

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

MARTINHO PEREIRA RIBEIRO NETO

EFEITO DE *Candida albicans* SOBRE A POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

São Luís

2017

MARTINHO PEREIRA RIBEIRO NETO

EFEITO DE *Candida albicans* SOBRE A POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Médico.

Orientador (a): Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

São Luís

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Ribeiro Neto, Martinho Pereira.

EFEITO DE Candida Albicans SOBRE A POLARIZAÇÃO DE
MACRÓFAGOS / Martinho Pereira Ribeiro Neto. - 2017.

30 f.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.
Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão,
CCBS, 2017.

1. Candida albicans. 2. Macrófagos. 3. Polarização.
I. Fernandes do Nascimento, Flávia Raquel. II. Título.

MARTINHO PEREIRA RIBEIRO NETO

EFEITO DE *Candida albicans* SOBRE A POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Medicina da Universidade Federal
do Maranhão, para obtenção do grau de
Médico.

Orientador (a): Profa. Dra. Flávia Raquel
Fernandes do Nascimento.

Aprovada em de de .

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Gonçalves Filho

Prof^a. Dr^a. Lucilene Amorim Silva

Prof^a. Dr^a. Thiare Silva Fortes Braga

São Luís

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus e aos espíritos de luz que sempre iluminaram os meus caminhos para chegar até aqui.

Agradeço ao meu avô Martinho Pereira Ribeiro e a minha avó Maria do Carmo Reis Ribeiro que são fundamentais para a construção da nossa família unida, acolhedora e batalhadora. Vocês nos deram muito mais que receberam, vocês são os meus melhores exemplos. Nada mais justo do que dizer que essa vitória é de e para vocês!

Ao meu pai, este homem fantástico que sempre esteve ao meu lado para me incentivar e me guiar pelo caminho do bem. Assim como em todos os outros momentos da minha vida, nesta reta final o senhor foi incansável em oferecer o seu melhor para me ajudar. Muito obrigado por acreditar em mim e oferecer todas as condições para que eu chegasse até aqui.

À minha mãe por ter me dado o dom da vida e cuidar dela todos os dias me colocando em suas orações. Tenho certeza que sem a sua proteção os caminhos que trilhei teriam sido mais difíceis.

À minha tia e madrinha Marilene de Fátima Reis Ribeiro por ser desde sempre a minha inspiração para a Medicina. Será uma honra para mim ser um dos seus pares. Seu choro ao telefone ao saber que eu havia conquistado uma vaga no vestibular nunca será esquecido. Muito obrigado por cuidar de mim como se eu fosse seu filho.

Ao meu tio Martinho Filho por ser esse ser humano iluminado livre de egoísmo e vaidades. Faltam palavras para eu conseguir agradecer tudo o que o senhor fez e continua fazendo por mim. Se hoje estou mais próximo de realizar o sonho de uma vida, com certeza deixaste a sua contribuição.

Ao meu tio e padrinho Frederico César por sempre apoiar as minhas decisões e me motivar a buscar o meu espaço neste mundo tão competitivo.

Ao meu irmão e padrinho Marcos Segundo que viveu comigo todos os altos e baixos desta trajetória, que é o meu melhor amigo e sempre está comigo apesar da distância e da saudade diária.

Aos meus irmãos Mariana e João Marcos por despertarem em mim pela primeira vez o amor e o cuidado responsável de irmão mais velho.

À minha madrastra Josélia Ribeiro que tem o cuidado, carinho e preocupação como se eu fosse seu filho de sangue.

Ao meu tio Cláudio por todos os bons conselhos que me deu durante a vida, por ter proporcionado a mim momentos que sempre serão lembrados com carinho.

Agradeço à orientadora e amiga Prof^a. Dr^a Flávia Nascimento por sempre ter sido tão gentil comigo. Sou muito grato por ter tido o primeiro contato com a senhora ainda no início do curso e ter a oportunidade de viver vários momentos felizes ao seu lado. Sua amizade é um bem que quero levar por toda a vida.

Ao Dr. Alberto Miranda por ser um dos melhores mestres que eu já tive. Ao longo da graduação o senhor foi um orientador, um amigo, um grande exemplo de profissional e de pessoa. Suas palavras sábias sempre serão guardadas comigo.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida e que me deram forças todas as vezes em que eu pensei em fraquejar.

Agradeço à FAPEMA pelo suporte financeiro a esta pesquisa e também ao Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, em especial, Dimitrius Garbis e Thiare Fortes pelo auxílio na obtenção e discussão dos dados.

Por fim, meu agradecimento à Universidade Federal do Maranhão e todo seu corpo docente por ter permitido que eu me tornasse o profissional que sou hoje.

RESUMO

Candidíase refere-se a uma gama de infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, podendo ser agudas ou crônicas, localizadas ou sistêmicas. Candidíases disseminadas são ameaçadoras à vida. A grande maioria das candidíases é causada por *Candida albicans*, que é um organismo comensal comum na cavidade orofaríngea, no trato gastrintestinal e na vagina humana, que pode causar uma infecção oportunista quando há disfunção da flora normal, quebra na barreira mucocutânea ou na resposta imunológica do hospedeiro.

Macrófagos são células importantes na produção da resposta imune inata do hospedeiro frente a uma infecção fúngica. Experimentalmente é possível promover a polarização de macrófagos para os perfis M1 (inflamatório) e M2 (anti-inflamatório). A polarização de macrófagos é mensurada pela sua produção de óxido nítrico (NO) e citocinas, importantes moduladores da sua atividade microbicida.

Este projeto tem como objetivo avaliar o efeito de *Candida Albicans* sobre a polarização de macrófagos. Com esta finalidade, foram utilizados camundongos que foram submetidos aos experimentos. A polarização ao perfil M1 foi induzida com lipopolissacarídeos (LPS) e interferon-gamma (IFN- γ), já ao perfil M2 foi com interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13). Às duas preparações foi adicionada *Candida albicans*. Macrófagos não estimulados também foram avaliados frente ao fungo.

