

SUSCEPTIBILIDADE A CANDIDÍASE EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH.

CANDIDIASIS SUSCEPTIBILITY IN BEARING EHRLICH SOLID TUMOR MICE.

Marcela Rodrigues de Camargo, Maria Sueli Parreira de Arruda.

Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Unesp/Campus de Bauru. E-mail: marcelarc@fc.unesp.br

Resumo

Com o intuito de compreender melhor as interações que ocorrem entre fungos oportunistas e seus hospedeiros, no presente estudo, investigamos a resposta inflamatória de camundongos suíços frente à *Candida albicans* em diferentes estádios do tumor sólido de Ehrlich. Para tanto, aos 7, 14, 21 e 28 dias do implante tumoral, lotes de 8 animais, foram provocados intraperitonealmente com 5.10^6 *Candida albicans*. Após 24 e 72 horas deste procedimento, os animais foram eutanisados e submetidos à coleta do lavado intraperitoneal, para análise do conteúdo celular e da viabilidade dos fungos. Visando determinar o potencial de disseminação fúngica na presença do tumor, pesquisamos fungos viáveis nos rins, fígado e baço. Animais livres de tumor foram submetidos a procedimentos semelhantes e serviram como grupo controle. Verificamos que, nas condições ensaiadas e, independentemente da presença do tumor, a infecção intraperitoneal por *C. albicans* resultou no recrutamento de células mononucleares, particularmente macrófagos. Embora a disseminação fúngica tenha sido sempre mais expressiva e atingido maior número de animais portadores de tumor que naqueles livres desta condição, dados estatisticamente significantes foram observados apenas aos 21 dias da evolução tumoral. Aliado a isso, animais portadores de tumor, apesar de apresentarem maior número de macrófagos no ambiente peritoneal, foram incapazes de eliminar os fungos. Considerando que camundongos são resistentes à *Candida albicans*, o aumento e a persistência da infecção nestes animais sugerem que os tumores sólidos afetam a susceptibilidade do hospedeiro à infecções oportunistas,

Palavras chave: Candidiase, tumor de Ehrlich, resposta inflamatória, macrófago.

Abstract

In the present study, we investigate the inflammatory response of Swiss mice to the *Candida albicans* infection in different lads of the solid tumor of Ehrlich, in order to better understand interactions among opportunist fungi and yours hosts. In such a way, Groups of 8 animals, had inoculated by intraperitoneal route with 5.10^6 *Candida albicans* at 7, 14 and 21 days of tumoral implantation. After 24 e 72 hours of this procedure, the animals were sacrificed and submitted to the collecting of intraperitoneal lavage, for

analysis of the cellular content and fungal viability. Aiming to determinate the fungal potential dissemination in the presence of the tumor, viable fungi was determinated at kidneys, liver and spleen. Animals without tumor and other only submitted to *Candida albicans* were used as controls groups. Ours results demonstred that, independent of the tumor, the intraperitoneal infection by *C. albicans* resulted in a recruitment of mononuclear cells, especially macrophages. Even so, in mice with tumor the fungal dissemination have been always more expressive and reached a higher number of animals as compared to those ones free of this condition. Statistical significant data were only observed in animals with 21 days of tumoral evolution. Furthermore, animals bearing tumor were unable to eliminate the fungi, in spite of a higher number of macrophages in a peritoneal cavity. Considering that mice are resistant to *Candida albicans*, the increase and persistence of infection in these animals suggesting that solid tumor affects the host susceptibility to opportunist infections.

Keywords: Candidiasis, Ehrlich tumor, inflammatory response, macrofage.

Introdução

Embora o desenvolvimento de modelos experimentais tenha demonstrado o comprometimento da resposta imunológica em pacientes portadores de tumor, a extensão e as conseqüências desse comprometimento são pouco conhecidas (De Pablo *et al.*, 2000). Nas últimas décadas, o aumento significativo da incidência de infecções sistêmicas por espécies de *Candida* nestes indivíduos, tem despertado a atenção dos pesquisadores para este problema.

