

## **Efeito da concanavalina-A na produção de IL-6 e migração de células fagocíticas ao sitio de infecção com *Candida albicans***

### **Effects of Concanavalin-A on IL-6 production and migration of phagocytic cells to the site of infection with *Candida albicans***

*Gustavo Fernando da Silva Quirino, Raquel Mitie Harano, Ivete Conchon-Costa, Ionice Felipe*

Laboratório de Imunologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Londrina, PR. Brasil.

#### **Endereço para correspondência:**

Ionice Felipe

Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 Km 380 - Campus Universitário

Cx Postal: 10.011

CEP: 86.057-970 Londrina-PR

e-mail: ionice@uel.br

#### **Resumo**

Nosso grupo demonstrou previamente que o pré tratamento com Concanavalina-A (Con-A) pode induzir a produção de TNF-alfa e proteger os camundongos contra um inoculo letal de *Candida albicans*. Neste estudo, avaliou-se a produção de IL-6 e a população de células fagocíticas em camundongos pré-tratados com Con-A e infectados por via intraperitoneal com *C. albicans*  $10^7$  por (30 minutos, 2, 6, 18 e 24h). As células fagocíticas obtidas da cavidade peritoneal foram analisadas por aderência das células em lamínulas de vidro, incubadas por 30 minutos a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, fixação em metanol, coloração em Giemsa e observação em microscópio óptico, contando-se 20 campos em imersão. Em sobrenadantes dos exsudatos peritoneais estocados no freezer a -20°C foi feita avaliação de IL-6 por ELISA. A população de macrófagos e neutrófilos aumentaram significativamente após 6 horas de infecção. Após 18 e 24h de infecção, a migração de macrófagos e neutrófilos foram similares para ambos os grupos. O aumento na produção de IL-6 correlaciona com o aumento da migração de células fagocíticas para a cavidade peritoneal. Entretanto, outras citocinas também devem ter participado do processo.

**Palavras-chave:** IL-6, Concanavalina-A, macrófagos, neutrófilos.

#### **Abstract**

Our group demonstrated previously that treatment with concanavalin-A (Con-A) can induce the production of TNF-alpha and protect mice against a lethal inoculum of *Candida albicans*. In

this study, the production of IL-6 and the population of phagocytic cells in mice pretreated with (Con-A) and infected with *C. albicans* 10<sup>7</sup> for (30 min, 2, 6, 18 and 24h) by i.p. pathway were evaluated. The analysis of phagocytic cells was accomplished by adherence of the cells to glass coverslips and incubated for 30 min at 37 ° C with 5% CO<sub>2</sub>, fixation in methanol and Giemsa-staining and light microscope observation in 20 fields. In supernatants from peritoneal exudates stored at -20 ° C freezer was determined IL-6 by ELISA. The population of macrophages and neutrophils increased significantly after 6 hours of infection. At 18 and 24 hours postinfection, the migration of macrophages and neutrophils were similar for both groups. The increase in production of IL-6 correlates with the increased migration of phagocytic cells into the peritoneal cavity. However, other cytokines must also have participated in this process.

**Keywords:** IL-6, concanavalin-A, macrophages, neutrophils.

## INTRODUÇÃO

A importância das doenças fúngicas aumentou nas últimas três décadas, principalmente pelo aumento na população de indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), transplantados e portadores de câncer<sup>(1,2)</sup>. Outras condições tais como: o uso de antibióticos de amplo espectro por tempos prolongados e internação hospitalar por doenças severas ou procedimentos cirúrgicos, nutrição parenteral, uso de cateteres arteriais ou endovenosos, ventilação artificial podem predispor o paciente à candidíases<sup>(3,4)</sup>.