Candida albicans não consegue por si só induzir a polarização de macrófagos, entretanto quando estes são estimulados para os perfis M1 ou M2, ela consegue limitar esta polarização diminuindo a produção de NO e de citocinas.

Palavras-chave: *Candida albicans*; macrófagos; polarização

ABSTRACT

Candidiasis refers to the range of infections caused by species of the fungal genus *Candida*; these infections can be acute or chronic, localized or systemic. Disseminated candidiasis is life threatening. The great majority of candidiasis is caused by *Candida albicans*. *C. albicans* is a common commensal organism in the oropharyngeal cavity, gastrointestinal tract, and vagina of humans but is capable of causing opportunistic infection following disruption of the normal flora, a breach of the mucocutaneous barrier, or a defect in host cellular immunity.

Macrophages are important in producing the innate immune response of the host to a fungal infection. Experimentally it is possible to promote the polarization of macrophages to the profiles M1 (inflammatory) and M2 (anti-inflammatory). Macrophage polarization is measured by its production of nitric oxide and cytokines, important modulators of its microbicidal activity.

This project aims to evaluate the effect of *Candida albicans* on macrophage polarization. For this purpose, mice that were submitted to the experiments were used. The polarization to the M1 profile was induced with lipopolysaccharides (LPS) and interferon-gamma (IFN- γ), whereas the M2 profile was interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13). *Candida albicans* were added to the two preparations. Unstimulated macrophages were also oriented against the fungus.

Candida albicans can not by itself induce macrophage polarization, however when these are stimulated for the M1 or M2 profiles, it is able to limit this polarization by decreasing NO and cytokine production

Key-words: *Candida albicans*; macrophages; polarization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Candidíase e Candida Albicans	8
1.2. Resposta imune a Candida	9
1.3 Macrófagos	11
1.4 Polarização de macrófagos.....	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Candida albicans.....	17
3.2 Animais	17
3.3 Obtenção, cultura e polarização dos macrófagos peritoneais.....	17
3.4 Determinação da concentração de citocinas por CBA.....	18
3.5 Determinação da produção de óxido nítrico.....	18
3.6 Análise estatística	18
4 RESULTADOS	19
5 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÃO.....	25
7 REFERÊNCIAS.....	26
ANEXO.....	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 Candidíase e *Candida albicans*

Candidíase refere-se a uma gama de infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, podendo ser agudas ou crônicas, localizadas ou sistêmicas. Candidíases disseminadas são ameaçadoras à vida. A grande maioria das candidíases é causada por *Candida albicans*, que é um organismo comensal comum na cavidade orofaríngea, no trato gastrointestinal e na vagina humana (NAGLIK, CHALLACOMB, HUBE, 2003).

As diversas espécies de *Candida* compreendem a segunda causa mais comum de infecção fúngica no mundo, produzindo às vezes uma infecção sistêmica potencialmente fatal, cuja mortalidade relatada supera 80% dos casos (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Várias destas espécies têm sido descritas, sendo que do total, apenas cinco são responsáveis por 92% dos casos de candidemia (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*). *Candida* depreende a principal causa de infecção fúngica invasiva e sua incidência supera a de aspergilose e mucormicose (GUINEA, 2014).

A parede celular é o primeiro ponto de contato entre *Candida albicans* e o sistema imune inato do hospedeiro. Esta camada é composta por hidratos de carbono e proteínas da parede celular (CWPs). Os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) constituem um importante alvo imunológico presente na parede celular do fungo, tendo papel significativo na ativação e modulação da resposta imune (GOW, VEERDONK, BROWN, NETEA, 2012). A parede celular não é uma estrutura estática, mas uma estrutura dinâmica que permite expansão e divisão celular, além de morfogênese. As condições do sistema imune do hospedeiro e os sinais enviados pela microbiota local são potentes reguladores da morfogênese fúngica (HALL, 2015).

O início de uma resposta anti-*Candida* se dá com o reconhecimento dos PAMPs pelos receptores de reconhecimento de padrões ligados à membrana (PRRs). Com a morfogênese fúngica, estes padrões moleculares associados ao patógeno podem ter sua apresentação ou estrutura modificados, o que potencialmente impacta no reconhecimento do sistema imune inato (HALL, 2015)

Com a desregulação da flora normal, da quebra da barreira mucocutânea ou de um defeito na imunidade celular do hospedeiro, *Candida albicans* é capaz de causar uma infecção oportunista grave com altas taxas de mortalidade e custos hospitalares elevados. Desta maneira, as candidíases tornam-se um desafio extremamente importante para a prática médica e saúde pública.

1.2. Resposta imune a *Candida*

As populações celulares mais importantes envolvidas na fagocitose e, conseqüentemente, na morte, de fungos patogênicos, são neutrófilos e macrófagos. A relevância de macrófagos para as respostas anti-*Candida* é demonstrada por estudos *in vivo* em que a depleção de macrófagos em camundongos, os tornam mais susceptíveis a infecção sistêmica por *Candida* (CHENG et al., 2012).

A morte de *Candida* por neutrófilos ocorre por ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que eliminam micróbios fagocitados quando os grânulos que os contêm se fundem com o fagossoma. Além das ROS, neutrófilos usam mecanismos não oxidativos para eliminar *Candida* tais como fatores antimicrobianos como lisoenzimas, lactoferrina, elastase, β -defensinas, gelatinases e catepsina G (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; MIRAMÓN et al., 2012).

