



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Ação da β -1,3 glucana no sistema imune de camundongos com
sepsse por *Candida albicans*.**

KARINA MENDES MELCHUNA

ORIENTADORA: VALÉRIA SORAYA DE FARIAS SALES

CO-ORIENTADOR: GUILHERME MARANHÃO CHAVES

NATAL
2012

KARINA MENDES MELCHUNA

KARINA MENDES MELCHUNA

Ação da β -1,3 glucana no sistema imune de camundongos com sepsis por *Candida albicans*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de Concentração Bioanálises e Medicamento.

NATAL
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Candidata: Karina Mendes Melchuna

Título da Tese: Ação da β -1,3 glucana no sistema imune de camundongos com sepse por *Candida albicans*.

Orientadora: Prof^a Dr^a Valéria Soraya de Farias Sales

A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a /..... /....., considerou

() **Aprovada**

() **Reprovada**

Examinador(a):

Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

Examinador(a):

Assinatura _____

Nome _____

Instituição: _____

Presidente(a):

Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

KARINA MENDES MELCHUNA

A busca

A Ciência transformou
O pensamento humano
Não haveria mais mortes
E, as bruxas, alguém queimando.

Filosofia foi o início
Galileu disse: “Ela gira”
A Física contribuiu
para o surgimento da rosa

A terra continua a girar
Os cientistas buscam comprovar
os benefícios da glucana
para a saúde melhorar

A glucana, a rosa
o genoma, o Big Bang
Senhores, aonde chegaremos!?
Espero que no reino do bem.

Leidivânia Mendes de Araújo Melchuna

Homenagem à minha filha Karina Mendes

Melchuna (28 de dezembro de 2008)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Wagner Lima Melchuna e Leividânia Mendes de Araújo Melchuna,
por sempre acreditarem nos meus sonhos e me proporcionarem todo o alicerce para
a vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela formação concedida ao longo da Graduação e Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ao corpo docente pelos ensinamentos transmitidos.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo durante a realização deste curso.

À Prof^a. Dr^a. Valéria Soraya de Farias Sales, pela orientação, dedicação, amizade e por acreditar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves, pela co-orientação e total apoio na realização do estudo da micologia clínica.

À Prof^a. Dr^a. Janeusa Trindade de Souto e sua aluna de mestrado Hylarina pela colaboração para realização dos ensaios imunológicos.

À Prof. Francisco Pignataro, pela colaboração no estudo histopatológico.

À Prof^a. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos por ter oferecido toda a disponibilidade de seu laboratório em Araraquara para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior, pelo apoio e sugestões.

À Prof^a. Dr^a. Paula Machado pelo apoio, incentivo e sugestões.

À Prof^a. Dr^a. Telma Maria Araújo Moura Lemos, Chefe do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN, pelo apoio na realização deste trabalho.

Às amigas do Mestrado: Aleida Maria da Silva Lima, Mariana Araújo Paulo de Medeiro, Rafaela de Melo Pereira, Sarah Dantas Viana Medeiros pelo convívio e constante troca de experiências.

KARINA MENDES MELCHUNA

À técnica do laboratório de Imunologia Clínica, Luanda Canário, pela total colaboração e paciência durante a realização dos experimentos.

À minha família, pelo apoio incondicional, em especial as minhas irmãs Aline Mendes Melchuna e Luísa Mendes Melchuna, minhas avós Maria Lêda Mendes e Maria Josefina *in memoriam* e minhas tias Lindalva Melchuna Madruga e Olívia Paula Mendes de Oliveira.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Maria Aureliana Nascimento Bezerra e Fábica Cristina Miranda de Araújo Freire, pelo apoio.

Às bolsista de iniciação científica Brunna Almeida e Mariana Araújo, pela amizade e colaboração.

Ao meu namorado Angelo Galvão de Sá, por todo o amor, cuidado, paciência dedicação e auxílio.

Aos meus amigos pessoais que me acompanham e tornam a vida mais agradável.

À todos que fazem parte do Laboratório de Imunologia Clínica (UFRN), Laboratório de Micologia Médica e Molecular (UFRN), pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Ao estatístico Felipe Henrique, pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Aos camundongos que doaram a vida pela ciência.

RESUMO

A frequência de candidíase invasiva causada por leveduras tem aumentado nas unidades de terapia intensiva. Apesar dos importantes avanços no desenvolvimento de agentes antifúngicos, a sepse por *Candida ssp* tem inaceitável atribuição a mortalidade de 40-50% de pessoas. Existe a necessidade de se identificar novos agentes terapêuticos que auxiliem no tratamento e prevenção dessa infecção. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a β -1,3 glucana particulada, extraída do *Saccharomyces cerevisiae*, seria capaz de modificar a evolução da infecção sistêmica por *Candida albicans* em modelo experimental. Camundongos Balb/c submetidos à sepse e tratados ou não com β -1,3 glucana particulada foram avaliados com relação ao tempo de sobrevivência, quantificação das unidades formadoras de colônia nos rins, dosagem de uréia e TNF séricos e análise histopatológica renal para avaliação de infiltrado inflamatório e presença do fungo no tecido renal. Os resultados mostraram que os animais infectados por *Candida albicans* e tratados com glucana apresentaram uma maior sobrevivência ($p < 0,05$), uma menor quantidade de unidades formadoras de colônia nos rins e valores de uréia normais. Na análise dos resultados da histopatologia foi observado um maior dano no tecido renal dos animais pertencentes ao grupo não tratado com glucana, diferentemente do observado nos animais tratados pela glucana os quais apresentaram pequeno dano renal. Assim, podemos concluir que a glucana foi capaz de estimular o sistema imune na defesa contra infecção disseminada por *C. albicans*.

Palavras-chaves: β -1,3 glucana, imunomodulação, sepse, *Candida albicans*

ABSTRACT

The frequency of disseminated candidiasis caused by yeast has enhancing in intensive care unit. Despite the availability of new antifungal drugs, *C. albicans* sepsis mortality causes can be as high as 30-40%. So, it has been needed to looking for a new therapeutic medicament that helps in treatment and prevention of this infection. Previous data that demonstrated that particulated β -glucan stimulates the immune system and experiments of this work were conducted to investigating if β -glucan extracted from *Saccharomices cerevisiae*, could modified the evolution of mouse model *C. albicans* systemic infection. Balb/c mice with sepsis and β -1,3 glucan treated or not were analyzed the influence of β -1,3 glucan in survival of the animals, in the fungal burdens in kidney, in the production of urea and TNF even in the histopathology of kidney. The experiments shown that the infected animals and glucan treated had great survival ($p < 0,05$), less unit form colony in kidney and normal levels of urea. In the kidney histopathology of not glucan treated animals it has seen more lesions when compared with treated animals. So we conclude that β -1,3 glucan could stimulate the immune system against disseminated *C. albicans*.

Key-word: β -1,3 glucan, immunomodulation, sepsis, *Candida albicans*.

LISTA DE ABREVIATURAS

PAMP - Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrão

TLRs - Receptores semelhantes à Toll

CR3 - Receptor do complemento 3

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

IL - Interleucina

Ig - Imunoglobulina

YE - Extrato de leveduras

SAB - Ágar Sabouraud

NaCl - Cloreto de Sódio

NK - Células natural *killer*

COX - Ciclooxigenase

MG - Micropartículas de β -1,3 glucana extraídas de *Saccharomyces cerevisiae*

MR - Receptor de manose

UNESP - Universidade Estadual Paulista

UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

CEUA - Comissão De Ética No Uso De Animais

IFN- γ - Interferon Gamma

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura da β -glucana, composta por uma cadeia principal formada por ligações β -1,3 glicosídicas, contendo ramificações β -1,6. Fonte: Adaptado de <http://www.aureo.co.jp/english/glucan/glucan4.html>

TABELA 1: Grupos do experimento e número de animais que receberam o inóculo de 5×10^7 /ml células de *C. albicans* ou 5×10^8 /ml células de *C. albicans*.

FIGURA 2: β -1,3 glucana insolúvel extraída a partir do fermento Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*)

FIGURA 3: Esquema de administração da glucana

FIGURA 4: Imagem das placa de Petri contendo as u.f.c. em diferentes diluições do macerado renal.

FIGURA 5: Sobrevida dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo submetido à sepse com 5×10^8 /ml células de *C. albicans* sem tratamento (G1) e submetido à sepse com 5×10^8 /ml células de *C. albicans* e tratado com glucana (G2). Os animais foram observados durante 15 dias.

FIGURA 6: Número de u.f.c. de *C. albicans* encontradas nos rins dos animais pertencentes ao grupo submetido à sepse com 5×10^7 /ml de *C. albicans* e sem tratamento (G1) e submetido à sepse com 5×10^7 /ml de *C. albicans* com tratamento (G2). Para linearização dos resultados foi utilizado o logaritmo na base 10.

FIGURA 7: Representação gráfica dos valores de TNF- α obtidos através de análise por ELISA nos soros nos animais do grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1) e o que recebeu o inóculo de *C. albicans* e foi tratado com glucana (G2)

FIGURA 8: Concentração de uréia em mg/dL dos animais pertencentes ao grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1), e o que foi tratado com glucana (G2) e Grupo Controle.

*Comparação do G1 com o G2 onde $p < 0,05$.

FIGURA 9: Fotografia do corte histológico renal em coloração de hematoxilina-eosina, representativa do grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1), realizada no aumento de 100 no microscópio óptico, mostrando infiltrados inflamatórios, áreas de necrose e elementos de *C. albicans*.

FIGURA 10: Fotografia do corte histológico renal em coloração com ácido periódico-Schiff (PAS), representativa do grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1), realizada no aumento de 200 no microscópio óptico, mostrando áreas de necrose e elementos de *C. albicans*.

FIGURA 11: Fotografia do corte histológico renal em coloração de hematoxilina-eosina, representativa do grupo recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de células de *C. albicans* e foi tratado com glucana (G2), realizada no aumento de 200 no microscópio óptico, apresentando um único micro abscesso na região medular e elementos de *C. albicans*.