Dentre os possíveis mecanismos envolvidos no controle e/ou modulação das candidíases, destacam-se os macrófagos; essas células controlam o crescimento fúngico no local da infecção, através de mecanismos intracelulares envolvendo metabólitos oxidatvos e enzimas não oxidativas (Molero *et al.*, 2005; Filler 2006). Os macrófagos também estão presentes nos tumores sólidos; neste ambiente, sofrem uma série de modificações bioquímicas tornando-se ativados e, à semelhança do que ocorre nas infecções fúngicas, modulam o crescimento tumoral através da liberação de compostos citotóxicos (Sunderkotter *et al.*, 1994; Kono *et al.*, 1996; Dinapoli *et al.*, 1996). Os mecanismos envolvidos no desequilíbrio desta relação, que resulta no desenvolvimento tumoral e favorecimento das infecções ainda não se encontram bem estabelecidos. No presente estudo avaliamos as condições de ativação dos macrófagos residentes na evolução dessa condição.

Material e métodos

Para este estudo empregamos 75 camundongos suíços portadores de tumor sólido de Ehrlich, em diferentes estágios de evolução. Assim, lotes de 8 animais, após 7, 14 e 21 dias do implante tumoral

foram inoculados via intraperitoneal com 5.10^6 *Candida albicans*; às 24 e 72 horas da infecção com o fungo, lotes de 4 animais por período foram eutanasiados e submetidos à coleta do lavado intraperitoneal para análise do conteúdo celular e a presença de fungos viáveis. Visando determinar o potencial de disseminação fúngica na presença do tumor, pesquisamos fungos viáveis nos rins, fígado e baço através de cultivo de fragmentos destes órgãos. Quatro animais livres de tumor e de fungos (Grupo Controle Tumor) e quatro animais inoculados apenas com *C. albicans* (Grupo Controle *Candida*) e quatro livres de qualquer procedimento (Grupo Sadio), foram submetidos a procedimentos semelhantes e serviram como grupo controle.

Resultados e discussão

Análise microbiológica de Lavado Intraperitoneal.

Tanto os animais considerados sadios como aqueles portadores de tumor que não foram provocados com *C. albicans*, não demonstraram a presença de fungo em nenhuma das amostras analisadas e, em nenhum momento experimental. Este resultado já era esperado, dado que a *C. albicans* não faz parte da flora normal de pequenos roedores (Pitarch et al, 2001).

Às 24h após a provocação com *C.albicans*, todos os animais livres do tumor (GC) exibiam fungos no ambiente peritoneal. Com a evolução da infecção, ou seja, 72 horas após a introdução do fungo, apenas 50% deles demonstraram a presença de Cândida no local do inóculo; esta tendência à resolução reforça a premissa que aponta estes animais como resistentes as candidíases (Pitarch et al, 2001; Elahi et al, 2001).

No grupo de animais portadores de tumor e submetidos à *C. albicans*, verificamos que, dos 4 animais que foram provocados com o fungo aos 7 dias da evolução tumoral, apenas 1 mostrou-se *Candida* positivo 24 h após a inoculação do fungo; já às 72h, 3 dos 4 animais avaliados mostraram fungo na cavidade peritoneal. Comparando esses resultados com aqueles obtidos nos animais livres do tumor, verificamos que a condição neoplásica, de alguma forma, alterou significativamente a resposta do hospedeiro ao fungo, no momento inicial da infecção (24h), dificultando sua instalação do fungo no local do inóculo (Gráfico 1).

É possível que, na maioria dos animais ensaiados (3/4) nos momentos iniciais da infecção (24h), a resposta do hospedeiro, estimulada pela condição tumoral ainda precoce, tenha colaborado com o *clearance* fúngico observado nesses animais. Essa “atividade protetora” atribuída à condição tumoral, foi restrita aos momentos iniciais da infecção, já que com a evolução, esta situação não se manteve: animais inoculados com *C. albicans* aos 14 dias da evolução tumoral, exibiram quadro semelhante ao do grupo controle, ou seja, às 24h pós-inoculação de *Candida*, todos os animais exibiam fungo. Aos 21 dias, houve uma exacerbação do processo: camundongos portadores de tumor exibiram

maior número de animais *Candida* positivos e maior densidade de fungos que animais do grupo controle.