As bactérias e fungos, em geral, e seus produtos são potentes ativadores de macrófagos, mas ao mesmo tempo, são exímios indutores de imunossupressão, com alta capacidade de escape. Algumas bactérias e fungos, por exemplo, possuem

diferentes mecanismos de evadir à resposta imune (SALAMA et al, 2013), o que certamente influi no fato de infecções bacterianas e fúngicas tem alta prevalência por todo o mundo (POLK, PEEK, 2010).

Os constituintes da parede celular das espécies de *Candida* podem evocar tanto a imunidade humoral quanto celular do hospedeiro durante o curso de uma infecção, tais respostas imunológicas podem ser tanto local como sistêmica (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003). A resposta imune mediada por células é extremamente importante para a defesa do hospedeiro contra este fungo, deste modo é muito prevalente a infecção entre indivíduos cujo sistema imune celular esteja prejudicado, embora o mecanismo exato de indução dessa resposta ainda não tenha sido elucidado. A interleucina (IL)-12 parece ter uma importante função no desenvolvimento de uma resposta Th1 para a *Candida albicans* no rato. A deficiência de IL-12 em ratos aumentou a susceptibilidade para infecção do trato gastrointestinal e também para reinfecção (MENCACCI et al, 1998).

A função do interferon-gama (IFN- γ) parece ser mais complexa, visto que ratos com depleção desta citocina foram mais suscetíveis à infecção por *Candida*; infecção experimental ou administração de IL-12 induziram uma resposta Th1 em ratos associada à produção de IFN-gama; a administração de IL-12 em ratos com infecção sistêmica resultou em doença letal uniformemente, enquanto que a administração conjunta de IFN- γ foi protetora em 70% dos animais. Em contraste, a depleção de IL-10 em ratos somente exibiu resistência para a infecção sistêmica, mas não para a gastrointestinal (VAZQUEZ-TORRES et al 1999).

Neutrófilos podem contribuir para a defesa do hospedeiro contra a infecção por *Candida*. Vários estudos mostraram o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) aumentou o dano mediado por neutrófilos às pseudohifas de *Candida albicans*, possivelmente em associação com IFN- γ . Um estudo encontrou uma redução do fluxo salivar, diminuição dos níveis de imunoglobulina secretória

(IgA) e atividade reduzida leucócitos polimorfonucleares salivares em pacientes com candidíase oral comparados a pacientes saudáveis (UETA et al 2000).

A função da resposta humoral na prevenção da defesa do hospedeiro contra a progressão da doença durante uma infecção por *Candida* não está clara e é controversa (CASADEVALL et al, 1998). Contudo, o desenvolvimento recente de anticorpos mono e policlonais mostraram um efeito protetor em ratos com candidíase. Esses achados sugerem que o desenvolvimento de uma vacina, ou de anticorpos protetores, em curto prazo, podem ser factíveis (GANTNER et al, 2003).

1.3 Macrófagos

No fim do século XIX, Metchnikoff ressaltou a importância de um sistema celular que ele denominou de sistema fagocítico. Este sistema era constituído por dois tipos de células fagocíticas: os macrófagos (células grandes) e os micrófagos (células pequenas, atualmente denominadas de neutrófilos ou fagócitos polimorfonucleares). A partir dos estudos de patologia comparada, Metchnikoff observou que os fagócitos eram encontrados praticamente em todos os organismos vivos e postulou haver uma relação direta entre a capacidade fagocítica e digestiva dos macrófagos e a resistência a infecções (METCHNIKOFF, 1905).

Já em 1969, Mackaness demonstrou que esta resistência requeria a participação de linfócitos, mais tarde denominados linfócitos T, que de alguma forma induziam um espriamento dos macrófagos, que passaram a ser denominados de “ativados”. Na década de 70, a ativação dos macrófagos era considerada como o aumento da capacidade microbida e tumoricida (ALEXANDER e EVANS, 1971).

Os macrófagos são extremamente plásticos, pois dependendo do microambiente tecidual, sofrem alterações morfofuncionais e recebem diferentes denominações. Num adulto, as principais populações de macrófagos são encontradas na lâmina própria do intestino delgado, fígado (células de Kupffer),

pulmões (macrófagos alveolares ou intersticiais), baço, linfonodos, medula óssea e no sistema nervoso (microglia). Também são denominados de células de Langerhans (pele), osteoclastos (ossos) e histiócitos (tecido conjuntivo). Ainda são encontrados livres em glândulas mamárias, espaços alveolares e nas cavidades pleural, peritoneal e sinovial. Além disso, macrófagos acumulados em sítios inflamatórios crônicos podem diferenciar-se em células epitelióides ou fundir-se para formar as células gigantes multinucleadas (GORDON et al., 1988).

A maioria dos macrófagos encontra-se em um estágio basal de atividade e são denominados macrófagos residentes. No entanto, macrófagos obtidos de sítios inflamatórios ou infecciosos apresentam alterações morfofuncionais típicas de um estado ativado. A principal característica deste estado é o aumento nas funções fagocítica, microbicida e citotóxica ou tumoricida. A ativação dos macrófagos ocorre em diversos estágios, e cada estágio possui características próprias. Esta ativação é regulada por uma série de sinais extracelulares, e durante este processo as células sofrem alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais. Várias são as condições nas quais o macrófago torna-se ativado; entre as quais se incluem as infecções causadas por *Mycobacterium* sp (DRATH, 1985) ou *Trypanosoma cruzi* (RUSSO, STAROBINAS, 1991). A ativação de macrófagos pode também ser observada após a administração local ou sistêmica de microrganismos mortos ou suas frações, tal como lipopolissacarídeos (LPS) (RABINOVITCH et al., 1977), a administração intraperitoneal de agentes irritantes, bem como pelas citocinas secretadas por linfócitos ativados ou pelos próprios macrófagos (DING et al., 1988).