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1 β -GLUCANA.....	15
1.2 <i>Candida albicans</i> : BIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS.....	17
1.3 IMUNIDADE AO FUNGO <i>C. albicans</i>	18
1.4 CANDIDÍASE SISTÊMICA.....	19
1.4.1 Ações da Glucana contra <i>C. albicans</i>.....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 METODOLOGIA.....	22
3.1 ANIMAIS.....	22
3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO.....	23
3.3 OBTENÇÃO DA β -1,3 GLUCANA.....	23
3.4 ADMINISTRAÇÃO DA GLUCANA.....	24
3.5 SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS INFECTADOS COM <i>C. albicans</i>	24
3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (U.F.C.) NOS TECIDOS.....	25
3.7 DOSAGEM DE TNF- α	25
3.7.1 Obtenção de soro.....	25
3.7.2 Quantificação do TNF-α.....	26
3.8 DOSAGEM BIOQUÍMICA DA URÉIA.....	26

3.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	26
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 SOBREVIDA DOS ANIMAIS INFECTADOS COM <i>C.albicans</i> :.....	28
4.2 AVALIAÇÃO DO GRAU DE DISSEMINAÇÃO DA INFECÇÃO	29
4.2.1 Quantificação das u.f.c. nos rins.....	29
4.2.2 Quantificação de TNF-α.....	31
4.2.3 Análise da Uréia Sanguínea.....	32
4.2.4 Análise Histopatológica.....	34
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXO I.....	45

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

1.1 β - GLUCANA:

A β -glucana é um polissacarídeo composto por uma cadeia principal formada por ligações β -1,3 glicosídicas, podendo conter ramificações β -1,6 e β -1,4 (PETTOLINO, 2009). Grande quantidade desse polissacarídeo aparece naturalmente em cogumelos comestíveis como também em uma variedade de plantas, cereais, cevadas e algas. Além desses, é encontrada na parede celular de patógenos, como *Pneumocystis jiroveci*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans* e nos fungos não comumente patogênicos como, por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja parede celular é composta por três camadas (camada interna composta por 30-35% de β -glucana insolúvel, a camada média contendo 20-22% de β -glucana solúvel e a camada externa contendo glicoproteínas) (BROWN, 2006; DALIA et. al., 2007;

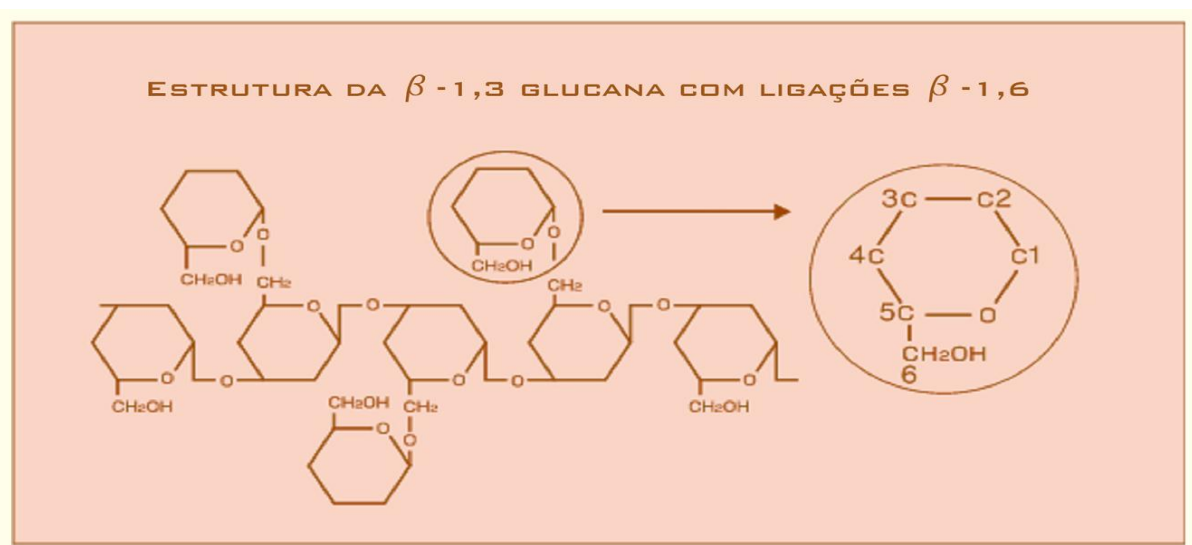


Fig.1).

FIGURA 1: Estrutura da β -glucana, composta por uma cadeia principal formada por ligações β -1,3 glicosídicas, contendo ramificações β -1,6. Fonte: Adaptado de <http://www.aureo.co.jp/english/glucan/glucan4.html>

A atividade biológica da β -glucana vem sendo estudada há vários anos, devido à sua ação imunoestimulante e outras propriedades benéficas ao homem e animais (KIM; YUN, 2006; IVÁN RODRÍGUEZ et. al., 2009). Estudos mostram que

KARINA MENDES MELCHUNA

as β -glucanas melhoram a resposta imunológica do organismo contra patógenos, aumentando a capacidade de macrófagos, neutrófilos e células natural *killer* (NK) de responder a uma variedade de bactérias, vírus, fungos e parasitas. (CHEN; SEVIOUR, 2007; BROWN, 2006).

A glucana funciona como um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), o qual é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como os receptores semelhantes a Toll (TLRs) e o receptor dectina-1, presentes nas células fagocíticas. A ativação destes receptores promove a fagocitose, explosão respiratória, secreção de citocinas e quimiocinas, fator estimulador de crescimento (CSF) (PATCHEN et al., 2008), produção de fosfolipase A2 e COX2. Entretanto, outros receptores podem estar envolvidos na ativação dessas células (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009; LI et al., 2009; BROWN, 2006; BROWN; HERRE; WILLIAMS, 2003).

Células NK e células não imunes como células endoteliais, células do epitélio alveolar e fibroblastos, não expressam dectina-1, mas tem papel importante na atividade imunológica antifúngica e medeiam os efeitos protetores da β -glucana contra doenças infecciosas e não-infecciosas através da presença de outros receptores, como receptor do complemento 3 (CR3), lactosilceramida e receptores varredores (*scavenger*), que reconhecem este polissacarídeo (DALIA et al., 2007).

Diferenças existentes entre a estrutura da glucana solúvel e particulada podem comprometer a afinidade molecular aos receptores dectina-1 e TLRs na iniciação dos sinais intracelulares (CHAUNG et al., 2009). Chaung e colaboradores (2009) demonstraram que dectina-1 e TLRs após ativados pela glucana particulada, agem sinergicamente na produção de citocinas como IL-12 e TNF- α pelos macrófagos e células dendríticas, através da ativação do fator nuclear NF- κ B. A expressão de TLR-4 e TLR-2 nos macrófagos e células dendríticas é aumentada no tratamento com glucana, indicando o envolvimento dos TLRs no reconhecimento da β -glucana juntamente com o auxílio da dectina-1 nas células apresentadoras de antígenos (APCs), o que resulta em várias ações imunomodulatórias da β -glucana (CHAUNG et al., 2009; IKEDA et al., 2008)

Verificou-se que as micropartículas de β -1,3 glucana extraídas de *Saccharomyces cerevisiae* induziram a produção de TNF- α , interleucina seis (IL-6) e interleucina um (IL-1) em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, após estimulação dos vários receptores para a β -glucana (CHEN; SEVIOUR, 2007).

Experimentos *in vitro* com macrófagos peritoneais de camundongos tratados com β -glucana extraída de *S. cerevisiae* mostraram aumento da atividade contra infecções por *Paracoccidioides brasiliensis*. Essas células tiveram uma grande habilidade de sintetizar as citocinas do perfil Th1, o TNF- α e IL-12 (PELIZON et al., 2005). E em outra pesquisa, constatou-se que a glucana particulada, quando administrada em camundongos, por via intraperitoneal, em modelo de sepse induzida por transfixação coto-cecal abdominal, contribuiu para aumentar a sobrevivência dos animais, por proporcionar um maior controle da infecção bacteriana (CRISPIM; MEDEIROS; SALES, 2004).

1.2 *Candida albicans*: BIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS

C. albicans é uma levedura pleomórfica, que pode crescer como blastoconídio, pseudohifa ou hifa verdadeira, pertencente à família Saccharomycetaceae, dos fungos ascomicetos (JACOBSEN, et. al., 2012). Sua parede celular é constituída por diferentes camadas, sendo a camada externa composta por manoproteínas e a camada interna por quitina, β -1,3 e β -1,6 glucana (NETEA, 2006).

As infecções por *C. albicans* podem ser divididas em: infecções superficiais e sistêmicas. Durante a colonização, *C. albicans* vive como comensal em constante equilíbrio com a microbiota da mucosa sem causar danos ao hospedeiro, entretanto infecções oportunistas podem ocorrer quando o balanço microbiótico é perturbado ou o sistema imune é comprometido (JACOBSEN, et. al., 2012).

Para ser capaz de induzir diversas infecções e sobreviver em distintos sítios anatômicos, a *C. albicans* expressa vários fatores de virulência. Dentre eles, podemos citar o fenômeno da transição levedura a hifa (morfogênese), estreitamente regulada por diversas vias de transdução de sinais, em resposta a estímulos ambientais. Outros fatores de virulência incluem a capacidade de adesão, tigmotropismo (capacidade para identificar junções intercelulares na superfície da mucosa) e secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares, tais como: a lipase, fosfolipase e proteinase (WILLMENT; BROWN, 2008).

A interação entre os fatores de virulência de *C. albicans* e os mecanismos imunológicos do hospedeiro desempenha um papel crucial para determinar se a colonização continua assintomática ou leva à infecção do epitélio e uma possível infecção sistêmica (WEINDL, et. al., 2007).

1.3 IMUNIDADE AO FUNGO *C.albicans*:

Algumas espécies de fungos como: *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*, causam doenças em hospedeiros saudáveis. Entretanto, vários fungos são patógenos oportunistas, particularmente comensais como *C. albicans*, que causam doença ou não em indivíduos saudáveis, porém podem infectar e causar doença grave em pessoas imunodeficientes (ROMANI, 2004).