Embora o exato mecanismo envolvido na facilitação da instalação fúngica e/ou da manutenção dos mesmos no hospedeiro, permaneça obscuro, tem sido sugerido que fatores liberados pelas células tumorais poderiam exercer esse efeito. Tem ainda demonstrado, por exemplo, que extratos preparados a partir de adenocarcinomas mamários de camundongos, assim como o plasma e a urina de animais portadores dessa neoplasia, deprimem a habilidade dos macrófagos em responder a um estímulo inflamatório e, assim, podem afetar o desenvolvimento das infecções (Cianciolo et al, 1980). É possível que mecanismo semelhante tenha ocorrido em nossos animais e assim, sejam responsáveis pela manutenção da infecção.

Cabe salientar aqui, os resultados microbiológicos verificados nos animais portadores de tumor e provocados *C. albicans* aos 7 dias da evolução tumoral. Às 24h pós-provocação com o fungo, o LIP da maioria dos animais avaliados não apresentou fungos viáveis. Contudo, às 72 h após a inoculação, sob as mesmas condições, a maioria deles apresentou colônias fúngicas. Ou seja, após um período de quiescência, os fungos foram novamente detectados, sugerindo sua persistência no local do inóculo.

Estes achados não são únicos. Dados semelhantes são descritos em outras patologias, como por exemplo, na hanseníase; nessa moléstia os pacientes podem mostrar-se livres de bacilos detectáveis pelas técnicas ensaiadas, apesar de albergarem bacilos nas lesões. Estes são denominados bacilos persistentes. Na candidíase, a presença de fungos persistentes tem levantado a hipótese dos neutrófilos exibirem, além da bem descrita atividade microbicida, propriedade microbiostática. Segundo Sohnle *et al.* (1992), a multiplicação local dos fungos era suprimida pela disrupção dos neutrófilos e conseqüente liberação de calproteína, que atuaria privando o fungo do zinco necessário para sua multiplicação. Nessas condições os fungos não seriam detectados. Qualquer que seja o mecanismo utilizado, nossos resultados sugerem que após um momento inicial de multiplicação, o meio se tornou hostil para o desenvolvimento da *Candida*. Nestas condições, o fungo se tornou quiescente. Quando o microambiente se tornou novamente favorável ao seu desenvolvimento, retornaram à condição de multiplicação.

Análise Microbiológica dos órgãos.

Para avaliar a eventual participação da condição tumoral na disseminação fúngica, avaliamos a presença da *Candida* no fígado, baço e rins de nossos animais (figuras 1,2 e 3). Como pode ser observado, 24h após a introdução da *C. albicans*, todos os animais livres do tumor (sadios) exibiram disseminação do fungo para órgãos internos; às 72h, apenas dois (2) dos quatro (4) animais, exibiam esse quadro, sugerindo tendência à resolução. Este resultado está de acordo com a literatura, quando

esta aponta que, nos roedores, a disseminação fúngica só ocorre quando estes são submetidos à antibioticoterapia ou a medidas imunossupressoras (Cenci et al., 1995).

Em animais portadores de tumor, verificamos que:

-animais inoculados com *C. albicans* aos 07 dias da evolução tumoral: 24h após a introdução da *C. albicans*, apenas metade dos animais apresentaram disseminação para pelo menos um dos órgãos avaliados. Comparando estes resultados com os dados obtidos junto ao grupo controle, verifica-se que, à semelhança do observado quando da análise da instalação fúngica no local do inóculo, a presença do tumor, de alguma forma, afetou significativamente ($P < 0.05$) a saída da *C. albicans* do local do inóculo. Dá suporte a essa premissa o fato de não termos observado disseminação em nenhum dos animais avaliados 72 horas após a introdução do fungo.

Para Shepro *et al.* (1964), quanto menor a capacidade do agente em provocar uma resposta inflamatória, menor a capacidade tecidual em retê-lo no local do inóculo. Levando em conta essa premissa, e considerando que a *C. albicans* é um fungo pouco flogógeno, é possível que a resposta inflamatória mais expressiva gerada no peritônio destes animais por conta da estimulação tumoral, tenha retido o fungo no local.