Macrófagos ativados classicamente em resposta a produtos microbianos, como por exemplo, o LPS, ou IFN- γ são denominados M1 e caracterizados pela alta capacidade de apresentação de antígenos; alta produção de citocinas inflamatórias, como por exemplo, IL-12 e IL-23 (PORTA et al., 2009; GORDON e TAYLOR, 2005) e alta capacidade citotóxica via produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (MARTINEZ et al., 2006; KOMOHARA et al., 2008). Indubitavelmente, a geração de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e outras espécies

reativas de oxigênio (ROS) pela isoforma fagocítica da NADPH oxidase é essencial à atividade antimicrobiana dos macrófagos M1.

No entanto, dados mais recentes tem proposto que a geração de ROS não é apenas determinante da capacidade antimicrobiana, mas também atuam como importantes moduladores da função destas células (TSE et al, 2010). Fontes tanto exógenas quanto endógenas de ROS estão envolvidas na determinação da produção de citocinas por células T CD4+ (KWON et al, 2010). Da mesma forma, a regulação da atividade antioxidante modifica as respostas efectoras e proliferativas de células T CD8+, reduzindo a função citolítica e a produção de citocinas (SKLAVOS et al, 2008).

A produção de NO, molécula importante nos processos de reparação tecidual e controle de infecções e tumores (HAFALLA et al, 2011; WEISSER et al, 2013), também é, por sua vez, uma característica intrínseca dos macrófagos M1 via ativação da iNOS, e pode ser controlada em parte por um grupo de enzimas que são descritas por serem importantes do curso de algumas infecções. Dentre elas, a superóxido dismutase (SOD), que faz parte de um grupo de metaloenzimas com função de proteger as células aeróbicas da ação do ânion superóxido. Essa reação de dismutação do ânion superóxido dá origem a outros compostos microbicidas como peróxido de hidrogênio (SZETO, 2006).

Em contraste, macrófagos ativados alternativamente, M2, são promovidos por diferentes sinais, IL-4, IL-10, IL-13, glicocorticóides, complexos de imunoglobulinas/Ligantes de TLR, compartilhando um fenótipo caracterizado por uma alta expressão de IL-6 e IL-10 (MANTOVANI et al., 2013; SICA et al., 2008; KOMOHARA et al., 2008, PORTA et al., 2009), além de produzirem pequenas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e grandes quantidades de IL-10, também regulam positivamente a produção de arginase I. Desta forma, um dos pontos críticos que definem a polarização destas células é a forma como metabolizam a L-arginina. Macrófagos M1 metabolizam a L-arginina pela iNOS para produzir NO, ao passo que macrófagos M2 metabolizam a L-arginina pela arginase I (argI) para produzir L-ornitina, molécula

precursora de putrescina, espermidina, espermina e L-prolina, envolvidas em processo de reparação tissular e proliferação celular (WEISSER et al, 2013).

1.4 Polarização de macrófagos

A polarização de monócitos/macrófagos vem sendo sugerida como um fator determinante no prognóstico da sepse bacteriana e fúngica. Células do tipo M1 possuem alto poder bactericida e fungicida, porém, sua ativação prolongada causa efeitos deletérios; enquanto que células M2, estão relacionadas à fase de resolução do processo inflamatório por promoverem imunossupressão (para revisão ver MANTOVANI et al., 2002; 2013).

Experimentalmente é possível induzir polarização de monócitos murinos e humanos em macrófagos M1 e M2. Weber et al (2007), usando camundongos, e Mia et al (2014), usando humanos, demonstraram que o estímulo de monócitos com IFN- γ e LPS induzem o perfil M1 e o estímulo com IL-4/IL-10/TGF- β induzem o perfil M2. Entretanto, a participação destes tipos funcionais de macrófagos nas doenças infecciosas e tumores ainda carecem de maiores estudos.

Sabe-se que a resposta imune mediada pelos macrófagos tem uma importância na resistência à infecção bacteriana e fúngica (QUIDING-JÄRBRINK et al, 2010; WILSON, CRABTREE, 2007), pois, como já há bastante tempo tem sido descrito, um dos mecanismos primordiais para o controle dos patógenos é a produção de altos níveis de óxido nítrico pela enzima iNOS do macrófago (GOBERT et al., 2002).

De fato, em 2004, Metha et al. demonstraram pela primeira vez, a existência de uma correlação entre monócitos M1 e mortalidade em babuínos, sendo que animais apresentando um perfil misto M1/M2, eram tolerantes ao choque endotóxico; enquanto que aqueles apresentando somente monócitos do tipo M1 eram susceptíveis à morte. Mais tarde, observou-se que pacientes com sepse severa apresentavam altas concentrações plasmáticas de citocinas produzidas por

macrófagos M1 (BOZZA et al., 2007). Por outro lado, o aumento de células M2 nem sempre é benéfico na sepse, uma vez que pode favorecer o aparecimento de infecções secundárias, e também de recorrência de uma infecção primária não resolvida (OPAL et al., 2010). A polarização de monócitos/macrófagos na sepse é mediada por diferentes fatores como a ativação de TLRs e a produção de citocinas (IFN γ , IL-4 e IL-13) (para revisão ver Mantovani et al., 2002; 2013). Ainda, dados recentes têm sugerido que a fagocitose de células apoptóticas (i.e.; neutrófilos) por monócitos/macrófagos na sepse, favorece o shift de M1 para M2 (KORNS et al., 2011; von KNETHEN et al., 2013). Esta alteração no perfil destas células é um evento importante para a subsequente reposição de células M2, por macrófagos reguladores (GR1+CD11b+), os quais promovem supressão de linfócitos Th1 (FULLERTON et al., 2013). No entanto, a contribuição destas células para o prognóstico da sepse ainda é um tema controverso, uma vez que depende da fase a qual a sepse é investigada (fase inicial ou tardia) e das metodologias abordadas para em seu estudo.

