macrophages (Moresco et al., 2002; Loyola et al., 2002), and in this work we verified that their ability to phagocytose and kill strains CR1 and CR15 was also significantly increased, although some of those macrophages underwent apoptosis. Since the population of macrophages obtained from mice treated with Con A is heterogeneous, containing both large and small cells, we suggest that the larger ones expressing more mannose receptors are better endowed to kill ingested *Candida*, whereas the cytoplasm of the smaller ones provides a better environment for the transition of the yeast to the more aggressive hypha form.

### **Acknowledgements**

This work was funded by CNPq, CAPES, and Fundação Araucária.

## References

- Borg-Von Zepellin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D & Monod M (1998) The expression of secreted aspartyl proteinases Sap4 to sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* 28: 543-554.
- Calderone RA & Fonzi WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 327-335.
- Conchon-Costa I, Loyola W, Gaziri LCJ, Custódio LA & Felipe I (2007). Low dose of concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 330-336.
- Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta RM & Svidzinski TIE. (2005). Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 159: 501-507.
- Davis LG, Kuehl WM, Battey JF (1994). Basic methods in Molecular biology pp16-21 Appleton and Lange, Norwalk, CT.
- De Andrade GM & Felipe I (1992). Evidence for the participation of proteinases released by *Candida albicans* in the early killing of peritoneal macrophages *in vitro*. *Braz J Med Biol Res* 25:167-174.
- Fallow K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E & Tamburini P (1997). Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* 65:551-556.
- Felipe I, Bim S & Somensi CC (1995) Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin-A or jacalin. *Braz J Med Biol Res* 28:477-483.
- 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 Immun Med Microbiol* 42: 219-224.
- Jarvis WR (1995) Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis* 15: 1526-1530.
- Loyola W, Gaziri DA, Gaziri LCJ & Feile I (2002). Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 33:201-208,
- Moresco TR, Gaziri LCJ, Yasumoto Y & Felipe I (2002). Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A. *Med Mycol* 40: 393-397.
- Naglik JR, Challacombe S & Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428
- Panagio LA, Felipe I, Vidotto MC & Gaziri LCJ (2002). Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. *J Med Microbiol* 51: 929-936.
- Pfaller MA (1996). Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 2: 589-594.
- Rantala A, Ninikoski J & Lehtonen OP (1993). Early *Candida* isolations in febrile patients after abdominal surgery. *Scand J Infect Dis* 25: 479-485.
- Rodrigues VS, Vidotto MC, Felipe I, Santos DS, Gaziri LCJ (1999). Apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by an avian pathogenic strain of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters* 179: 73-78.



- Romani L, Bistoni F & Puccetti P (2003). Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Immunol* 6: 338-343.
- Tavanti A, Campa D, Bertozzi A, Pardini G, Naglik JR, Barale R & Senesi S (2006). *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds displays a differential response to macrophage infection. *Microb Infect* 8: 791-800.
- Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J & Soll DR (2000). Switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-infected individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 38: 3595-3607.

### Legends

Figure 1. Morphologic appearance of *C. albicans* isolates

The isolates were grown in Sabouraud dextrose broth for 24 h at 28°C. Brightfield image from (A) strain 577, (B) strain CR1 and (C) strain CR15.

Table 1. Apoptosis of macrophages induced by *C. albicans*

The percentage of macrophage apoptosis was determined 1 h after infection with *C. albicans*. The strain 577 was used as negative control of apoptosis. Values are means±SEM for 5 experiments.

Figure 2. Exposure of phosphatidylserine after incubation of macrophages with *C. albicans* CR15

Monolayers of macrophages were co-incubated with *C. albicans* CR15 1:5 for 1 h and labeled with annexin V-FITC. (A) Macrophage from mice pretreated with PBS; (B) brightfield image from the same field as A; (C) macrophages from mice pretreated with Con-A; (D) brightfield image from the same field as C. Optic microscopy of Con-A-activated macrophages co-incubated with *C. albicans* CR15 (E) and resident macrophages (F). May-grunwald Giemsa stain. Representative results of five experiments.

Figure 3. Effect of Con-A on phagocytosis of *C. albicans*

Macrophage from mice treated with PBS or Con-A were co-incubated with unopsonized or opsonized *C. albicans* CR15, 577 and CR1 for 1 h at 37°C and the percentage of phagocytosing macrophages was determined by counting 200 macrophages. Data are means±SEM for five experiments. \*P< 0.05 compared to resident macrophages.

Figure 4. Viability of *C. albicans* co-incubated with resident or Con-A activated macrophages

Percentage of inoculum after 1h of co-incubation with resident or Con-A activated macrophages. Data are means±SEM for five experiments. \*P< 0.05 compared to resident macrophages.