- animais inoculados com *C. albicans* aos 14 dias da evolução tumoral : tanto às 24h como às 72h após a inoculação de *C. albicans*, 3 dos 4 animais apresentaram disseminação para o baço e fígado e, 1 para os rins. Assim, com a evolução tumoral, os possíveis *fatores inibidores* da disseminação fúngica ou foram bloqueados ou se tornavam menos eficientes.

- animais inoculados com *C. albicans* aos 21 dias da evolução tumoral: 24h após a inoculação do fungo, apenas 1 animal apresentou disseminação para os órgãos internos. Contudo, após 72h, 3 dos 4 animais exibiram este quadro. Nestes animais a quantidade de fungos foi muito expressiva, tomando toda a placa de cultivo e, não permitindo a quantificação estabelecida na metodologia. .

Em conjunto nossos resultados revelam que a condição tumoral alterou a resistência à instalação e disseminação da *C. albicans* e assim, reforçam os dados que apontam o comprometimento da resposta imune do hospedeiro portador de tumor às infecções oportunistas.

Determinação do número Total e diferencial de Leucócitos.

A introdução de *C. albicans* no ambiente peritoneal resultou no aumento do número de células recuperadas pelo LIP, particularmente nas primeiras horas da infecção, quando são observados fungos viáveis no local do inóculo. A medida que o processo evoluiu e a quantidade de fungos viáveis diminuiu ou não foram mais detectados, a quantidade de células também diminuiu, atingindo níveis observados em animais não infectados.

De modo geral, os macrófagos foram as células mais freqüentemente encontradas. Este resultado já era esperado, uma vez que constituem população residente e representam importante mecanismo de defesa contra este fungo (Filler, 2006).

Segundo Calich *et al* (2001), no decorrer do processo inflamatório algumas funções macrofágicas podem ser modificadas e outras não; essa diversidade de resposta aos agentes infecciosos estaria relacionada tanto ao estado de diferenciação prévio das células, quanto a presença de mediadores das funções macrofágicas no local do inóculo. O fato dos animais avaliados aos 21 dias da evolução tumoral exibirem, concomitantemente, um número significativamente maior de macrófagos e fungos que o observado em outros grupos, sugere uma ação supressora do tumor ou de seus produtos sobre a função macrofágica. Uma consequência deste fenômeno seria a maior disseminação fúngica; corrobora esta assertiva o fato de que, em todos os momentos da infecção, a disseminação da *C. albicans* em animais portadores de tumor foi sempre mais expressiva que o observado em animais livres desta condição.

Conclusão

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo, demonstram que a introdução de *C. albicans* via intraperitoneal em camundongos suíços resulta em candidíase sistêmica aguda, com disseminação para o baço, fígado e rins. Às 72h a quantidade de fungos viáveis diminui significativamente, quer nas vísceras ou no local do inóculo. Assim, nossos resultados dão suporte aos dados que apontam serem os camundongos, na ausência de manipulação direcionada, resistentes à infecção por *C. albicans*. Sugerem ainda a participação importante da resposta inata nesse processo, uma vez que a condição tumoral afeta o comportamento macrofágico frente a esse fungo.

Grafico 1 : Distribuição da amostragem segundo o percentual de colonização dos órgãos de animais portadores de TSE provocados por *C. albicans* e seus respectivos controles. Os resultados estatísticos foram dados sob os seguintes níveis de significância ($p < 0,05^*$, ANOVA *post test* Turkey).