Sendo assim, estudar o efeito polarizador de *Candida Albicans* e investigar o efeito desta polarização sobre o desenvolvimento de infecções pode fornecer novos alvos para intervenções terapêuticas e assim, melhorar o prognóstico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito de *Candida Albicans* sobre a polarização de macrófagos

2.2 Objetivos específicos

- Investigar se *Candida albicans* induz por si só a polarização dos macrófagos.
- Investigar a capacidade de *Candida Albicans* em interferir a polarização de macrófagos para M1 ou M2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Candida albicans*

A cultura de *Candida albicans* foi mantida em meio líquido de cultura YPD (Isofar), em estufa à 37°C. Para determinar o número total de blastoconídeos, após 24 horas de cultura, 90 µL de suspensão da cultura, foram adicionados a 10 µL de cristal violeta. As cepas serão contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Devida atenção foi dada aos aspectos éticos da pesquisa. O estudo fez parte do projeto maior “Avaliação do efeito da polarização de macrófagos por agentes infecciosos, tumores e imunomoduladores naturais sobre a susceptibilidade de hospedeiros em diferentes modelos experimentais” que foi aprovado junto ao Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMA (parecer número nº 23115.003819/2016-1 (em anexo). O número de animais a serem utilizados se restringiu ao mínimo necessário para os ensaios pré-clínicos.

3.3 Obtenção, cultura e polarização dos macrófagos peritoneais

Para os ensaios, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e 5 mL de Solução Tamponada com fosfato (PBS) gelado foram injetados na cavidade peritoneal e em seguida coletados e contados. As células peritoneais (2×10^6 células/mL) foram cultivadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ em meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) por duas horas para aderência das células. Após este tempo, as não aderentes foram recolhidas e as aderentes (macrófagos) foram contadas e cultivadas em meio RPMI suplementado conforme descrito abaixo:

- Perfil M0, os macrófagos foram cultivados apenas em meio.
- Perfil M1 - os macrófagos foram cultivados em presença de Lipopolissacarídeo (LPS) (2000ng/mL) + interferon-gamma (IFN- γ) (100ng/mL) durante 24 horas.
- Perfil M2 - os macrófagos foram cultivados em presença de interleucina-4 (IL-4) (400ng/mL) + interleucina 13 (IL-13) (200ng/mL) durante 24 horas.

Concomitantemente foi acrescentado *Candida albicans* nas culturas, em uma razão de 10:1. Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado para realização das análises de citocinas e nitrito para avaliação da polarização dos macrófagos.

3.4 Determinação da concentração de citocinas por CBA

A quantificação das citocinas Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12), Interleucina-10 (IL-10), interferon-gamma (IFN- γ) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) no sobrenadantes de cultura de macrófagos foi feita por “Cytometric Bead Array” (BD Pharmingen), seguindo as recomendações do fabricante (BD Pharmingen).

3.5 Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante de culturas de macrófagos segundo descrito anteriormente por Ding et al (1988).

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Os dados foram analisados utilizando-se teste *t* de Student e foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS

Como podemos observar na figura 1, *C. albicans* não foi capaz por si só de polarizar o macrófago residente (M0). Entretanto, quando em adicionada à cultura concomitantemente aos estímulos de polarização *C. albicans* teve a capacidade de reduzir significativamente a produção de citocinas, tanto nos macrófagos polarizados para M1 quanto nos polarizados para M2.