A defesa do hospedeiro contra a candidíase sistêmica baseia-se principalmente na fagocitose e eliminação de *C. albicans* por células do sistema imune inato, especialmente neutrófilos, monócitos e macrófagos. A estratégia básica de resposta pelas células do sistema imune consiste no reconhecimento dos PAMPs presentes na *C. albicans* por receptores de reconhecimento de padrões nas células imunes dos mamíferos, destacando-se TLRs 2 e 4. Observou-se que o receptor de manose estimulou a produção de citocinas na infecção por *C.albicans*. Também, verificou-se que receptores lecitina tipo C (ICAM3 específico), medeiam o reconhecimento de *C. albicans* por células dendríticas. Outros estudos demonstraram que as cadeias de O-manana reconhecidas por TLR-4, cadeias de β -glucanas reconhecidas por dectina-1/TLR2 e o receptor de manose reconhecendo polímeros N-manana, presentes na parede celular da fase leveduriforme de *C. albicans*, são responsáveis pela maior produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, nas células mononucleares dos mamíferos (NETEA, et. al. 2006; COSTA; FELIPE; GAZIRI, 2008).

Células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos, após serem ativadas por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ , são capazes de eliminar *C. albicans* por um mecanismo que envolve a fagocitose e a produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. O papel crucial das citocinas pró-inflamatórias para a defesa do hospedeiro contra *C. albicans* tem sido demonstrado pelo aumento da susceptibilidade à candidíase de camundongos *knockout* para essas citocinas (NETEA, et. al. 1999). Em contraste, as citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 têm efeitos imunossupressores. Acredita-se que o equilíbrio entre produção de citocinas pró e anti-inflamatórias é decisivo para determinar se o sistema imune do hospedeiro será ou não capaz de eliminar o fungo (ROMANI, 2004; NETEA, et. al. 2006).

1.4 CANDIDÍASE SISTÊMICA:

A frequência de candidíase invasiva tem aumentado nas unidades de tratamento intensivo. Comparando as incidências de todas as infecções hospitalares por fungos, o gênero *Candida* aparece em torno de 72%, sendo *C. albicans* a espécie mais comumente isolada. Entretanto, o número de espécies de *Candida* não-*C.albicans* isoladas tem crescido e, se associa à grande mortalidade dos pacientes. (BROMURO, et. al. 2010; LI, et. al. 2009). No Brasil, a Rede Brasileira de Estudo de Candidemia relatou a incidência de 2,49 casos por 1000 habitantes admitidos em hospital ou 0,37 casos por 1000 pacientes-diários (COLOMBO, et. al., 2006; NUCCI, et. al., 2010), taxa esta, cerca de 10 vezes superior às casuísticas americanas (PFALLER; DIEKEMA, 2010).

Os indivíduos com predisposição à candidíase invasiva em unidades de tratamento intensivo são: pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pacientes transplantados, pacientes submetidos à quimioterapia, com alterações da pele e barreiras mucosas (cateteres, cirurgias, intubação), com insuficiência renal, que recebem nutrição parenteral e também os que são submetidos à corticoterapia e a antimicrobianos de amplo espectro (LIM, et. al., 2010; MOYES; NAGLIK, 2011). Nestes pacientes a levedura quando colonizante da superfície epitelial tende a invadir o tecido através da formação de hifas, as quais são necessárias para o fungo chegar a corrente sanguínea (MOYES; NAGLIK, 2011; VAN DER MEER, et. al. 2010).

Apesar dos importantes avanços no desenvolvimento de agentes antifúngicos, especialmente novos azólicos e equinocandinas (PICAZO; GONZÁLEZ; CANDEL, 2008), a candidemia é responsável por uma mortalidade da ordem de 40-50%. Isto se deve provavelmente ao fato de que o paciente com candidíase invasiva geralmente apresenta comorbidades potencialmente fatais e severas levando a uma possível falência terapêutica. Além disso, as novas terapias antifúngicas apresentam custo elevado gerando uma inacessibilidade à população carente, como também a *Candida ssp.* vem apresentando resistência aos antifúngicos convencionais (NOUMI, et.al., 2009).

1.4.1 Ações da Glucana contra *C. albicans*:

Várias pesquisas realizadas com a β -glucana evidenciaram que este modificador da resposta biológica pode estimular o sistema imune de diversas maneiras (CHAUN et. al., 2009). LEHEN et. al. mostraram que em pacientes imunocomprometidos e pacientes que receberam radioterapia na cavidade oral, a glucana foi capaz de proteger a mucosa oral contra *C. albicans* e outros microorganismos, com o aumento da concentração de imunoglobulina A (IgA).

A β -glucana de estrutura linear β -1,3 ou ramificada, também foi estudada como vacina antifúngica conjugada ao adjuvante humano MF59 em uma emulsão óleo em água, dessa forma, proporcionando um avanço significativo no desenvolvimento de uma vacina sintética para uso clínico contra doenças fúngicas (BROMURO et. al., 2010). E, outro estudo, realizado com vacinas de glucana conjugada a proteínas, mostrou indução de proteção imunológica a diferentes tipos de infecções fúngicas em camundongos (TOROSANTUCCI, et. al., 2005).

Com base na literatura, a qual demonstra que o uso da glucana é capaz de estimular o sistema imune contra infecções fúngicas e na busca por identificar novos agentes terapêuticos que auxiliem no tratamento e prevenção das infecções por estes patógenos, objetivamos avaliar se a β -1,3 glucana particulada, extraída do *Saccharomyces cerevisiae*, seria capaz de modificar a evolução da infecção sistêmica por *C. albicans* em modelo experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito protetor da β -1,3 glucana, administrada por via intraperitoneal, na infecção sistêmica induzida por *Candida albicans* em modelo experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a sobrevivência dos animais tratados ou não com glucana.
- Avaliar o grau de disseminação da infecção pela quantificação das unidades formadoras de colônias e detecção histopatológica da *C. albicans* nos rins dos animais tratados ou não com glucana.
- Quantificar a produção de TNF- α sérico dos animais tratados ou não com glucana.
- Realizar análise histopatológica para avaliação da resposta inflamatória nos rins dos animais.
- Avaliar a função renal dos animais, através da dosagem de uréia sérica.

3 METODOLOGIA:

3.1 ANIMAIS:

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, pesando entre 21 e 26 gramas, com idade de 6 semanas, acondicionados em mini-isoladores Alesco[®], mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°C), luminosidade (ciclo 12h claro/12h escuro) e umidade. Os animais foram divididos em três grupos (G1, G2 e G3), de acordo com a tabela abaixo descrita.

TABELA 1: Grupos do experimento e número de animais que receberam o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* ou 5×10^8 /ml de *C. albicans*.

Grupos	Tratamento	Concentração celular	
		5×10^7 /ml	5×10^8 /ml
G1	Sepse por <i>C. albicans</i> sem tratamento	n:6	n:15
G2	Sepse por <i>C. albicans</i> + tratamento com glucana	n:6	n:15
G3	Controle - PBS (sem sepsis + PBS)	n:3	-

O experimento com animais que receberam o inóculo de 5×10^8 /ml de células foi realizado no laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Araraquara). Os camundongos infectados com o inóculo de 5×10^7 /ml células foram mantidos no Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e os experimentos nesta instituição realizados. Todos os animais receberam água e alimentação *ad libitum* e foram monitorados diariamente. Os camundongos moribundos (definidos como aqueles com incapacidade de circular ou circular com andar cambaleante) ou os que apresentaram perda de 20% do peso corporal sofreram eutanásia para a remoção dos rins. As carcaças dos animais utilizados foram congeladas em “freezer” e posteriormente eliminadas juntamente com a coleta seletiva.

Todos os procedimentos envolvendo camundongos estão de acordo com a COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UFRN com o protocolo de número 017/2010.

3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO:

Esta etapa foi desenvolvida tanto no Laboratório de Micologia Médica e Molecular da UFRN quanto no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Para os modelos de infecção experimental, foi escolhida a cepa SC5314 de *C. albicans*. A preparação do inóculo foi precedida pela incubação dos isolados em placas contendo ágar Sabouraud (SAB) HIMEDIA[®] + extrato de leveduras (YE), a 37°C, por um período de 48h. Após esse período uma alçada bacteriológica das colônias de *C. albicans* foi adicionada em 10 mL de YPD (2% de glicose, 2% de peptona e 1% de extrato de levedura) HIMEDIA[®] caldo, em tubos cônicos (Falcon[®]), contendo 50mL, incubado em um agitador, a 37°C, durante dezoito horas, 200 rpm (Tecnal[®] TE-420). Após a incubação, realizou-se a centrifugação da suspensão celular por 5 minutos a 3000 r.p.m. (SUPRA 21K[®]). Subsequentemente, desprezou-se o sobrenadante e ao precipitado restante no tubo, foi adicionado 10 mL de tween 80 0,05% v/v em NaCl-150 mM (salina-tween). O precipitado foi lavado por três vezes com salina-tween e centrifugado nas mesmas condições anteriormente descritas. Posteriormente às lavagens, o número de células foi determinado em Câmara de Neubauer e a concentração do inóculo final ajustada para $5,0 \times 10^6$ ou $5,0 \times 10^7$ células por 0,1 mL de solução salina-tween (NaCl 150 mM). Cada animal, pertencente aos dois grupos (G1= sepse e G2 = sepse + glucana) foram infectados através da veia caudal.

3.3 OBTENÇÃO DA β -1,3 GLUCANA:

No Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFRN, a β -1,3 glucana foi extraída pela técnica descrita por Hassid; Joslyn; Cready (1941) com algumas modificações, a partir do fermento Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*). Após extração e pulverização (Fig. 2), a glucana foi suspensa em solução salina estéril, na concentração de 5mg/mL, sendo, em seguida, autoclavada. A análise por ressonância magnética nuclear (NMR - 1D and 2D) confirmou que a estrutura linear (1 \rightarrow 3)- β -glucana foi purificada e não apresentou outros carboidratos, proteínas ou compostos fenólicos (MEDEIROS et al, 2012).