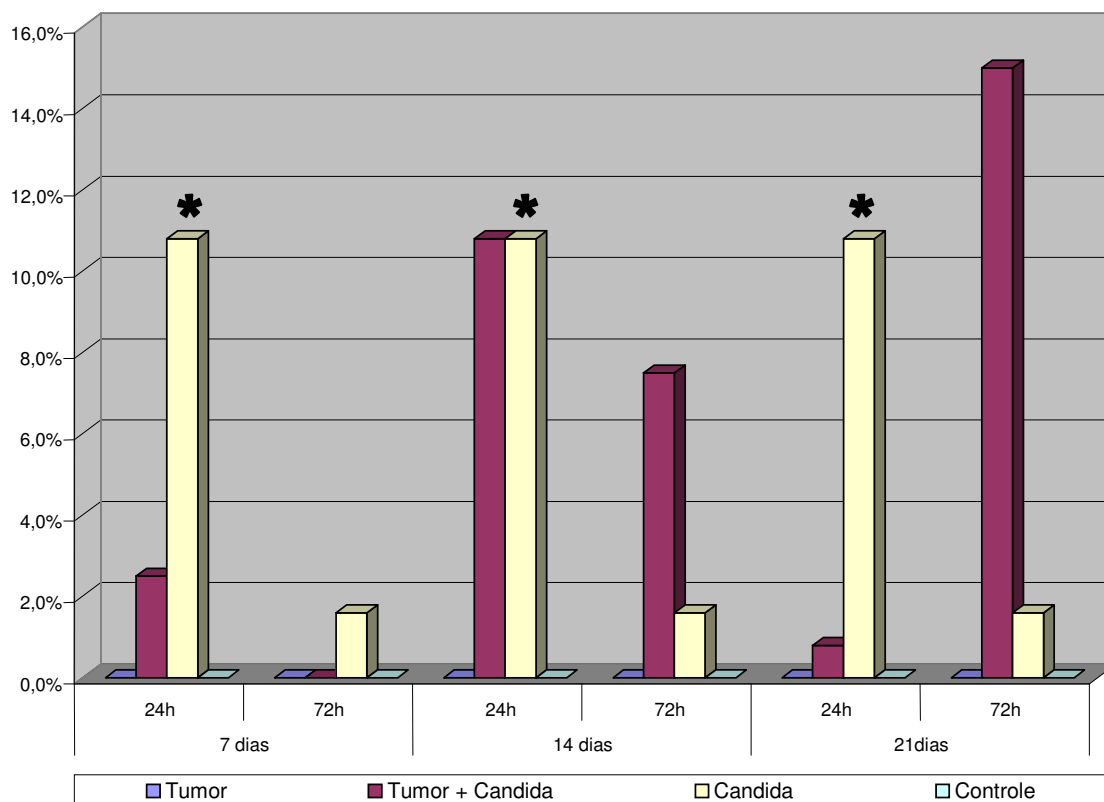


Gráfico 2: Distribuição da amostragem segundo o número de unidades formadoras de colônia presentes no LIP de animais portadores de TSE provocados por *C. albicans* com seus respectivos controles. A diferença estatística em relação aos grupos foi dada sob os seguintes níveis de significância ($p < 0,05^*$, ANOVA, *post test* T).

