

# O Papel do Leucócito na Defesa do Hospedeiro Contra *Candida Albicans*

LUIZ EDUARDO M. BERMUDEZ

Membro da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do INCa (CCIH)

VERA MARIA MARQUES SILVA

Bióloga do Setor de Microbiologia – INCa

MONICA MANES SILVA

Bióloga do Setor de Microbiologia – INCa

EDUARDO BRAZ NETO

Biólogo do Setor de Microbiologia – INCa

ERALDO VIDAL

Chefe do Setor de Microbiologia

Infecções sistêmicas por *Candida albicans* têm-se tornado cada vez mais comuns como resultado de uma variedade de fatores, incluindo o maior número de pacientes "imunossuprimidos", o uso de hiperalimentação endovenosa, e o uso cada vez maior de antibióticos de largo espectro.<sup>1,4</sup> Muitos outros processos utilizados para prolongar a vida de pacientes seriamente doentes, diminuem os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando esses indivíduos mais susceptíveis a infecções por fungos. *Candida* sp. são os fungos que mais comumente causam infecções em pacientes com doenças hematológicas.<sup>5,6</sup> Muita atenção tem sido dada ao papel da imunidade celular na defesa contra as infecções por *Candida*.<sup>7,9</sup> Sabe-se porém, que uma vez na corrente sanguínea, o principal mecanismo de defesa contra a *Candida* é dependente dos polimorfonucleares

(PMN). Em animais experimentais o controle da infecção coincide com a presença de grande quantidade de PMN na circulação, e um atraso na mobilização dos leucócitos, induzido pela administração de corticosteróides é acompanhado por um importante aumento da infecção.<sup>10</sup>

Entretanto, existe grande dúvida sobre a efetividade da morte intracelular das células de *Candida* pelos neutrófilos humanos. Os resultados variam de completa sobrevivência à morte de dois-terços das *Candidas* ingeridas.<sup>11,12</sup> Portanto decidimos estudar o papel do PMN na defesa do organismo nas infecções por *Candida*, e o significado da permanência da *Candida* viva no interior dos neutrófilos.

## MÉTODOS

Cepas de *Candida Albicans*: As cepas de *Candida albicans* foram originalmente isoladas

do trato respiratório de um paciente com infecção pulmonar comprovadamente causada pelo fungo, utilizando respirador de volume há aproximadamente um mês. As leveduras cresceram em ágar Sabouraud com 2% de glicose, por 18 horas a 37° C. Em seguida foram lavadas duas vezes e re-suspendidas em solução buffer de fosfato (PBS), a uma concentração de 10<sup>7</sup>/ml.

PREPARAÇÃO DOS LEUCÓCITOS: Quarenta mililitros de sangue foram obtidos de um controle normal. Este foi heparinizado a uma concentração final de 10 U/ml, de heparina aquosa, e combinando com dextran a 10% (peso molecular de 40.000 – CEME) na relação de 2 volumes de sangue para um volume de dextran. Após uma hora de sedimentação à temperatura ambiente, a camada supernatante, rica em leucócitos, foi separada, centrifugada durante 30 minutos a 400 rpm, la-

vada uma vez e re-suspendida em solução de cloreto de amônio a 0,83%. Após a lise hipotônica dos eritrócitos, a preparação foi lavada outra vez, centrifugada e re-suspendida em solução salina balanceada de Hanks, acrescentando-se albumina humana. Mais do que 98% dos PMN pareceram viáveis na sua habilidade de excluir o "trypan blue" a 0,4%. Foi feita contagem quantitativa e diferencial dos leucócitos, e a concentração final foi de  $10^7$  PMN/ml.

**ESTUDO DA FUNÇÃO DO NEUTRÓFILO:** Tubos duplicados contendo 0,1 ml de *Candida albicans* previamente ajustadas em  $10^7$  células, 0,5 ml de PMN, e 0,3 ml de solução salina balanceada de Hanks, foram colocados sob rotação contínua a 37° C. Misturas contendo *Candida albicans* e solução de Hanks sem PMN foram incluídas no teste para servir de controle. A 0,30, 60 e 120 minutos, amostras foram colhidas, diluídas com água destilada e o número de *Candida* por mililitro foi determinado pelo método de "pour-plate". A percentagem de *Candida albicans* fagocitada e morta pelos PMN foi calculada utilizando a diferença na contagem dos tubos com e sem PMN.