Nosso grupo tem trabalhado com imunomoduladores com intuito de melhorar a resposta imune do hospedeiro e também na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos com a superação da candidíase para que no futuro possam contribuir como fins terapêuticos. Assim, em camundongos pré-tratados com lectinas, como concanavalina-A (Con-A) ocorreu rápida depuração de *C. albicans* 577 do baço, rins e fígado, após inóculo por via intraperitoneal<sup>(5)</sup>. Foi verificado que pré tratamento com ArtinM foi efetivo para proteger de uma dose letal de *C. albicans* CR15<sup>6</sup>. Além disso, ocorreu aumento significativo de fagocitose e morte de *C. albicans* mediada por receptores de manose, complemento e Dectina-1<sup>(7,8,9,10)</sup>. O tratamento com Con-A induziu produção de TNF-alfa por células da cavidade peritoneal, por células do baço, fígado e rins após infecção com *C. albicans* CR15 e protegeu-os contra um inóculo letal<sup>(11)</sup>. Entretanto, os animais tratados com placebo (PBS) tiveram baixa capacidade fagocítica e candidacida e destes 80% morreram com o mesmo inóculo. Dos isolados de pacientes HIV+, além da *C. albicans* CR15 trabalhamos com a CR1 que causou apoptose dos macrófagos e produção de IL-10, uma citocina imunossupressora<sup>(12,13,14,15)</sup>. Ao analisarmos todos os isolados de *C. albicans* e não *albicans* verificou-se que em condições de baixa nutrição, ao ser adicionado albumina, todos produziram aspartato proteinases, considerado um fator de virulência de *Candida*, associado à aderência aos tecidos do hospedeiro, além de degradar imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular, causando lesões<sup>(16)</sup>.

Várias citocinas pro-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-12 são produzidas por neutrófilos, monócitos e macrófagos após reconhecimento de padrões moleculares na superfície de *C. albicans*. Tem sido sugerido que manana de *C. albicans* pode ser reconhecida por receptores de manose ou por TLR4 e fosfolipomana interage com TLR2 enquanto  $\beta$ -glucanas foram reconhecidas por um complexo de dectina-1 e TLR2, as quais disparam indução de morte microbiana e constituem a primeira etapa na ativação da resposta imune inata<sup>(17,18,19,10,20)</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de IL-6 e seu papel na migração de fagócitos para a cavidade peritoneal em camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS durante a infecção com *C. albicans*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais*

Grupos de camundongos Swiss (6 cada) machos, com peso aproximadamente 28-32 g entre 50-70 dias de idade. Os camundongos receberam água e ração autoclavadas ad libitum. Os protocolos experimentais receberam a aprovação do comitê de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina, sob registro nº 103373.2012.78.

### *Cultivo de Candida albicans*

*C. albicans* CR15 isolada de paciente HIV+, com infecção oral e esofagiana foi identificada através de cultivo em Chromoagar e mantida em ágar Sabouraud dextrose (Difco). Para os experimentos, alçadas do estoque foram transferidas para meio Sabouraud-dextrose e incubado a 28°C. Através deste procedimento obte-se uma cultura com aproximadamente 95% de células leveduriformes<sup>9</sup>. As células obtidas após 24 horas de crescimento foram lavadas duas vezes em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,0 e após contagem em câmara de Neubauer foram diluídas em RPMI 10<sup>7</sup> /ml.

### *Análise da população de células fagocíticas*

Grupos de camundongos contendo 5 animais para cada tempo foram pré-tratados com 250 µg Con-A (SIGMA,MO,USA) ou PBS. Um grupo controle, sem infecção foi utilizado. Após a infecção de 30 minutos, 2, 6, 18 e 24h, os animais foram eutanasiados e seu exsudato peritoneal coletado. O material foi então centrifugado, e o pellet de células foi adicionado à placas de 6 poços (TRP) com lamínulas. As células foram então incubadas por 30 minutos à 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, para adesão das células fagocíticas. Após o tempo transcorrido, as células não aderentes foram lavadas com RPMI, e adicionado metanol para fixação deste material por 20 minutos. Foi realizada coloração com o método de Giemsa, seguido de análise no microscópio óptico (Nikon), 20 campos em imersão, para determinação da população de macrófagos e neutrófilos recrutados para o sítio de infecção. Os sobrenadantes foram guardados em freezer -20°C para dosagem de citocinas.