FIGURA 2: β -1,3 glucana insolúvel extraída a partir do fermento Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*).

3.4 ADMINISTRAÇÃO DA GLUCANA:

A glucana na concentração de 5mg/mL de solução salina estéril, foi administrada no volume de 1mL, por via intraperitoneal, nos camundongos do grupo 2 (G2) que receberam $5,0 \times 10^7$ /ml de células ou $5,0 \times 10^8$ /ml de células, 72h antes da indução de sepse por *C. albicans*, como também no tempo 0h (dia 0), após a indução de sepse e com 72h após a sepse nos animais restantes para estudo, como demonstrado na figura 3.

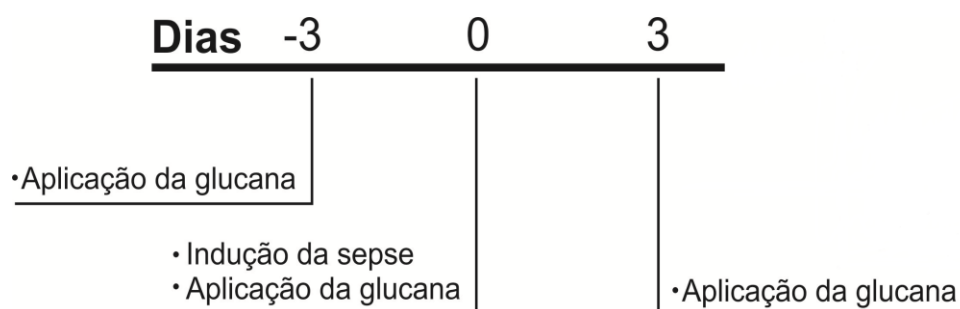


FIGURA 3: Esquema de administração da glucana.

3.5 SOBREVIDA DOS ANIMAIS INFECTADOS COM *C. albicans*:

Após a indução de sepse foi avaliado o tempo de sobrevida dos animais, nos grupos de camundongos que receberam 5×10^8 /ml de *C. albicans* por via intravenosa. O tempo de sobrevida de cada grupo foi determinado pela sobrevivência do animal em relação às horas e dias. Essa análise foi realizada no Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Araraquara).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (U.F.C.) NOS TECIDOS:

No quarto dia após a inoculação das leveduras, nos grupos que receberam 5×10^7 /ml células de *C. albicans*, foi removido assepticamente o rim direito dos animais. Os órgãos foram homogeneizados individualmente em 1 mL de solução salina-tween. O homogeneizado de tecido foi diluído serialmente (1:10, 1:100, 1:1000) (Fig.4) e transferido para placas de Petri contendo ágar Sabouraud suplementado com 50µg de cloranfenicol, incubadas por 48h a 35°C. Foram contadas as colônias isoladamente e o resultado expresso como log u.c.f. por órgão (CHAVES, et. al., 2005).



FIGURA 4: Imagem das placa de Petri contendo as u.f.c. em diferentes diluições do macerado renal.

3.7 DOSAGEM DE TNF- α

3.7.1 Obtenção de soro

No quarto dia após a inoculação das leveduras, nos grupos que receberam 5×10^7 /ml células de *C.albicans*, os animais sofreram deslocamento cervical, em seguida o sangue foi coletado por punção cardíaca. As amostras foram deixadas por

1h até sedimentação das hemácias e em seguida centrifugadas a 2500 rpm por 10min para a separação do soro. Os soros dos animais foram aliquotados e congelados a -80°C , para posterior determinação do TNF- α e dosagem de uréia.

3.7.2 Quantificação do TNF- α

A concentração da citocina TNF- α foi avaliada nos soros, pelo método do ELISA, utilizando-se kit comercial e seguindo as instruções do fabricante (eBioscience[®] - Brasil).

3.8 DOSAGEM BIOQUÍMICA DA URÉIA

Os animais que receberam 5×10^7 /ml células de *C.albicans* foram sacrificados no quarto dia após a indução de sepse e o sangue coletado para a dosagem sérica da uréia por fotometria em ultravioleta através do método enzimático, utilizando-se o kit comercial (Labtest[®]). A leitura da absorbância, realizada no analisador bioquímico semi-automático (Bio-Plus 2000[®]), medida em 340nm foi proporcional à concentração de uréia.

3.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Foram obtidos espécimes por nefrectomia para avaliações histopatológicas, no quarto dia após inoculadas as leveduras nos animais que receberam 5×10^7 /ml células de *C.albicans*. Os animais foram eutanasiados, o rim esquerdo de cada animal foi removido e preservado em formol 10% até serem submetidos ao processamento histopatológico de rotina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina para avaliação do infiltrado celular inflamatório e ácido periódico-Schiff (PAS) para detectar a presença do fungo.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para amostras independentes e Wilcoxon e Friedman para amostras pareadas, ambos para testar a existência de diferença significativa entre os grupos, com a atribuição do valor-p de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2007 para organização dos dados e o SPSS versão 17.0 para execução dos testes estatísticos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SOBREVIDA DOS ANIMAIS INFECTADOS COM *C.albicans*:

Com relação a sobrevivência dos animais que foram infectados por *C. albicans*, podemos observar que os animais que receberam 5×10^8 /ml células de *C. albicans* e foram previamente tratados com glucana (G2) não apresentaram mortalidade no período de 24h após inoculação, enquanto que todos os animais que não receberam a glucana (G1) morreram antes de completar 24 horas após inoculação (Fig. 5). Todos os animais que receberam concentrações 5×10^7 /ml de inóculo de *C. albicans*, pertencentes aos diferentes grupos G1 e G2 sobreviveram durante o período de quatro dias, quando foram sacrificados.

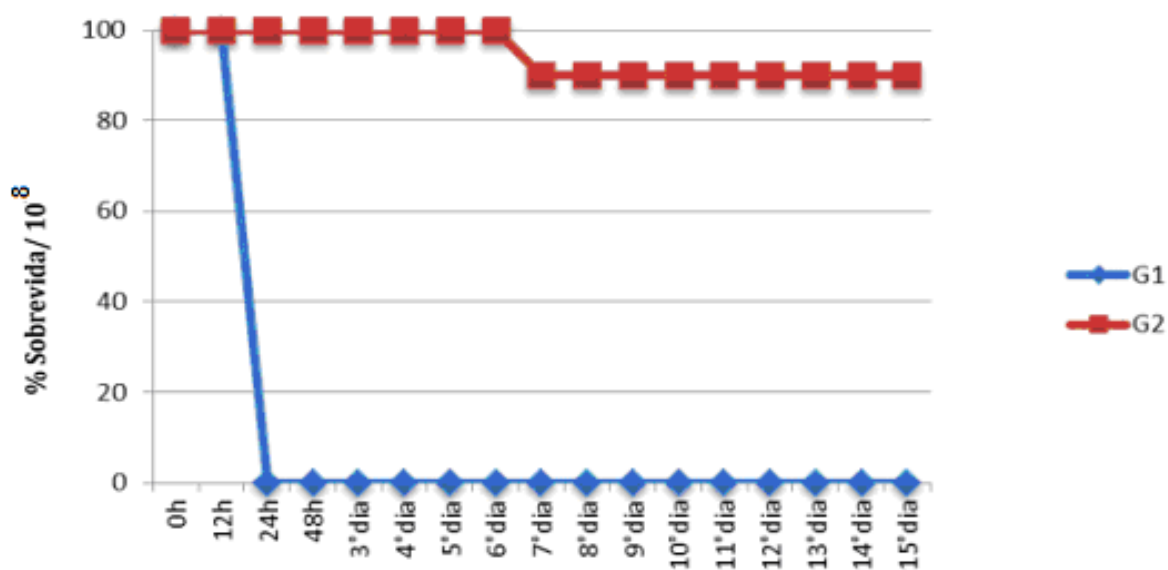


FIGURA 5: Sobrevivência dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo submetido à sepse com 5×10^8 /ml células de *C. albicans* sem tratamento (G1) e submetido à sepse com 5×10^8 /ml células de *C. albicans* e tratado com glucana (G2). Os animais foram observados durante 15 dias.

É possível sugerir que, a partir dos resultados das curvas de sobrevivência as diferenças de mortalidade nos animais dos dois diferentes grupos, os quais foram desafiados com diferentes concentrações de células (5×10^8 /ml de *C. albicans* e 5×10^7 /ml de *C. albicans*), sejam o resultado da diferença do tamanho do inóculo aplicado, que gera diferente fisiopatologia da doença nos animais. Resultados

semelhantes foram observados no trabalho de Leunk e Moon (1979) quando aplicou-se duas concentrações diferentes de inóculo da cepa de *C. albicans* por via intravenosa, sendo um inóculo de baixa concentração e outro de alta concentração. Os camundongos fêmeas que receberam uma alta concentração de células de leveduras ($4,5 \times 10^6$) morreram em entre oito a doze horas após a infecção, enquanto aqueles que receberam uma menor concentração de 1×10^6 células sobreviveram por dezesseis dias.

Com relação ao modelo experimental utilizando-se 5×10^8 /ml células, uma plausível explicação para a sobrevivência de 100% dos animais do (G2), os quais foram pré-tratados com glucana, comparando-os aos não tratados (G1) que morreram em menos de 24h, seria a ação da glucana no sistema imune destes animais, provavelmente porque a mesma ativa células dendríticas e macrófagos via receptores de lectina tipo C, especificamente a dectina-1 (Qi, et. al., 2011). Como essas células fagocíticas desempenham papel central na resposta imune inata, essas estariam realizando a fagocitose da *C. albicans* e assim contribuindo para eliminação desse patógeno.

4.2 AVALIAÇÃO DO GRAU DE DISSEMINAÇÃO DA INFECÇÃO

4.2.1 Quantificação das u.f.c. nos rins:

Para a avaliação da disseminação da infecção nos animais que foram inoculados com 5×10^7 /ml células, primeiramente determinou-se a contagem de u.f.c. a partir dos homogeneizados dos rins dos animais, no quarto dia após a inoculação de *C. albicans*. Esse dia foi escolhido para avaliação das colônias, pois segundo MACCALLUM; ODDS, (2005) com 10h após a inoculação, as contagens de colônias nos rins ainda não são detectáveis, porém após 24h do desafio essas contagens rapidamente aumentam e a partir do quarto dia de inoculação, com altas doses do inóculo os animais começam a morrer (BRIELAND et. al., 2001).