**MEDIDA DA FAGOCITOSE:** O índice visual de fagocitose foi determinado combinando-se *Candida albicans* com granulócitos em solução salina balanceada de Hanks. Após 20 minutos de agitação contínua a 37° C, uma camada de células foi preparada, corada pelo Wright e examinada ao microscópio. A percentagem de granulócitos associados à *Candida albicans* e o número de *Candida albicans* por granulócitos foi determinado contando-se 200 células.

**ANALISE ESTATÍSTICA:** A comparação entre os tubos com e sem PMNs, e a resistência da *Candida albicans* à fagocitose, *in vitro*, foram

analisadas pelo teste de Student.

## RESULTADOS

As cepas de *Candida albicans* isoladas, foram testadas para a fagocitose, pelo PMN, na ausência de plasma, para evitar a ação de substâncias opsonizantes; porém foi adicionada albumina à solução, para que houvesse, no meio, íons importantes nos mecanismos de fagocitose.

No grupo de controle, sem a presença de PMN no meio, houve pouco crescimento de colônias de *Candida albicans* na placa de "pour-plate", quando comparadas ao grupo com polimorfonucleares, mostrando que a *Candida albicans* encontrou dificuldades para crescer no meio, na ausência de neutrófilos.

Os testes comparativos para ingestão, que foram feitos com as cepas de *Candida albicans*, mostraram um padrão similar de ingestão pelos

PMNs. Nenhuma diferença significativa ( $P > 0,10$ ) nos índices de fagocitose foi detectada entre as cepas testadas.

Com a adição dos PMNs ao sistema a percentagem média de *Candida albicans* morta foi de 68% após 1 hora de incubação, índice este que pouco se alterou após duas horas de incubação. Esta diferença foi significativa para  $P > 0,005$ , pelo teste de Student.

Até 30 minutos de incubação, praticamente não houve variação na quantidade de colônias de *Candida albicans* isoladas no "pour-plate", mostrando que até esse momento os PMNs não haviam sido capazes de fagocitá-las, ou ainda de destruir as células fúngicas (figura 1).

Nos fagócitos houve sobrevivência de *Candida albicans*, sendo este padrão evidente aos 120 minutos de incubação quando o número de células fúngicas intracelulares, vivas, permaneceu praticamente inalterado ( $P > 0,10$ ).

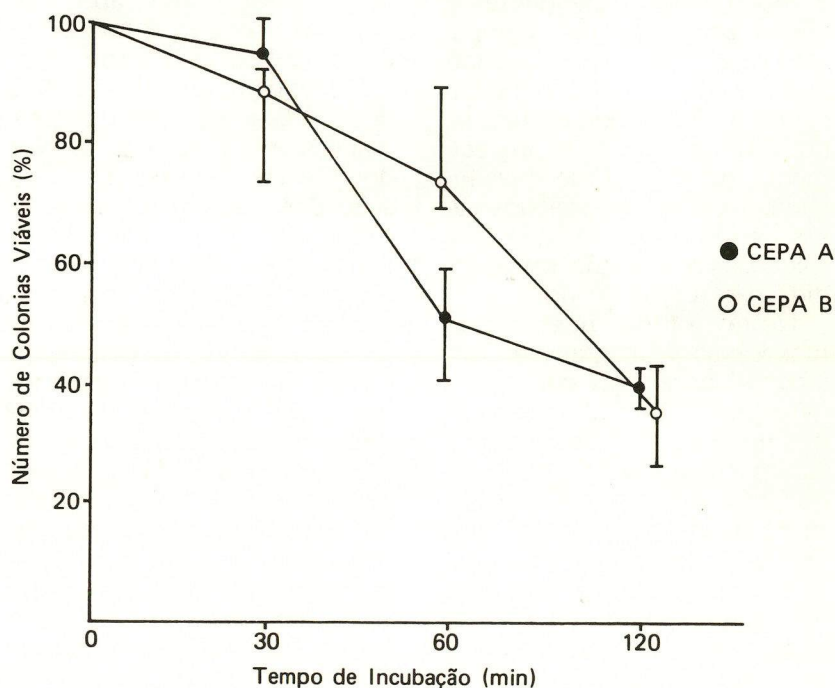


Figura 1 — Número de colônias de *Candida albicans* sobreviventes das cepas A e B, após incubação na presença de PMNs durante 30, 60 e 120 minutos. Os resultados estão expressos em número médio, com as variações de mais e menos representadas.

## CONCLUSÕES

Esses experimentos documentam o papel do leucócito polimorfonuclear na defesa orgânica contra *Candida albicans*.

As infecções sistêmicas por *Candida albicans* têm-se tornado extremamente comuns, principalmente em pacientes com neoplasias disseminadas, em vigência ou não de quimioterapia. O mecanismo imediato de defesa do organismo à entrada deste fungo é dependente da presença de PMNs.<sup>1,1</sup> Porém diversos trabalhos tem mostrado que a inclusão e a destruição da *Candida albicans* pelo PMN não se faz imediatamente, e mais ainda, que diversas células permanecem vivas no interior do neutrófilo apesar da presença de enzimas fungicidas.<sup>1,3</sup>

Exceto em um único estudo, as evidências indicam que a maioria das *Candidas* ingeridas sobrevivem no interior dos PMNs. A morte intracelular que ocorre é relacionada a mecanismos dependentes e não dependentes da mieloperoxidase.<sup>1,1</sup> Em um pequeno número de casos, a deficiência de mieloperoxidase tem sido associada com o aparecimento de *Candidíase* disseminada, mas na maioria dos casos de deficiência de mieloperoxidase, a infecção por *Candida* não tem ocorrido.

Neste estudo nós utilizamos cepas virulentas de *Candida albicans* e as colocamos na presença de PMNs teoricamente sãos. Os experimentos foram realizados na ausência de plasma, a fim de estudarmos apenas a função dos PMNs, independente da presença dos fatores opsonisantes do plasma. Um estudo do grupo controle adotado, mostrou que o crescimento da *Candida albicans* foi maior quando incubada na presença de neutrófilos, o que reforça a hipótese da sobrevivência intra-

celular do fungo. No grupo controle, o número de colônias encontradas não variou com o momento em que foram colhidas as amostras (tabela 1).

*Candida albicans* com PMNs 3, 4 ou até 5 horas após a incubação. Porém, os dados já obtidos parecem indicar que não haverá variação estatisticamente significativa no número

**Tabela 1**  
Número de colônias isoladas após incubação com PMNs

Tubos contendo <i>C. albicans</i> e leucócitos	número de colônias isoladas após incubação			
	0 min	30 min	60 min	120 min
A	67 ± 10	68 ± 8	32 ± 4	26 ± 10
B	32 ± 2	38 ± 1	14 ± 2	14 ± 1
Tubos contendo <i>C. albicans</i>				
A	3 ± 0,5	3 ± 0,5	2 ± 1	3
B	4	4 ± 0,3	2 ± 0,5	2

Os resultados obtidos mostram que a *Candida albicans*, após ser fagocitada pelo PMN, necessita no mínimo de 1 hora para ser ingerida pelo mesmo, conforme se viu em trabalhos anteriores.<sup>1,4,15</sup> Após 60 minutos, 68% das células de *Candida albicans*, inicialmente incubadas em solução com PMNs, estavam mortas ( $P > 0,005$ ). Porém, após 120 minutos este percentual praticamente não se alterou ( $P < 0,10$ ), mostrando que os 32% de *Candida albicans* que permaneceram vivas no interior dos leucócitos resistiram à ação dos mesmos. Isto nos leva a admitir que cepas virulentas de *Candida albicans* podem ser fagocitadas por neutrófilos e permanecer viáveis no seu interior. O reconhecimento de células resistentes nas cepas utilizadas de *Candida albicans* levanta a hipótese de que essas células teriam provavelmente componentes de superfície celular que as tornassem resistentes à digestão pelo fagócito. Clones diferentes em uma mesma cepa já foram encontrados anteriormente por Richardson e Smith.<sup>1,6</sup>

Seria possível repetir esses experimentos colhendo — se amostras da solução de *Can-*

de fungos mortos pelos fagócitos após 1 hora de incubação.

A sobrevivência de clones de cepas virulentas de *Candida albicans* no interior dos neutrófilos, pode ser importante nos estágios mais tardios da infecção. Por exemplo, a sobrevivência no interior dos fagócitos deveria permitir o alastramento dos blastoporos para outros tecidos, como o rim; a invasão tecidual poderia então ocorrer se a sobrevivência e o posterior crescimento ocorresse nos macrófagos que são fixos em órgãos, tais como o fígado e o baço.

O paradoxo dos PMNs parecendo essenciais para a limitação da infecção sistêmica e a limitada habilidade dessas células em matar a *Candida* ingerida, sugere que o neutrófilo deve ser capaz de causar danos à *Candida albicans* na ausência da fagocitose convencional, provavelmente pela liberação de constituintes lisossômicos.<sup>1,7</sup>

Estudos estão em desenvolvimento na tentativa de comparar a ação dos fagócitos contra a *Candida albicans* na presença e ausência do complemento.

## SUMMARY

Two strains of *Candida albicans* were obtained from patients with respiratory infections and were virulent for them. After incubation with human leukocytes, some clones of these strains were able to survive inside of phagocytes. The viability of the strains was maintained after 120 minutes of incubation; thus the leukocyte nonspecific defense mechanisms had limited effect on virulent strains in vitro, and this effect is maximum after 1 hour of incubation.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LOURIA, D.B.; STIFF, D.P.; BENNETT, B. — *Disseminated moniliasis in the adult*. *Medicine*, 41:307, 1962.
2. HART, P.D.; RUSSELL, E.; REMINGTON, J.S. — *The compromised host and infection*. *J. Infect. Dis.*, 120:169, 1969.
3. CURRY, C.R.; QUIE, P.G. — *Fungal septicemia in patients receiving parenteral hyperalimentation*. *N. Engl. J. Med.*, 285:1221, 1971.
4. SEELIG, M.S. — *The role of antibiotics in the pathogenesis of *Candida* infections*. *Am. J. Med.*, 40:887, 1966.
5. BODEY, G.P. — *Fungal infection complicating acute leukemia*. *J. Chron. Dis.*, 19:667, 1966.
6. HUTTER, R.V.P.; COLLINS, H.S. — *The occurrence of opportunistic fungus infections in a cancer hospital*. *Lab. Invest.*, 11:1035, 1962.
7. SALVIN, S.B. — *Immunologic aspects of the Mycoses*. *Proc. Allergy*, 7:213, 1963.
8. FOLB, P.I.; TRONCE, J.R. — *Immunologic aspects of *Candida* infection complicating steroid and immunosuppressive drug therapy*. *Lancet*, 2:1112, 1970.
9. HURLEY, D.L.; BALOW, J.E.; FAUCI, A.S. — *Experimental disseminated candidiasis*. *J. Infect. Dis.*, 132:393, 1975.
10. LOURIA, D.B.; FALLON, N.; BROWNE, H.G. — *The influence of cortisone on experimental fungus infections in mice*. *J. Clin. Invest.*, 39:1435, 1960.
11. LEHER, R.I. — *Functional aspects of a second mechanism of candidacidal activity by human neutrophils*. *J. Clin. Invest.*, 51:2566, 1972.
12. STAPLES, P.J.; BOUJAK, J.; al. — *Disseminated candidiasis in a previously healthy girl: implication of a leukocyte candidacidal defect*. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 7:157, 1977.
13. LEHER, R.I.; CLINE, M.J. — *Interaction of *Candida albicans* with human leukocyte and serum*. *J. Bacteriol.*, 98:996, 1969.
14. LAFORCA, F.M.; MILLS, D.M.; als. — *Inhibition of leukocyte candidacidal activity by serum from patients with disseminated candidiasis*. *J. Lab. Clin. Med.*, 86:657, 1975.
15. BELCHER, R.W.; CARNEY, J.F.; MONAHAM, F.G. — *An electron microscopic study of phagocytosis of *Candida albicans* by PMN leukocytes*. *Lab. Invest.*, 29:620, 1973.
16. RICHARDSON, M.D.; SMITH, H. — *Resistance of virulent and attenuated strains of *Candida albicans* to intracellular killing by human and mouse phagocytes*. *J. Infect. Dis.*, 144:557, 1981.
17. DIAMOND, R.D.; KRZESICKI, R.; JAO, W. — *Damage to pseudohyphal forms of *Candida albicans* by neutrophils in the absence of serum in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 61:349, 1978.