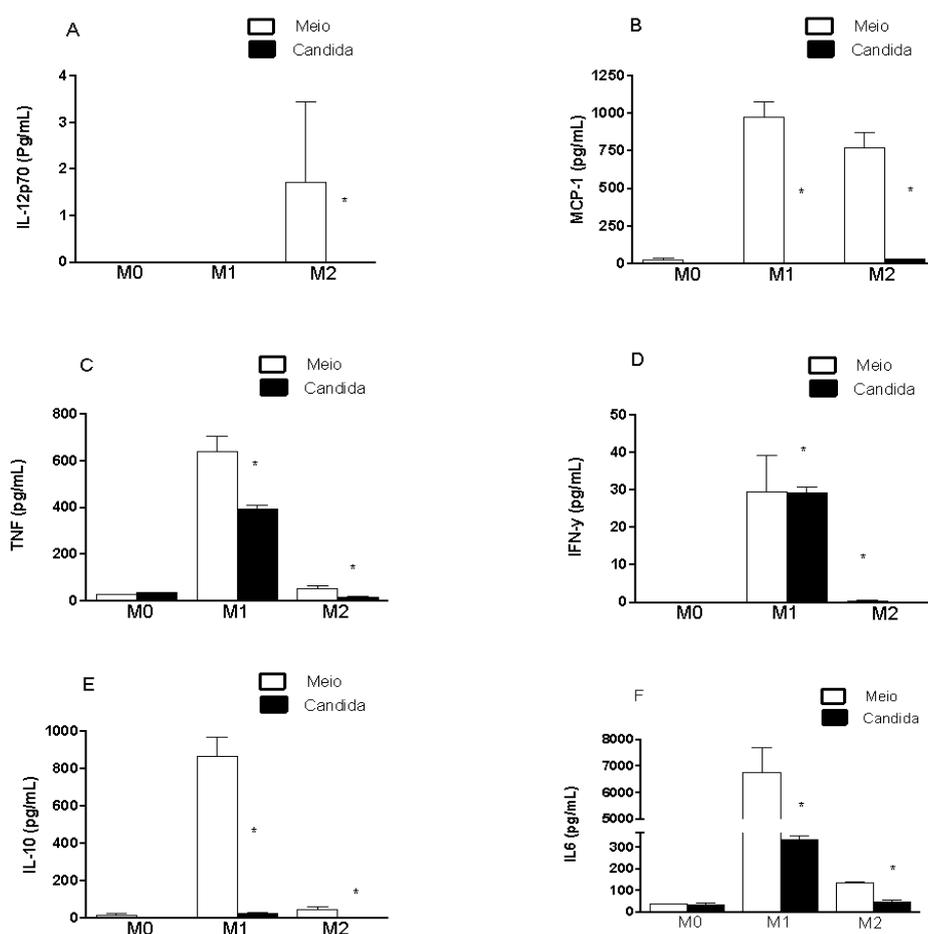


Figura 1. Efeito de *Candida albicans* sobre a produção de citocinas por macrófagos polarizados ou não. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 foram cultivados em presença de IFN- γ (10ng/mL) + LPS (200 ng/mL) (M1) ou IL-10 (40ng/mL) + IL-13 (20 ng/mL) (M2), ou apenas em meio (M0). Metade dos poços de cultura receberam concomitante *Candida albicans* na razão de 10:1. Após 24 horas, os sobrenadantes foram colhidos para dosagem das citocinas IL-12 (A), MCP-1 (B) TNF- α (C), IFN- γ (D), IL-10 (E) e IL-6 (F). As amostras foram realizadas em triplicata. * $p < 0,05$ em comparação aos macrófagos sem *Candida*.

Quanto à produção de óxido nítrico (NO), tivemos resultados semelhantes aos das citocinas. *Candida albicans* não foi capaz por si só de induzir a produção de NO pelos macrófagos não ativados. Por outro lado, quando em contato com os macrófagos polarizados, principalmente o M1, *C. albicans* teve a capacidade de quase suprimir a produção de NO.

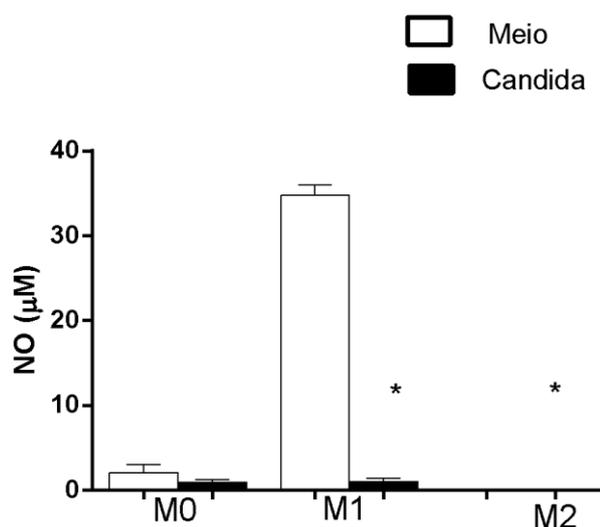


Figura 2 Efeito de *Candida albicans* sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos polarizados ou não.. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 foram cultivados em presença de IFN- γ (10ng/mL) + LPS (200 ng/mL) (M1) ou IL-10 (40ng/mL) + IL-13 (20 ng/mL) (M2), ou apenas em meio (M0). Metade dos poços de cultura receberam concomitante *Candida albicans* na razão de 10:1. Após 24 horas, os sobrenadantes foram colhidos para dosagem de nitritos. As amostras foram realizadas em triplicata. *p < 0,05 em comparação aos macrófagos sem *Candida*.

5 DISCUSSÃO

Candida albicans em condições de imunocompetência do hospedeiro consegue colonizar o corpo humano sem, necessariamente causar doenças, constituindo uma relação de comensalidade com o homem. As candidíases são relevantes clinicamente principalmente dentro de um contexto de imunossupressão. A magnitude da infecção pela *C. albicans* deve ser avaliada a partir da interação da capacidade de defesa do hospedeiro e os mecanismos de patogenicidade do fungo.

O sistema imune humano compreende uma rede complexa de mecanismos que à primeira vista se relacionam diametralmente. Entretanto, quando estudados a fundo, consegue-se notar sua complementaridade e sinergismo em busca da homeostase. O ajuste fino destes mecanismos é essencial para a resolução de um quadro infeccioso sem causar prejuízos ao próprio organismo, no qual tanto uma resposta inflamatória exacerbada é deletéria e lesiva, quanto contar apenas com o perfil anti-inflamatório pode aumentar a susceptibilidade ao agente infeccioso (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Ao passo que um patógeno tenta quebrar essa estabilidade da nossa imunidade, desenvolve-se uma resposta a essa agressão regulada pelas diversas células de defesas com apoio de seus sinalizadores moleculares para que brevemente se retorne à condição basal.

Em nosso estudo pusemos em foco os macrófagos, importantes células do sistema imune inato, e sua capacidade microbicida a partir da geração de óxido nítrico (NO) e do seu comportamento frente a *Candida albicans* quanto à polarização aos perfis M1 (resposta imune inata) e M2 (fase de resolução da inflamação). Quando estimulados para o perfil M1 (LPS + IFN- γ) e para o perfil M2 (IL-4 + IL-13) concomitante à indução pela *Candida albicans*, houve uma redução substancial da produção de óxido nítrico e das citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, IL-12, TNF- α e IFN- γ), impedindo que sua polarização acontecesse por completo. Entretanto, *C. albicans*, por si só, não foi capaz de induzir a polarização para um dos perfis. Apesar de ocorrer também com os macrófagos M2, esta depleção na produção de NO e das

citocinas é potencialmente maior no que se refere à atividade do macrófago M1, já que o último é o grande maestro da resposta anti-*Candida* neste primeiro contato com o fungo.

Estes resultados estão de acordo com Gow et al (2017) que demonstraram em seus estudos uma redução em 50% da síntese de óxido nítrico induzidos por *Candida albicans*, desviando o consumo da L-arginina pela arginase-I que teve um aumento da sua atividade em 40%. Um fato interessante foi relatado em seu estudo: houve redução da produção de NO, apesar das concentrações de iNOS terem sido aumentadas frente *C. albicans*, entretanto este aumento foi proporcionalmente menor do que da arginase-I. Em nosso projeto não mensuramos os níveis dessas enzimas, razão pela qual não podemos confirmar que este fenômeno tenha se repetido.