Neste trabalho observou-se que os animais tratados com glucana (G2) apresentaram a mediana da contagem de u.f.c. menores do que as dos animais não tratados com glucana (G1) (Fig. 6), porém de acordo com o valor-p do teste de Mann-Whitney os dois grupos não diferem significativamente quanto à média das

u.f.c. Este fato se deve a uma alta variabilidade do número de u.f.c., ocasionando alto desvio padrão (Fig. 6). A alta variabilidade do número de u.f.c. nos diferentes animais foi justificada por Maccallum e Odds (2005) os quais demonstraram que, em modelos de sepse em camundongos, os animais respondem individualmente ao desafio intravenoso por *C. albicans*, tornando os desvios padrões das contagens de colônia desta levedura nos rins comumente altos, mesmo quando concentrações do inóculo são ajustadas de acordo com o peso dos animais para minimizar as variações.

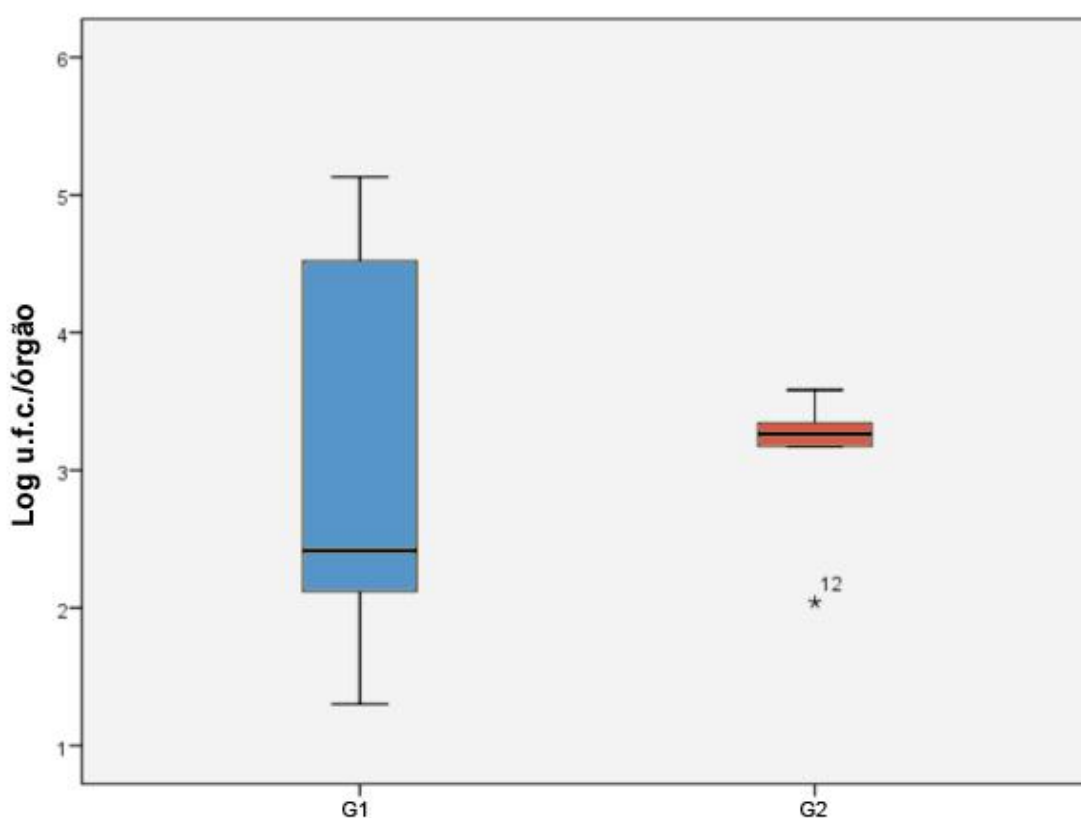


FIGURA 6: Número de u.f.c. de *C. albicans* encontradas nos rins dos animais pertencentes ao grupo submetido à sepse com 5×10^7 /ml de *C. albicans* e sem tratamento (G1) e submetido à sepse com 5×10^7 /ml de *C. albicans* com tratamento (G2). Para linearização dos resultados foi utilizado o logaritmo na base 10.

Outra possível explicação para os valores não terem sido constantes é o envolvimento unilateral do rim no modelo de candidíase disseminada utilizando camundongos. Segundo os autores Kwon-Chung; Tom, (1985) e Maccallum; Odds, (2005), esse fator propicia uma contagem não uniforme das u.f.c., representando um obstáculo na interpretação dos dados dos testes realizados com somente um rim.

4.2.2 Quantificação de TNF- α :

Sabendo-se que as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α são necessárias para a resposta normal à infecção por *C. albicans* (BRIELAND et. al., 2001), neste estudo foi avaliado a citocina pró-inflamatória TNF, no soro dos animais eutanasiados ao quarto dia, após a infecção.

No teste ELISA, observou-se que os valores do TNF no quarto dia após a infecção foram indetectáveis no soro dos animais (Fig. 7). Resultado este semelhante ao encontrado por Steinshamn e Waage (1992), no qual camundongos submetidos à infecção intravenosa por *C. albicans*, apresentaram somente um pico de 150 pg/mL de TNF no soro, 24h após a infecção, sendo este pico único, pois após as 24h os valores de TNF declinaram até valores indetectáveis nas primeiras 96h.

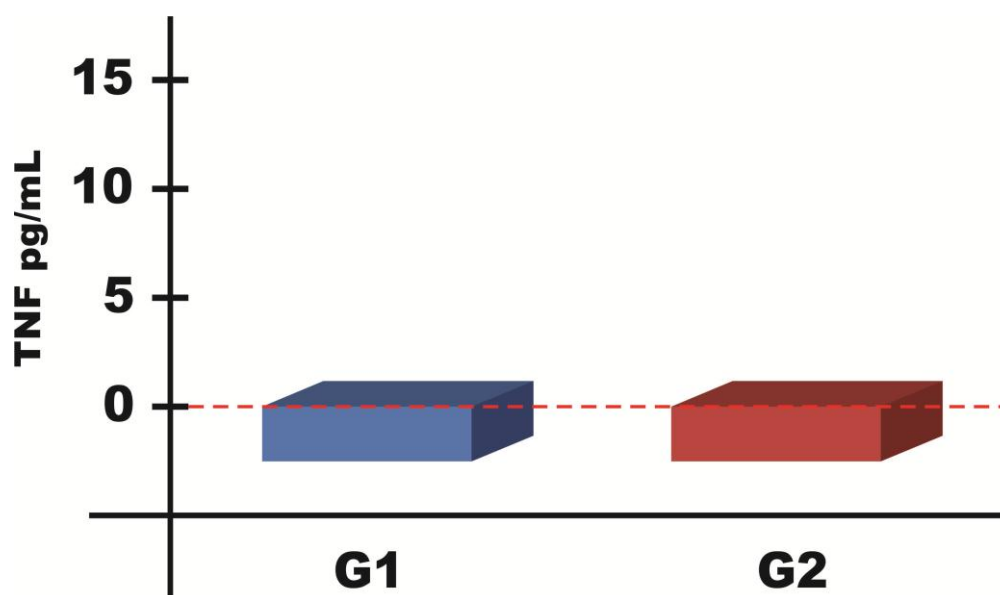


FIGURA 7: Representação gráfica dos valores de TNF- α obtidos através de análise por ELISA nos soros dos animais do grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1) e o que recebeu o inóculo de *C. albicans* e foi tratado com glucana (G2).

Com esse embasamento científico, podemos supor que a possível existência de um pico de 24h do TNF foi suficiente para ativar os fagócitos após a infecção com 5×10^7 /ml células. Estes essenciais na defesa do hospedeiro contra *C. albicans* nos tempos iniciais. Nesse caso, o TNF pode ter contribuído para ativar os fagócitos na eliminação do fungo na corrente sanguínea do animal durante o período inicial, reduzindo seu nível de concentração após esse período. E, possivelmente, após esse período inicial, o INF- γ produzido pelas células do perfil Th1 ativadas pela

glucana, tenha contribuído para uma atividade fungicida sustentada, ao invés do TNF- α (DIAMOND; LYMAN; WYSONG, 1991).

4.2.3 Análise da uréia sanguínea

O valor da uréia dos animais pertencentes ao G2 foram menores (média = 44,60 mg/dL) ou semelhantes aos dos animais que receberam só PBS por via intraperitoneal, Grupo Controle (média = 52,87mg/dL). Porém baixos valores da concentração de uréia não apresentam expressão clínica. Entretanto, a concentração da uréia dos animais pertencentes ao (G1) foram maiores (média = 119,18 mg/dL) que o valor médio do Grupo Controle, indicando uma alteração na função renal, uma vez que elevações no valor de uréia podem evidenciar falhas no funcionamento renal (CARL A. BURTIS & EDWARD R. ASHWOOD & DAVID E BRUNS , 2008).

A dosagem da uréia sanguínea tem sido utilizada há anos como indicador da função renal, e por isso escolhemos este exame para avaliar os animais submetidos à sepse, uma vez que os rins são os órgãos mais fortemente colonizados quando existe sepse por *C. albicans* (SPELLBERG, 2005). O catabolismo das proteínas e aminoácidos resulta na formação da uréia, a qual, mais de 90% é excretada pelos rins, conseqüentemente o comprometimento renal é associado ao acúmulo de uréia no sangue (CARL A. BURTIS & EDWARD R. ASHWOOD & DAVID E BRUNS, 2008).

De acordo com os resultados do valor-p do teste de Kruskal-Wallis, existe diferença significativa entre a média da concentração da uréia nos três grupos a um nível de confiança de 95% (Fig. 8). O Grupo 1, grupo dos animais, nos quais se induziu a sepse e não se realizou o tratamento com a glucana apresentou maior média de concentrações. Valores estes que estão de acordo com o estudo de Leunk e Moon (1979), no qual a uréia foi analisada diariamente em camundongos infectados com 10^6 células de *C. albicans*, até a morte dos animais. O valor médio da uréia nesses animais *versus* dias após a infecção em camundongos infectados foi, a partir do segundo dia de infecção em diante, aproximadamente duas vezes maior que o valor do grupo controle.

Observando o valor-p menor que 0,05, pode-se concluir que são exatamente entre o G2 e G1 que as médias diferem significativamente entre si (Fig. 8). Com esses dados podemos propor que a glucana, por ser um modulador da resposta imune e ativador de células fagocíticas (QI, et. al. 2011), provavelmente protegeu o rim contra uma infecção grave ou uma proliferação maior da *C.albicans* preservando assim, o seu funcionamento.

É importante citar que a insuficiência renal não é a principal causa da morte dos animais com sepse por *C. albicans*, a piora do hospedeiro e eventualmente morte, é devido a uma sepse progressiva, refletindo na situação clínica (SPELLBERG, 2005). Entretanto, com a análise da uréia conseguimos estabelecer que a infecção por *C. albicans* nos rins, leva a alteração do seu funcionamento e quando utilizamos a glucana esta função é preservada.

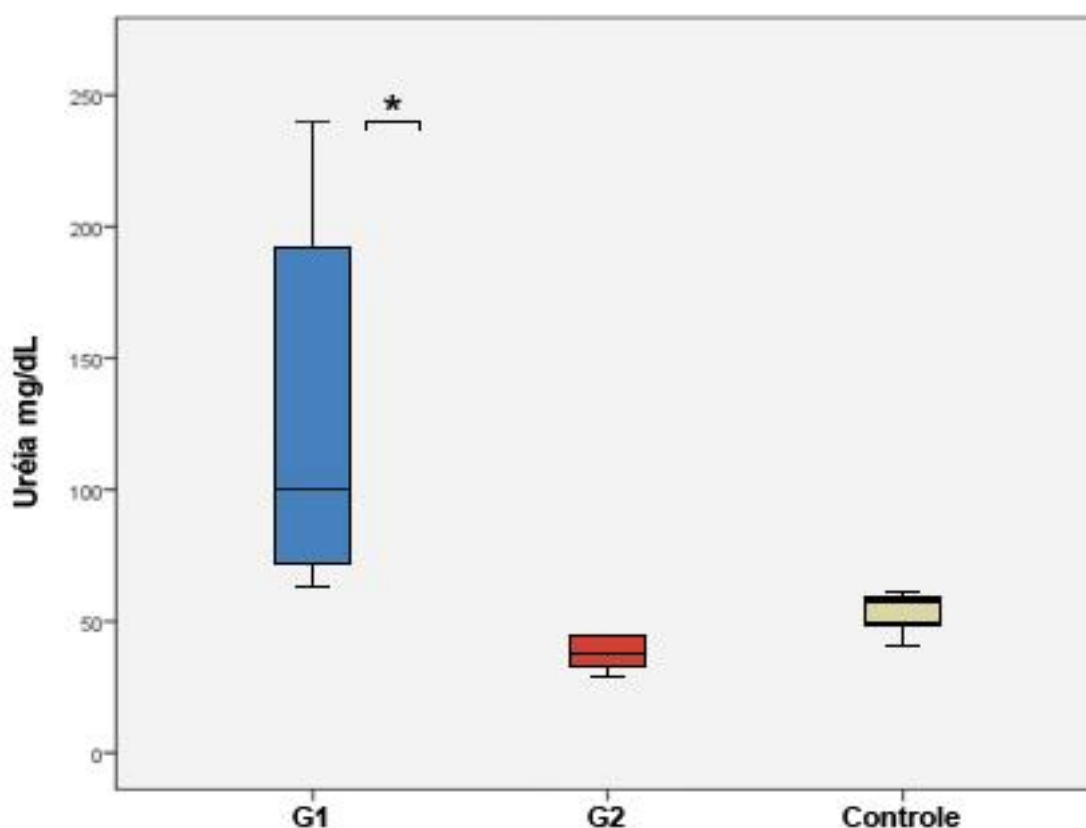


FIGURA 8: Concentração de uréia em mg/dL dos animais pertencentes ao grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1), e o que foi tratado com glucana (G2) e Grupo Controle.

*Comparação do G1 com o G2 onde $p < 0,05$.

4.2.4 Análise Histopatológica

Seções de 5µm foram cortadas a partir de blocos de parafina com as porções de rim fixadas em formalina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina para ilustrar a morfologia renal e infiltrados inflamatórios pela presença de células. Analisando as figuras 9 e 10, podemos observar que a histopatologia renal confirma os dados da dosagem de uréia e contagem de u.f.c. obtidos neste trabalho, pois os animais pertencentes ao (G1) foram os que apresentaram maior dano histopatológico com Nefrite Intersticial Necrosante e formação de micro abscessos nas regiões cortical e medular do rim como pode ser observado na fotografia do rim de um animal do (G1) (Fig. 9), enquanto que no (G2) foi observado pequeno infiltrado leucocitário nos cortes histológicos, como representado na imagem fotográfica do corte transversal renal de um animal pertencente ao (G2). Nesta foi observado apenas a presença de um foco único de micro abscesso na região medular (Fig. 10).

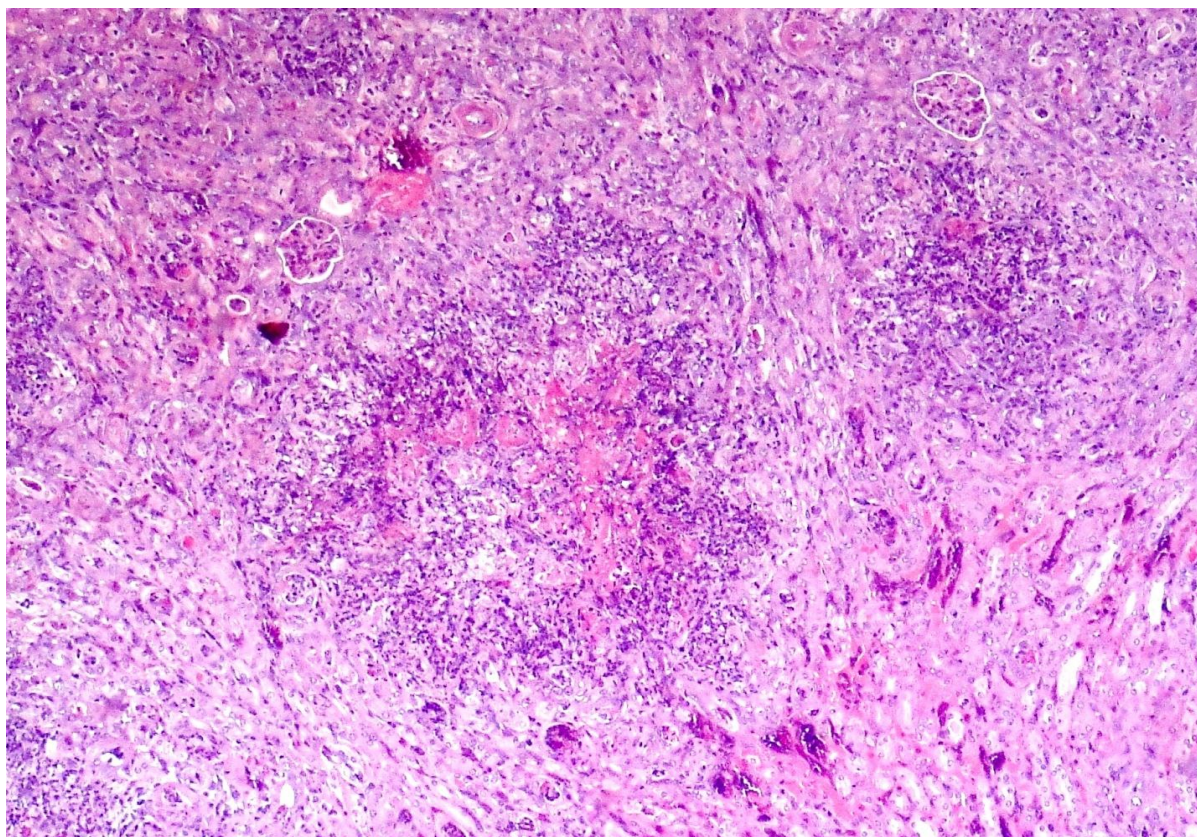


FIGURA 9: Fotografia do corte histológico renal em coloração de hematoxilina-eosina, representativa do grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1), realizada no aumento de 100 no microscópio óptico, mostrando infiltrados inflamatórios, áreas de necrose e elementos de *C. albicans*.

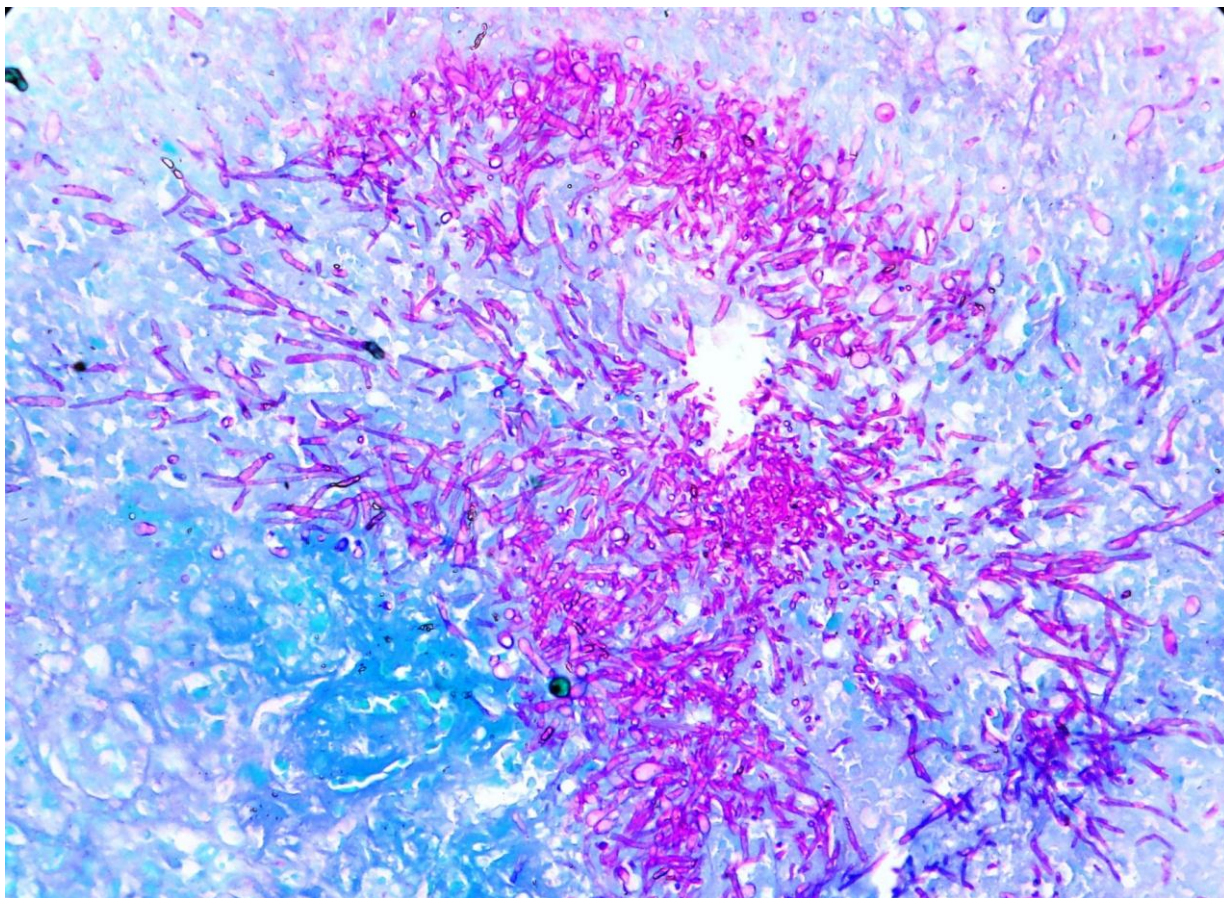


FIGURA 10: Fotografia do corte histológico renal em coloração com ácido periódico-Schiff (PAS), representativa do grupo que recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de *C. albicans* e não foi tratado com glucana (G1), realizada no aumento de 200 no microscópio óptico, mostrando áreas de necrose e elementos de *C. albicans*.

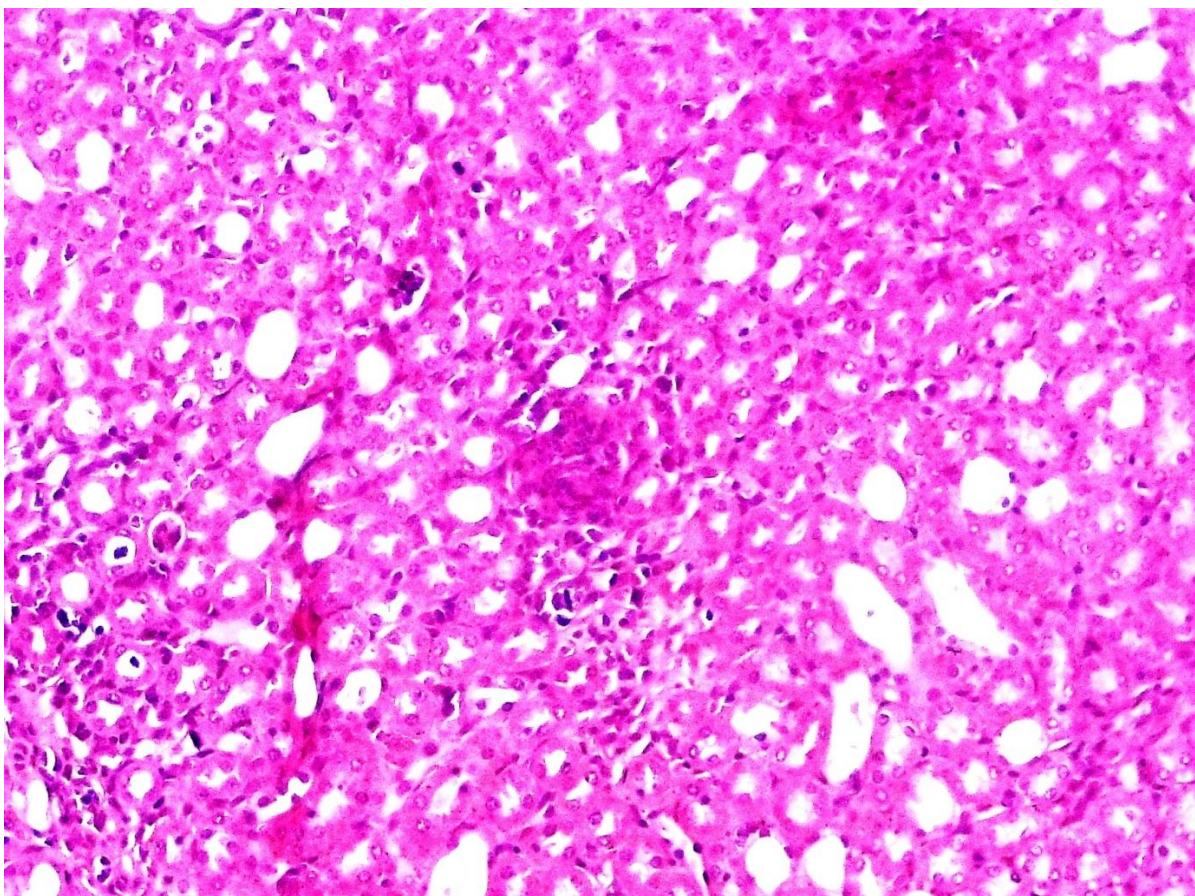


FIGURA 11: Fotografia do corte histológico renal em coloração de hematoxilina-eosina, representativa do grupo recebeu o inóculo de 5×10^7 /ml de células de *C. albicans* e foi tratado com glucana (G2), realizada no aumento de 200 no microscópio óptico, apresentando um único micro abscesso na região medular e elementos de *C. albicans*.

Portanto, após as análises das u.f.c., uréia e histopatológico obtidas neste trabalho, podemos inferir que a glucana foi capaz de modificar a evolução da infecção sistêmica, provavelmente por modular a resposta imunológica dos animais tratados. Dessa forma, os resultados deste estudo fortificam a continuidade desta linha de pesquisa e o esclarecimento da ação da glucana na resposta imune, envolvida na defesa contra a sepse induzida pela *C. albicans*, poderá servir de como base para o uso futuro deste imunomodulador no tratamento da infecção por *Candida* nos seres humanos.

5 CONCLUSÃO

- Camundongos infectados com inóculo de 5×10^8 /ml células de *C.albicans* e tratados com glucana β -1,3 insolúvel, apresentaram aumento estatisticamente significativo no tempo de sobrevivência.
- Não houve diferença significativa na quantificação das unidades formadoras de colônias presentes nos rins dos animais tratados ou não com glucana.
- Não foi detectado TNF- α no soro, coletado no 4º dia após inoculação de *C.albicans*, dos camundongos tratados ou não com glucana.
- Os camundongos não tratados com glucana apresentaram dano renal, com nefrite intersticial necrosante e formação de micro abscessos.
- Animais não tratados com glucana apresentaram um aumento significativo na concentração da uréia sanguínea.
- A glucana β -1,3 insolúvel foi eficaz no controle da sepse experimental por *C.albicans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHMAN, R.B. Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. **Front Biosci** . Australia, v. 13, p. 3334–3351, 2008.

BABÍCEK, K. et. al. Toxicological assessment of a particulate yeast 1,3/1,6 - β -D-glucan in rats. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 45, p. 1719–1730, 2007.

BALISH, E. et. al. Candidiasis in interferon- γ knockout (IFN- γ (-/-)) mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 2, p. 478– 487, 1998.

BRAND, A. et. al. Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. **Eukaryot Cell**, Scotland , v. 3, p. 900–909, 2004.

BRIELAND, J. et. al. Comparison of pathogenesis and host immune responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in systemically infected immunocompetent mice. **Infect Immun**. v. 69, p. 5046–5055, 2001.

BROMURO, C. et. al. Beta-glucan-CRM197 conjugates as candidates antifungal vaccines. **Vaccine**, Italy, 2010.

BROWN, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, [S.l.], v. 6, p. 33-43, 2006.

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **The Journal of Experimental Medicine**, [S.l.], v. 197, n. 9, p. 1119-24, 2003.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans. **Nature**, [S.l.], v. 413, p. 36–37, 2001.

CARL A. BURTIS & EDWARD R. ASHWOOD & DAVID E BRUNS. **Fundamentos da Química Clínica**, 6ª Edição, Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2008.

CHAVES, GUILHERME M. Características de patogenicidade de leveduras e patogenicidade de *Candida albicans* em modelo de infecção experimental.

KARINA MENDES MELCHUNA

Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

CHAVES, Guilherme Maranhão; CAVALCANTI, Maria Auxiliadora de Queiroz and PORTO, Ana Lúcia Figueiredo. **Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeasts strains.** *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2003, vol.34, n.3, pp. 197-202. ISSN 1517-8382.

CHAVES, G. M. et. al. Model of experimental infection in healthy and immunosuppressed swiss albino mice (*Mus musculus*) using *Candida albicans* strains with different patterns of enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, Sao Paulo, v. 35, n. 4, p. 311-315, 2005.

CHAUNG, H. C. et. al. Immunomodulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S.l.], v. 131, p. 147-57, 2009.

CHEN. J., SEVIOUR. R, Medicinal importance of fungal β -(1,3), (1,6) glucans. **Mycological Research**. [S.l.], v. III, p. 635 – 652; 2007.