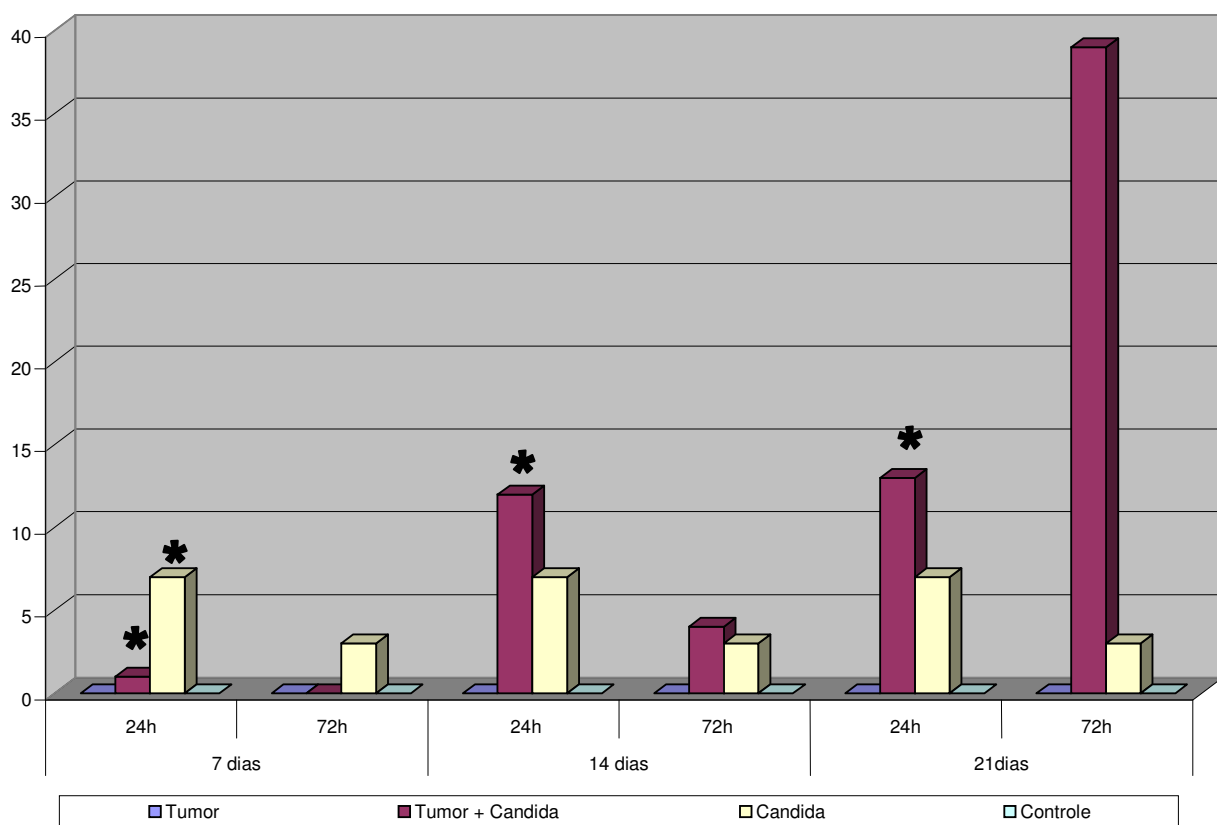
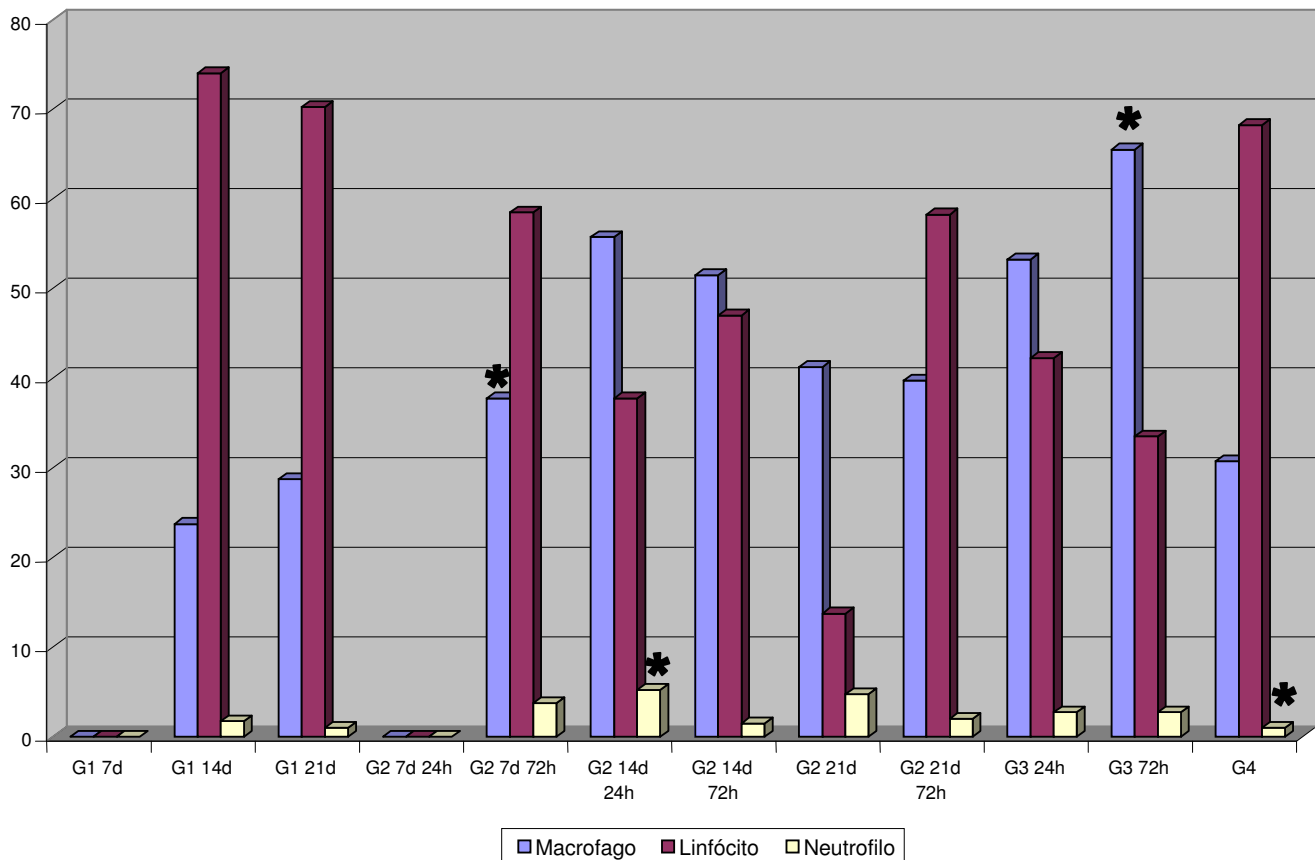