### *Análise de produção de IL-6*

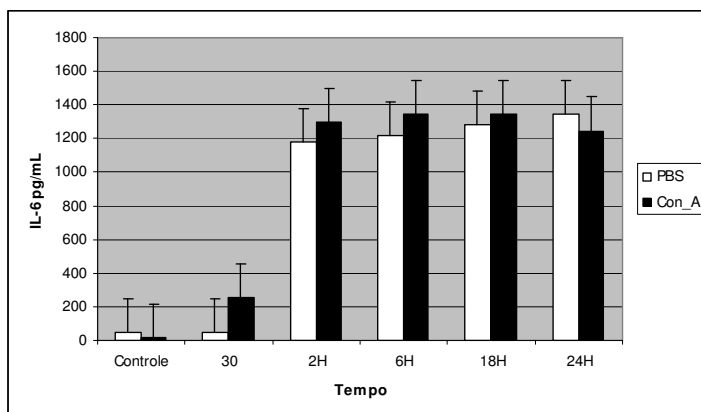
Foram coletadas alíquotas de sobrenadantes dos exsudatos peritoneais descrito acima desafiadas com *C. albicans* por 30 minutos e 2, 6, 18 e 24h e estocados no freezer a -20°C para avaliação de IL-6 por ELISA de captura com KITS comerciais procedentes de Ebioscience USA.

### *Análise estatística*

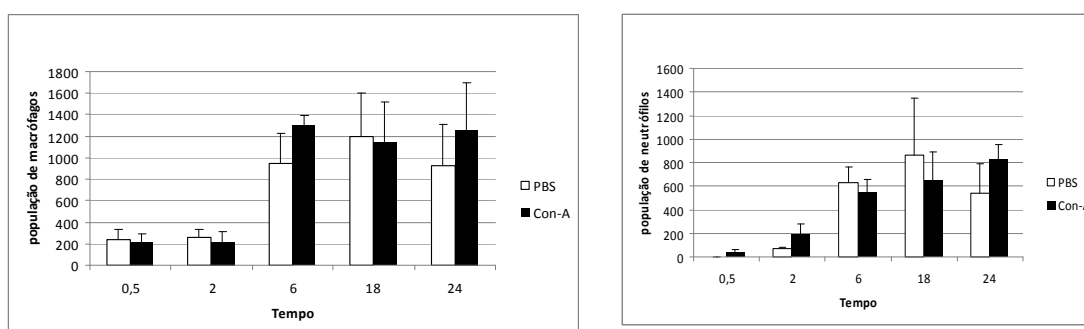
A análise estatística foi realizada por teste t de Student para avaliar as diferenças entre os grupos tratados com Con-A e controle. P< 0,05 foi considerado significante comparado ao controle.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, foi verificado o aumento da atividade dos receptores de manose e dectina-1 nos grupos pré-tratados com Con-A por três dias comparado ao grupo controle<sup>(15,20)</sup>. No presente estudo, foi possível notar um aumento dos níveis de IL-6 após 30 minutos de infecção no grupo com Con-A, embora, após 2h foi identificado níveis similares de IL-6 tanto no grupo PBS quanto no grupo Con-A (Figura 1). Isso talvez possa explicar o aumento de macrófagos e de neutrófilos na cavidade peritoneal e também a participação da IL-6 e do TGF- $\beta$  na diferenciação das células TH17.



**Figura 1.** Produção de IL-6 ao longo do curso de infecção com *Candida albicans* em camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS.



**Figura 2.** População de macrófagos e neutrófilos no curso de infecção com *Candida albicans* em camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS.

A população de macrófagos encontra-se diminuída durante as fases iniciais da infecção, em ambos os grupos estudados como mostra a Figura 2 e esta redução poderia ser explicado por ocorrência de apoptose induzida pela CR15 como já demonstrado por Geraldino et al.(2010) em experimentos *in vitro*. Entretanto, verificamos que novas células podem ter migrado para a cavidade peritoneal durante a infecção provavelmente por efeito de IL-6. A citocina IL-6 induz hematopoiese, inflamação e também é

fundamental para produção de IL-17<sup>(21)</sup>. Foi observado que os macrófagos ativados com a Con-A fagocitaram um grande número de leveduras e se espalharam por toda a lâmina, enquanto macrófagos controle não impediram a transição de levedura para hifa e foram parcialmente destruídos<sup>(11,15)</sup>, corroborando com os resultados aqui encontrados.