CRISPIM, JCO; MEDEIROS, AC; SALES, VSF. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. *Acta Cir Bras* [serial online] 2004 Maio-Jun;19(3). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. [also in CD-ROM].

CHEN J., SEVIOUR R. Medicinal importance of fungal β -(1/3), (1/6)-glucans. *Australia. Mycol Res*, v. 6, p. 635-52, 2007.

COLOMBO, A.L. et. al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol.** Brasil, v. 44, p. 2816–2823, 2006.

CONTI, H. R. et. al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p. 299-311, 2009.

COSTA, I. C.; FELIPE. I.; GAZIRI, L. C. J. Resposta imune a *Candida albicans*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina. v. 29, n. 1, p. 27-40, jan/jun. 2008.

DALIA. A. et. al. Effects of b-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, [S.I.], v. 43, p. 597-606, 2007.

DIAMOND, R. D.; LYMAN, C. A.; WYSONG, D. R. Disparate effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. **J Clin Invest.** Massachusetts, v. 87, n. 2, p. 711–720, 1991.

DILLON, S. et. al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR-2 and dectin-1 induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **The Journal. Of Clinical. Investigation**, [S.I.], v. 116, p. 916-928, 2006.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, J.; UNDERHILL, D. β -glucan recognition by the innate immune system. **Glycoimmunology**, [S.I.], v. 230, p. 38–50, 2009.

QUERY, B. P. et. al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult nonneutropenic intensive care unit patients: **Part II. Treatment. Intensive Care Med**, v. 35, p. 206–14, 2009. Infectious Diseases, SGRIVI, Hopital Huriez, CHRU Lille, 59045, Lille Cedex, France.

HASHIMOTO T., et. al. Nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages by fungal beta-glucans. **Biol Pharm Bull.** Japan, v. 20, p. 1006-9, 1997.

HASSID, WZ; JOSLYN, MA; MC CREADY, RM. The Molecular Constitution of insoluble polysaccharide from yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 63, p. 295-298, 1941.

IKEDA, Y. et. al. Dissociation of toll- like receptor 2-mediated innate immune response zymosan by organic solvent- treatment without loss of dectin-1 reactivity. **Biological & pharmaceutical bulletin**, [S.I.], v. 31, p. 13-18, 2008.

IWASAKI, A; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**; v. 5, p.987–995, 2004.

KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 3, p. 496-500, 2006.

KWON CHUNG KJ, TOM WK. Unilateral involvement of kidneys in mice infected with *Candida albicans*. **Medical Mycology**. Maryland. v. 23, p. 81–83, 1985.

KARINA MENDES MELCHUNA

JACOBSEN, I. D. et. al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**[S.I.], v. 10, p. 85–93, 2012

LAVI, I. et. al. Orally administered glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* reduce acute inflammation in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 22, p. 1-10, set. 2009.

LAVIGNE, L. M. et. al. The role of recombinant murine IL-12 and IFN- γ in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection. **Journal of Immunology**, vol. 160, n. 1, p. 284-292, 1998.

LEHNE, G. et. al. Oral administration of a new soluble branched beta-1,3-glucan is well tolerated and can lead to increased salivary concentrations of immunoglobulin A in healthy volunteers. **Clinical and Experimental Immunology**, Oslo, v. 143, p. 65-59, 2005.

LEUNK, R.D; MOON, R.J. Physiological and metabolic alterations accompanying systemic candidiasis in mice. **Infect Immun** v. 26, p. 1035–1041, 1979.

LI, M. et. al. Insoluble β -glucan from the cell wall of *Candida albicans* induces immune responses of human THP-1 monocytes through Dectin-1. **Chin Med J**, [S.I], v. 122, n. 5, p. 496-501, 2009.

LIM, C.S.-Y. et. al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics., 2010, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* DOI **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. Malaysia,[s.n.], v. 31, p.21-31, 2011.

MACCALLUM, D.M.; ODDS, F.C. Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. **Mycoses**. Aberdeen-UK, v. 48, p. 151–161, 2005.

MACCALLUM D.M. et. al. Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. **PLoS One**. Aberdeen-UK, [s.n.], v. 4 , 2009.

MOYES, D. L.; NAGLIK, J. R. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection; Review Article, **Clin Dev Immunol**. 2011; 2011:346307. Epub 2011 Jun 23. Department of Oral Immunology, King's College London Dental Institute, King's College London, Floor 28, Tower Wing, London SE1 9RT, UK.

KARINA MENDES MELCHUNA

NAOHITO O., et. al. Conformation dependency of nitric oxide synthesis of murine peritoneal macrophages by betas-glucans in vitro. **Immunol Lett.** Japan, v. 53, p.1-7, 1996.

NAVARRO-GARCÍA, F. et. al. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **FEMS Microbiol Rev**, Spain v. 25, p. 245–268, 2001.

NETEA, M. G. et. al. **Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors 2006** Department of Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands. m.netea@aig.umcn.nl / J Clin Invest. 2006 Jun;116(6):1642-50. Epub 2006 May 18.

NETEA, M.G., et. al. The increased susceptibility of TNF α - LT double knock-out mice to systemic candidiasis is due to defective recruitment and phagocytosis neutrophils. J. Immunol. v. 163, p. 1498–1505, 1999.

NOUMI, E. et. al. Molecular typing of clinical *Candida* strains using random amplified polymorphic DNA and contour-clamped homogenous electric fields electrophoresis. **Journal of Applied Microbiology**, [S.I.], v. 107, n. 6, p. 1991-2000, 2009.

NUCCI, M. et. al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**. Rio de Janeiro, v. 1, n. 5, p. 561–570, 2010.

PARKER JC Jr; MCCLOSKEY JJ; KNAUER K. A. Pathobiologic features of human candidiasis. A common deep mycosis of the brain, heart and kidney in the altered host. **Am J Clin Pathol**, v. 65, p. 991–1000, 1976.

PATCHEN, M. L. et. al. Mobilization of Peripheral Blood Progenitor Cells by Betafectin® PGG-Glucan Alone and in Combination with Granulocyte Colony-Stimulating Factor. **Stem cells**, [S.I.], v.16, n. 3, p. 208-17, 1998.

PELIZON, A. C. et. al. Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiological research**, [S.I.], v. 54, p. 557-64, 2005.

PICAZO, J.; GONZÁLEZ, F. R.; CANDEL, F. Candidemia in the critically ill patient. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v. 32, p. 83-85, 2008.

KARINA MENDES MELCHUNA

PENDRAK, M. L.; S. S. Yan, S. & D. D. Roberts. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 148–156, 2004.

PETTOLINO, F. et. al. Hyphal cell walls from the plant pathogen *Rhynchosporium secalis* contain (1,3/1,6)-b-D-glucans, galacto- and rhamnomannans, (1,3;1,4)-b-D-glucans and chitin. **FEBS Journal**. Australia, v. 276, p. 3698 - 3709 ,2009.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**. Iowa City, USA, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

QI, C. et. al. Differential pathways regulating innate and adaptive anti-tumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans. **Blood**, [S.I.], v. 117, p. 6825-36, 2011.

ROBERT, B. A.; DIPTI, V.; CHRISTINE, A. IL-12 and Related Cytokines: Function and Regulatory Implications in *Candida albicans* Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, Australia, v. 2011, [s.n], 2010.

RODRÍGUES, I. et. al. Beta-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shellfish Immunology**, Spain, v. 27, p. 369–373, 2009.

ROMANI, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. **Med Mycol**, 46: 515–529, 2008.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, [S.I.], v. 4, p. 1-23, 2004.

RONDANELLI, M.; OPIZZI, A.; MONTEFERRARIO, F. The biological activity of beta-glucans, **Minerva Medica**. [S.I.], v. 100, p. 237-245, jun. 2009.

RUAN, S.Y.; HSUEH, P. R. Invasive Candidiasis: an Overview from Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, [S.I.], v. 108, n. 6, p. 443-451, 2009.

SIONOV, E.; SEGAL, E.; MENDLOVIC, S. Experimental systemic murine aspergillosis: treatment with polyene and caspofungin combination and G-CSF. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.I.], v. 56, n. 3, p. 594-597, 2005.

SPELLBERG, B. et. al. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. **The Journal of Infectious Disease**, Los Angeles, v. 192, n. 2, p. 336-343, jun. 2005.

SPELBERG, B. et. al. & Filler SG. Parenchymal organ, and not splenic, immunity correlates with host survival during disseminated candidiasis. **Infect Immun**, Torrance v. 71, p. 5756–5764, 2003.

TAYLOR, P.R. et. al. Dectin-1 is required for beta glucan recognition and control of fungal infection. **Nature Immunology**, Oxford, v. 8, p. 31-38, 2007.

TOROSANTUCCI, A. et. al. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. **J. Exp. Med.** v. 202, p. 597–606, 2005. **J Exp Med.** 2005 Sep 5;202(5):597-606. Department of Infectious, Parasitic and Immune-mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

VAN DER MEER, JWM. et. al. Severe Candida spp. infections: new insights into natural immunity. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Nijmegen, v. 2, p. 58-62, 2010.

VIRIYAKOSOL, S. et. al. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and dectin-1. **Infection and Immunity**, [S.I.], v. 73, n. 3, p.1553-1560, 2005.

WEINDL, G. et. al. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. **J Clin Invest**; v. 117, p. 3664–3672, 2007.

WILLMENT, J.A.; BROWN, G.D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends Microbiol**, v.16, p. 27–32, 2008.

ANEXO I



PROTOCOLO N.º 017/2010

Professor/Pesquisador: *VALÉRIA SORAYA DE FARIAS SALES*

Natal (RN), 10 de maio de 2010.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que se encontra em anexo o parecer emitido pela CEUA a respeito do projeto "AÇÃO DA β -1,3 GLUCANA NO SISTEMA IMUNE DE CAMUNDONGOS COM SEPSE POR *Cândida albicans*", **protocolo n° 017/2010**.

O referido protocolo foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos que, segundo o Regimento Interno da CEUA (Cap. 2, Art. 13), é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **Fevereiro de 2012** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,



Elaine C. Gavioli
Presidente da CEUA