Na grande maioria das vezes, as alterações presentes na polarização dos macrófagos são resultantes de mudanças quantitativas na expressão de vários produtos gênicos, que permitem ao macrófago ativado a realização de algumas funções que não poderiam ser realizadas pelos macrófagos residentes (para revisão ver ADAMS e 4 HAMILTON, 1992). Macrófagos residentes e macrófagos ativados são os dois estágios extremos no processo de estimulação destas células. De um modo simplificado, pode-se dizer que os macrófagos teciduais residentes não geram radicais livres e possuem uma baixa atividade microbicida; enquanto os macrófagos ativados possuem alta atividade microbicida e tumoricida/citotóxica, secretam altas concentrações de reativos intermediários do oxigênio (ROI), nitrogênio (RNI) e citocinas (para revisão ver van FURTH, 1992). Entretanto, cada vez mais os macrófagos são reconhecidos como células heterogêneas, capazes de apresentar respostas funcionais polarizadas em relação a um estímulo inflamatório (POLLARD et al., 2004; TORROELLA-KOURI et al., 2009).

O óxido nítrico (NO) é um importante componente do sistema imune inato e pode reagir com o superóxido em peroxinitrito, um efetivo agente antimicrobiano citotóxico contra patógenos extra e intracelulares. Durante uma infecção, os

macrófagos ativados geram NO a partir de L-arginina utilizando-se da enzima iNOS. A disponibilidade de L-arginina é um fator limitante para a produção desta molécula. Entretanto, alguns microorganismos, dentre eles *Candida albicans*, fazem uso deste substrato através da enzima arginase-I passando a competir pelo mesmo. Desta maneira, a produção de NO tem uma redução significativa e, com isso, a resposta imunológica do hospedeiro deprecia-se. (WAGENER, MACCALLUM, BROWN, GOW, 2017).

Adicionalmente à produção de óxido nítrico, a resposta imune inata durante um processo inflamatório agudo é modulada a partir da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α . Os macrófagos ativados funcionam como verdadeiras células apresentadoras de antígenos e potencializam a ativação de linfócitos T desviando a produção de células T adaptativas para o perfil Th1 amplificando a resposta antifúngica (CRUVINEL et al, 2010).

Na balança de dois pratos onde o equilíbrio representa a relação da *Candida albicans* como comensal ao homem, uma desregulação do sistema imunológico ou uma alta capacidade de morfogênese do fungo podem levar a uma relação prejudicial ao ser humano. Neste estudo, a capacidade fúngica em diminuir as respostas microbicidas dos macrófagos ativados (M1) representou uma vantagem do agente infeccioso frente o hospedeiro. Em contrapartida, *C. albicans* não conseguiu induzir a polarização dos macrófagos residentes, esta seria a leitura óbvia, o que nos conduziria a pensar como uma desvantagem do fungo, mas será que ele teria mesmo a necessidade de induzir esta polarização sem sentir que o ambiente é hostil para si?

As infecções sistêmicas graves por *Candida* são potencialmente fatais, constituindo a principal infecção invasiva no mundo com altas taxas de mortalidade e custos hospitalares (GUINEA, 2014). Sendo assim, é necessário que se promovam estudos objetivando novos alvos terapêuticos. Diante da diminuição da capacidade microbicida dos macrófagos ativados, a imunoterapia com macrófagos M1 poderia contribuir para a resolução da agressão fúngica. Por outro lado, bloquear os meios

do agressor de indução de supressão das respostas do hospedeiro, como o consumo de L-arginina pela arginase-I, poderia diminuir a patogenicidade da *Candida albicans*.

Em posse destas informações podemos nos questionar se este fungo é realmente apenas “oportunista” ou se também contribui para este estado de debilidade das nossas respostas, visto que revelamos sua influência direta na diminuição da capacidade microbicida do macrófago ativado. Visualizar a *Candida albicans* a partir deste prisma no qual ela deixa de ser um agravante em um paciente imunocomprometido e passa a ser também um fator causal ativo deste enfraquecimento do sistema imune pode ser o próximo passo a ser dado pelos estudiosos do tema para que possamos diminuir os impactos que este agravo gera na saúde pública.

6 CONCLUSÕES

- *Candida albicans* não consegue induzir por si só a polarização de macrófagos.
- *Candida albicans* impede a polarização completa dos macrófagos, tanto para o perfil M1 quanto para o perfil M2, entretanto, seu efeito é mais intenso no macrófago M1.

7 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, P. & EVANS, R. Endotoxin and double stranded RNA render macrophage cytotoxicity. **Nature** (Lond.), 232: 76, 1971.

Babior, B.M. (2004) NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol.** 16 (1): 42 -7.

Bozza FA1, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro--- Faria--- Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit Care.** 2007;11(2):R49.

Casadevall A, Cassone A, Bistoni F, et al. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? **Med Mycol** 1998; 36 Suppl 1:95.

Cutler JE. *Candida albicans* antibodies and vaccine development (abstract). **ASM Conference on Candida and Candidiasis, American Society for Microbiology**, Charleston, South Carolina 1999, p. 20.

DING, A.H.; NATHAN, C.F. & STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, 141(7): 2407--- 12,1988.

DRATH, D.B. Enhanced superoxide release and tumoricidal activity by postlavage, in situ pulmonary macrophage population in response to activation by *Mycobacterium bovis* exposure. **Infect. Immun.**, 49(1): 72--- 5, 1985.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J Exp Med** 2003; 197:1107.

Gaviria JM, van Burik JA, Dale DC, et al. Modulation of neutrophil-mediated activity against the pseudohyphal form of *Candida albicans* by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administered in vivo. **J Infect Dis** 1999; 179:1301.

GUINEA, J.. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 20, p.5-10, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12539>.