A população de neutrófilos aumentou significativamente após 6 horas de infecção em ambos os grupos como mostrado na Figura 2 e foi mantido por 18 e 24 horas de infecção, a migração de neutrófilos foi, portanto similar para ambos os grupos (Figura 2). A resposta antimicrobiana pelos neutrófilos causou uma redução nas UFCs na cavidade peritoneal, principalmente no grupo pretratado com Con-A como já verificado anteriormente<sup>11</sup>. Os resultados sugerem que pretratamento pela Con-A induz migração dos neutrófilos mais eficientes para matar o patógeno, e não podemos excluir a participação de outras citocinas, incluindo TNF-alfa e IL-17.

Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que o pré-tratamento com Con-A aumentou os níveis de IL-6 desde meia hora de infecção, indicando que esta citocina deve ter contribuído para a geração e migração de macrófagos e neutrófilos com maior eficiência para causar morte do patógeno comparado ao controle.

Apoio Financeiro: Fundação Araucária, CNPq, PROPPG/UEL

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 4: 1-23, 2004.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidíasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20: (1)133-163, 2007.
3. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Da Mata DA, Warnock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, 8: 2816-2823, 2006.
4. Colombo A.L., Guimarães T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. *Revista. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40:3: 332-337, 2007.
5. Felipe, I, Bim S & Somensi CC. Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin A or jacalin. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, 4: 477-483, 1995.
6. Custodio LA, Loyola W, Conchon-Costa I, da Silva Quirino GF, Felipe I, Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*, *International Immunopharmacology* 11: 1510-1515,2011
7. Gaziri G, Gaziri LCJ, Kikuchi R, Scanavacca J & Felipe I. Phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalin-A activated peritoneal macrophages. *Medical Mycology*, 37: 195-200, 1999.

8. Moresco TR, Gaziri LCJ, Yasumoto Y, Felipe I. Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A. *Medical Mycology* 40: 393-397, 2002.
9. Loyola W, Gaziri DA, Gaziri LCJ, Felipe I. Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 33: 201-208, 2002.
10. Loyola W, Custodio LA, Felipe I, Conchon-Costa I, de Carvalho PG, Quirino GFS, Silva LFRS, Gaziri LCJ. ArtinM enhances TNF- $\alpha$  production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. *International Immunopharmacology*.12: 378-383, 2012.
11. Conchon-Costa I, Loyola W, Gaziri LCJ, Custodio LA & Felipe I Low dose of concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. *FEMS Immunology Medical Microbiology* 49 :330-336, 2007.
12. Panagio LA, Felipe I, Vidotto MC, Gaziri LCJ. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. *Journal Medical Microbiology*, 51: 929-936, 2002.
13. Gasparoto TH, Gaziri LCJ, Burger E, Almeida RSC & Felipe I. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2: 219-224, 2004.
14. De Vito, E. Apoptose de macrófagos residentes e ativados por concanavalina-A após fagocitose de *Candida albicans*. Dissertação de mestrado em Patologia Experimental/UEL. 2007.
15. Geraldino T H, De Vito, E, Custodio LA, Conchon-Costa I, Gaziri LCJ & Felipe I. Increased tumour necrosis factor-a production, higher mannose receptor activity and ability to kill *Candida* by concanavalin-A activated macrophages *FEMS Immunology Medical Microbiology*,59: 11-17, 2010.
16. Almeida RSC, Gaziri DA, Pongelupe RCS, Gaziri LCJ, Felipe I. Atividade de aspartil proteinases por isolados de *Candida* de pacientes HIV+. *Biosaúde*, 6: 17-26, 2004.
17. Brown G & Gordon S. fungal  $\beta$ -Glucans and Mammalian immunity. *Immunity* 19:311-315, 2003.
18. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2 . *Journal Experimental Medicine*, 197:1107-1117, 2003.
19. Netea MG, Gow MAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Fewerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes B. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative

recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *Journal Clinical Investigation* 16:1642-1650, 2006.

20. de Carvalho PGC. Efeito de concanavalina-A no perfil de citocinas e atividade fagocítica de *Candida*. Dissertação de mestrado em Microbiologia/UEL. 2011.

21. Kishimoto, T. IL-6: From its discovery to clinical applications. *International Immunology*, 22:347-352, 2010.