Gráfico 3: Distribuição da amostragem segundo média da quantidade de macrófagos, linfócitos e neutrófilos presente no lavado intraperitoneal dos animais portadores de TSE provocados por *C. albicans* com seus respectivos controles. A diferença estatística em relação aos grupos foi dada sob os seguintes níveis de significância ($p < 0,05^*$, ANOVA *post test* T).



Agradecimentos

Agradeço a James Venturini¹, Daniele Abrantes¹, Fátima Regina Vilani Moreno², pelo auxílio prestado na realização desse estudo.

¹ Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Campus de Bauru e ² Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru-SP.

Refêrências Bibliográficas

CALICH, V. & VAZ, C., **Imunologia**. Rio de Janeiro, Livraria e Editora Revinter Ltda., 2001.

CENCI E et al. T Helper Cell Type 1 (Th1)- and Th2-like Responses Are Present in Mice with Gastric Candidiasis but Protective Immunity Is Associated with Th1 Development. **J. Infect. Dis.** 171, 1995. p.1279-88.

CIANCIOLO G.J. *et al.* Depression of murine macrophage accumulation by low-molecular-weight derived from spontaneous mammary carcinomas. **J Natl Cancer Inst.**,65(4), 1980.p.829-34.

DE PABLO, M.A. *et al.* Influence of diets containing olive oil, sunflower oil or hydrogenated coconut oil on the immune response of mice. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, 25., 2000. p.11-23.

DINAPOLI, M. R. *et al.* The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. **J. Exp. Med.**, 183., 1996.p.1323-29.

ELAHI S. *et al* Clancy R. Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. **Immunology.** 104(4), 2001.p.447-54.

FILLER, S. G. Candida–hostcellreceptor–ligandinteractions. **Curr Opin Microbiol.** 2006.p.333-9.

KONO M, YOSHIDA Y, KOJIMA N, TSUJI S. Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate specificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesize GD1c, GT1a, GQ1b and GT3.**J Biol Chem.** 29.,1996.p.366-71.

MOLERO G. *et al.* The importance of the phagocytes innate response in resolution of the infection induced by a low virulent *Candida albicans* mutant. **Scand J Immunol.** Sep;62(3), 2005.p.224-33.

PITARCH A. *et al* Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. **Proteomics.** ,1(4), 2001.p.550-9.

SHEPRO D, COHEN PS, KULA N.. The incompetence of hamster cheek pouchmembrane as a mechanical barrier to the movement of tritiated. coli B3 and tritiated T4 Bacteriophage. **J Immunol.** 1964.p.925-31.

SOHNLE PG, HAHN BL, RADKE L, WAGNER DK. Inefficiency of in vivo candidacidal mechanisms in experimental subcutaneous infections with *Candida albicans* in mice.Infect Immun. 3., 1992.p.940-2.

SUNDERKOTTER C, STEINBRINK K, GOEBELER M, BHARDWAJ R, SORG C. Macrophages and angiogenesis.**J Leukoc Biol.** Review. 1994.p.410-22.