Han Y, Cutler JE. Assessment of a mouse model of neutropenia and the effect of an anticandidiasis monoclonal antibody in these animals. **J Infect Dis** 1997; 175:1169.

Ji, Hai-xia et al. The Synthetic Melanocortin (CKPV)2 Exerts Anti-Fungal and Anti-Inflammatory Effects against *Candida albicans* Vaginitis via Inducing Macrophage M2

Polarization. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.1-11, 14 fev. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056004>.

Korns D, Frasch SC, Fernandez--- Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. **Front Immunol**. 2011 Nov 8;2:57.

Kwon J, Shatynski KE, Chen H, et al. The nonphagocytic NADPH oxidase Duox1 mediates a positive feedback loop during T cell receptor signaling. **Sci Signal** 2010; 3:ra59.

Lavigne LM, Schopf LR, Chung CL, et al. The role of recombinant murine IL-12 and IFN γ in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection. **J Immunol** 1998;160:284.

LEWIS, N. D.; ASIM, M.; BARRY, D. P.; SINGH, K.; DE SABLET, T.; BOUCHER, J.L.; GOBERT, A. P.; CHATURVEDI, R.; WILSON, K. T. Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. **J. Immunol**, v. 184, p. 2572–2582, 2010.

Mantovani A, Locati M. Tumor--- associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2013; 33:1478--83.

Martinez F. O., Gordon S., Locati M., and Mantovani A., Transcriptional profiling of the human monocyte to macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression, **Journal of Immunology**, vol. 177, no. 10, pp. 7303-7311, 2006.

Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev** 1998; 11:121.

Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, et al. IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. **J Immunol** 1998; 161:6228.

METCHNIKOFF, E. Immunity in infectious diseases. Cambridge. **University Press**, 1905.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev** 2003; 67:400.

OREN, I.; PAUL, M.. Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 20, p.1-4, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12642>.

POLK, D.B.; PEEK, R.M. Jr HELICOBACTER PYLORI: gastric cancer and beyond. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 6, p. 403–414, 2010.

Pollard, J.W., 2005. Tumor educatet macrophages promte tumor progression and metastasis. **Nature Review Cancer** 4, 71- 78.

Porta, C; Larghi, P; Rimoldi, M; Totaro, M.G; Allavena, P; Mantovani, A; Sica, A., 2009. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology** 214, 761--777.

QUIDING--- JARBRINK, M.; RAGHAVAN, S.; SUNDQUIST, M. Enhanced M1 macrophage polarization in human Helicobacter pylori--- associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. **PLoS One**. 5:e15018.doi:10.1371/journal.pone.0015018, 2010.

RABINOVITCH, M.; MANEJIAS, R.E.; RUSSO, M.; ABBEY, E.E. Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers. **Cell. Immunol.**, 29:86--- 95, 1977.

Roilides E, Holmes A, Blake C, et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and interferon-gamma on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against pseudohyphae of different medically important Candida species. **J Leukoc Biol** 1995; 57:651.

RUSSO, M. & STAROBINAS, N. Macrophage activation and resistance to Trypanosoma cruzi infection. **Res. Immunol.**, 142(2): 144--- 8, 1991.

SALAMA, N.R.; HARTUNG, M.L.; MULLER, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, p. 385-399, 2013.

Sklavos MM, Tse HM, Piganelli JD. Redox modulation inhibits CD8 T cell effector function. **Free Radic Biol Med** 2008; 45:1477–1486.

Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avenissian V, et al. The anti-Candida albicans vaccine composed of the recombinant N terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice. **Infect Immun** 2005; 73:6191.

Trager, W., and J. B. Jensen.1976. Human malaria parasites in continuousculture. Science193:673–675.Tse HM, Thayer TC, Steele C, et al. NADPH oxidase deficiency regulates Th lineage commitment and modulates autoimmunity. **J Immunol** 2010; 185:5247–5258.

Trager, W., and J. B. Jensen.1976. Human malaria parasites in continuousculture. Science193:673–675.Tse HM, Thayer TC, Steele C, et al. NADPH oxidase deficiency

regulates Th lineage commitment and modulates autoimmunity. **J Immunol** 2010; 185:5247–5258.

Ueta E, Tanida T, Doi S, Osaki T. Regulation of *Candida albicans* growth and adhesion by saliva. **J Lab Clin Med** 2000; 136:66.

Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Wagner RD, et al. Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. **Infect Immun** 1999; 67:670.

WAGENER, Jeanette et al. *Candida albicans* Chitin Increases Arginase-1 Activity in Human Macrophages, with an Impact on Macrophage Antimicrobial Functions. **Mbio**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-16, 24 jan. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01820-16>.

WEISSER, SB, MCLARREN KW, KURODA E, SLY LM. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages. **Basic Cell Culture Protocols** 2013; 946: 225--239.

WHIBLEY, Natasha; GAFFEN, Sarah L.. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.42-52, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.025>.

Yi Liang, Qi Liu, Marlene S. Orandle, Sara Sadiq--- Ali, Sherry M. Koontz, Uimook Choi, Fernando J. Torres--- Velez, Sharon H. Jackson. p47phox directs murine macrophage cell fate decisions. **Amer J Pathology**, 2012. Vol. 180, Issue 3, Pages 1049--- 1058

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do efeito da polarização de macrófagos por agentes infecciosos, tumores e imunomoduladores naturais sobre a susceptibilidade de hospedeiros em diferentes modelos experimentais**" registrada com o nº 23115.003819/2016-11, sob a responsabilidade de Flávia Raquel Fernandes do Nascimento que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 07/06/2016.

FINALIDADE	()ENSINO(X)PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	4 ANOS
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> (camundongo) / Balb/c C57Bl/6 e Swiss
Nº de animais	600
Peso/Idade	20-30g / 3-4 meses
Sexo	Machos / fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Lucilene Amorim Silva

Profª. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA