



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Papel do ATP na infeção de Macrófagos por *Candida albicans*

Tomé Silva Cardoso

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Papel do ATP na infeção de Macrófagos por *Candida albicans*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Teresa Maria Fonseca de Oliveira Gonçalves (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Ângelo José Ribeiro Tomé (Universidade de Coimbra)

Tomé Silva Cardoso

2013

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Teresa Gonçalves, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos científicos. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu Grupo de Investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me inculuiu em todas as fases do Projeto. Agradeço também a sua simpatia e disponibilidade.

Gostaria ainda de agradecer:

A todos os membros do grupo MMYRG, pela amizade, simpatia e pela disponibilidade sempre demonstrada para me ajudarem.

À Marta Mota pela amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Tese. Um muito obrigado por todo o apoio e pela disponibilidade sempre demonstrada para me ajudares.

A todos os membros do Instituto de Microbiologia, um obrigado pela ajuda prestada.

Agradeço ao grupo das Purinas, em particular ao Ângelo Tomé e Francisco Queiróz, pelo apoio e disponibilidade para a realização dos ensaios de ATP, e na disponibilidade de partilharem o vosso conhecimento.

Ao Hélder, agradeço-te por todos os momentos que passámos juntos. Seremos amigos para sempre. RIP

Aos meus amigos de infância Micael e Xavier pela vossa amizade e apoio e por todos os momentos que passámos.

Às minhas amigas Tânia e Diana um muito obrigada pela vossa amizade e apoio demonstrados e pelos bons momentos que passámos.

Aos meus amigos de Pombal, em especial ao Tiago Marques, Pedro Neves e Ruizito, pela amizade e por todo o apoio, companheirismo e momentos que vivemos ao longo desta caminhada e que de certeza continuaremos a viver.

Ao Rui Pinto, João Ramalho e Daniel “Nogueira” pela amizade e apoio sempre demonstrados e por aqueles momentos que nunca esqueceremos.

Aos meus amigos do Algarve pela amizade que criámos e que após estes anos todos ainda se mantém. Em especial quero agradecer ao “Chicken” pela amizade que mantemos apesar da distância, um amigo para a vida.

Aos meus amigos de Enfermagem pela amizade e pelos dias de diversão que passámos ao longo desta etapa.

Aos meus avós e à minha tia Esmeralda pelo apoio e carinho que sempre demonstraram.

Ao meu irmão à Catarina e às minhas sobrinhas, Fabiana e Anamar, pelo apoio prestado, pela compreensão da minha ausência e por estarem sempre a torcer por mim. Obrigado às “pequeninas” por toda a vossa alegria contagiante e por todo o carinho que me dão. Um obrigado por tudo.

Aos meus pais pela forma como me inculcaram a alegria de viver, a vontade de fazer tudo o melhor possível e a confiança necessária para realizar os meus sonhos. Um muito obrigado por todo amor que sempre me deram. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

À minha namorada, Catarina, por todo o amor e carinho que partilhas-te comigo, sempre com uma palavra de incentivo e apoio, partilhando comigo os momentos bons e os mais difíceis. Pela incansável ajuda, compreensão e, sobretudo, paciência, que contribuíram para que fosse possível a concretização deste objetivo.

Índice

Agradecimento.....	III
Índice.....	V
Lista de tabelas.....	VI
Lista de figuras.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
Resumo.....	X
Abstract.....	XII
1-Introdução.....	1
1.1- Infecções fúngicas.....	2
1.2- Candidíase.....	2
1.3- <i>Candida albicans</i>	5
1.3.1- Fatores de virulência.....	7
1.3.2- Interação de <i>Candida albicans</i> com células do hospedeiro.....	8
1.4- Macrófagos.....	10
1.5- Adenosina trifosfato (ATP).....	11
1.5.1- Ectonucleotidases.....	12
1.5.2- Adenosina.....	13
1.5.3- Recetores purinérgicos.....	13
1.6- Objetivos.....	15
2- Material e Métodos.....	16
2.1-Estirpes de leveduras.....	17
2.1.1- Meio de Cultura.....	17
2.1.2- Condições de crescimento da levedura.....	17
2.2- Cultura de Macrófagos RAW 264.7.....	17
2.2.1- Procedimento de sub-cultura dos macrófagos.....	18
2.3-Ensaio de infecção de macrófagos por <i>C. albicans</i>	18
2.3.1- Infecção de macrófagos por diferentes estirpes de <i>C. albicans</i>	18
2.3.2- CFU dos ensaios de infecção de macrófagos com <i>C. albicans</i> ...	19
2.3.3 - Infecção de macrófagos por <i>C. albicans</i> na presença de apirase (Sigma).....	19
2.4- ATP extracelular.....	19
2.4.1- Quantificação de ATP extracelular.....	19
2.5- Análise Estatística.....	20
3- Resultados.....	21
3.1- Viabilidade de diferentes estirpes de <i>C. albicans</i> em macrófagos (RAW 264.7).....	22
3.2- Quantificação do ATP extracelular na infecção de macrófagos por diferentes estirpes de <i>C. albicans</i>	24
3.3- Viabilidade de <i>C. albicans</i> em macrófagos (RAW 264.7) na ausência de ATP extracelular.....	25
4- Discussão.....	28
5- Conclusão.....	33
6- Referências Bibliográficas.....	36

Lista de Tabelas

Tabela I- Percentagem de morte das leveduras internalizadas pelos macrófagos.

Tabela II- Efeito da apirase na morte de *C. albicans* por ação de fagocitose.

Lista de Figuras

Figura 1- Infecções por *C. albicans*.

Figura 2- Representação esquemática da morfologia de *C. albicans*.

Figura 3- fases da formação do biofilme de *C. albicans* numa superfície de um cateter de PVC.

Figura 4- Diagrama esquemático ilustrando a contribuição dos vários fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade de *C. albicans*.

Figura 5- Representação das três fases da infecção oral por *C. albicans*: adesão, invasão e destruição do tecido.

Figura 6- Estrutura dos recetores P2X, P2Y e P1.

Figura 7- Variação do número de leveduras viáveis após co-cultura com macrófagos RAW 264.7.

Figura 8- Concentração extracelular de ATP em macrófagos infetados com *C. albicans*.

Figura 9- Efeito da apirase na variação da viabilidade de leveduras em macrófagos.

Lista de Abreviaturas

- A1** - Recetor de adenosina A1
A2A - Recetor de adenosina A2A
A2B - Recetor de adenosina A2B
A3 - Recetor de adenosina A3
ATP - Adenosina trifosfato
ADP - Adenosina difosfato
AMP - Adenosina monofosfato
ALS - Sequência tipo aglutinina (*agglutinin-like sequence*)
ALS 3 - Sequência tipo aglutinina ALS 3
°C - Graus centígrados
CD73 - Ecto-5'-nucleotidase
CFU – “*Colony-forming unit*” – unidades formadoras de colónias
CLRS - Receptores de lectina tipo-C
cm² - Centímetro quadrado
CO₂ - Dióxido de Carbono
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
GM-CSF - Fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio
HEPES - N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanossulfónico
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
IL-1 - Interleucina 1
IL-6 - Interleucina 6
IL-8 - Interleucina 8
IL-12 - Interleucina 12
IFN- γ - Interferão-gama
kCl - Cloreto de potássio
KH₂PO₄ - Hidrogenofosfato de potássio
MIPs - Proteínas inflamatórias em macrófagos
mg - Miligrama
ml - Mililitro
mM - Milimolar
nM - Nanomolar

NLR - Recetores NOD-LIKE
NO[•] - Óxido nítrico
NPP - Nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases
NTPDase - Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
NaCl - Cloreto de sódio
Na₂HPO₄ - Hidrogenofosfato de sódio anidro
O^{2•-} - Radical superóxido
OH[•] - Radical Hidróxilo
P - Significância estatística
P1 - Recetores P1
P2 - Recetores P2
PAF - Fator ativação de plaquetas
PBS - Tampão fosfato salino
PVC - Cloreto de polivinilo
PMNs - Células polimorfonucleares
PRRs - Recetores de reconhecimento padrão
(p/v) - Peso por volume
RPM - Rotações por minuto
Sap - Proteases aspárticas secretadas
Sap2 - Proteases aspárticas secretadas Sap2
TNF - Fator de necrose tumoral
TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa
TLRS - Recetores Toll-like
TLR4 - Recetores Toll-like 4
 μ l - Microlitros
UTP - Uridina Trisfosfato
VCAM-1 - Moléculas de *adesão* das *células vasculares* 1
YP0037 - Estirpe de *C. albicans* com a referência 0037
YP0831 - Estirpe de *C. albicans* com a referência 0831
YP0569 - Estirpe de *C. albicans* com a referência 0569
YP0537 - Estirpe de *C. albicans* com a referência 0537
YPD - Extrato de levedura, peptona e dextrose
% - Por cento

Resumo

As taxas de morbidade e mortalidade provocadas por infecções fúngicas têm aumentado nas últimas décadas, constituindo um grave problema de saúde pública. *Candida albicans* é a espécie mais comumente identificada como sendo responsável por este tipo de infecções e, embora faça parte da flora normal do Homem, pode tornar-se patogénico em indivíduos com o sistema imunitário comprometido. As células fagocíticas profissionais têm um papel crucial na resposta a estas infecções, nas quais destacamos os macrófagos. Estes, em resposta à presença de microrganismos patogénicos, iniciam diversos mecanismos de maneira a controlar este tipo de infecções, sendo que o ATP e os seus metabolitos, nomeadamente a adenosina, desempenham um papel importante na regulação desta resposta que é mediada por recetores específicos para o ATP e adenosina. Assim, o ATP, que é libertado para o meio extracelular, atua como um “sinal de perigo”, alertando os macrófagos para a presença de patogénicos, enquanto que a adenosina tem um efeito contrário, funcionando como um sinal stop do sistema imunitário de modo a que este não seja superativado e comece a destruir as células do próprio organismo. A ecto-5'-nucleotidase (CD73) tem um papel importante neste mecanismo, pois é esta enzima que leva à formação da adenosina.

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi estudar o papel do ATP na infeção de macrófagos, principais células efectoras, por *C. albicans*. Tentou-se então compreender qual a influência do ATP, tanto na internalização de *C. albicans* por macrófagos, como na resposta destas células à infeção por esta levedura, verificando a viabilidade de *C. albicans*, ao longo do tempo, no interior dos macrófagos. Para tal, utilizou-se uma linha celular de macrófagos de ratinhos, células RAW 264.7, a qual foi infetada com várias estirpes de *C. albicans*.

Os resultados obtidos mostraram que o ATP não interfere na internalização de *C. albicans* pelos macrófagos, pois esta é igual tanto na presença como na ausência de ATP extracelular. Demonstraram também que, efetivamente, existe um aumento do ATP extracelular em resposta á presença de *C. albicans* de modo a que os macrófagos sejam ativados e se defendam contra as leveduras. Essa defesa contra as leveduras observa-se através da morte destas ao longo do tempo, o que indica que os macrófagos estão a desempenhar o seu papel na defesa contra estes microrganismos. No entanto, a ausência de ATP extracelular (por adição de apirase) não se traduz numa não ativação dos macrófagos, pois os resultados obtidos mostraram que, na ausência deste, a viabilidade de *C. albicans* diminui, verificando-se uma maior morte das leveduras.

Em conclusão, este estudo demonstrou que o ATP, efetivamente, pode iniciar uma resposta inflamatória por parte dos macrófagos, no entanto estes não dependem do ATP para iniciar a defesa contra *C. albicans*, podem ser ativados por outras vias.

Palavras-chave: *Candida albicans*, Macrófagos, ATP.

Abstract

The morbidity and mortality caused by fungal infections have been increasing in recent decades, constituting a serious public health issue. *Candida albicans* is the most commonly species identified as being responsible for this type of infection although it is part of man's normal flora it may become pathogenic in individuals with compromised immune system. Professional phagocytic cells play a crucial role in response to these infections, in which we highlight the macrophages. In response to the presence of pathogenic microorganisms some mechanisms are initiated in order to control this type of infections, with ATP and its metabolites, such as adenosine, play an important role in the regulation of this response mediated by specific receptors for ATP and adenosine. Thus, the ATP released to the outside of the cells in large concentrations, acts as a "danger signal", alerting macrophages for the presence of pathogens, while adenosine has the opposite effect, acting as a stop signal the immune system so that this is not overactive and begin to destroy the body's own cells. The ecto-5'-nucleotidase (CD73) plays an important role in this mechanism, because it is this enzyme that leads to the formation of adenosine.

The main objective of this work was to study the role of ATP in infection of macrophages, the main effectors cells, by *C. albicans*. Consequently, it was studied the influence of ATP in the internalization of *C. albicans* by macrophages and the response of these cells to infection by this yeast, checking the viability of *C. Albicans* into macrophages. For this purpose, we used a mouse macrophage cell line, RAW 264.7 cells, which were infected with various strains of *C. albicans*.

The results showed that ATP does not affect the internalization of *C. albicans* by macrophages, since this is the same both in the presence and absence of extracellular ATP. It was also demonstrated a clear increase of extracellular ATP in response to the presence of *C. albicans*, activating macrophages to defend themselves against yeast. This defense against yeast is observed through the death of these over time, which indicates that macrophages are to play their role in the defense against these microorganisms. However, the absence of extracellular ATP does not result in non-activation of macrophages, as the results showed that in the absence of extracellular ATP (by addition of apyrase) the viability of *C. albicans* decreases, a higher death of yeast occurs.

Resuming, this study shows that ATP can effectively initiate an inflammatory response by macrophages, although they not depend of ATP to initiate the defense against *C. albicans*, can be activated by other means.

Keywords: *Candida albicans*, Macrophages, ATP.

Capítulo I

Introdução

1-Introdução

1.1- Infecções fúngicas

Os fungos são organismos eucariotas com parede celular, constituído por quitina. Podem apresentar-se na forma de leveduras ou na forma filamentosa. Clinicamente, torna-se cada vez mais importante perceber estes organismos quanto à sua capacidade de provocar doenças, tais como doenças cutâneas, subcutâneas ou sistémicas (Baron, 1996). Os fungos patogénicos podem ser ambientais ou então fazer parte da flora comensal e, eventualmente, podem infetar o hospedeiro humano (Seider *et al.*, 2010).

Atualmente, as infeções fúngicas constituem um importante e crescente problema de saúde pública, pois a sua incidência tem aumentado gradualmente nas últimas décadas, muitas vezes adquiridas em ambiente hospitalar. Consequentemente, a morbidade e mortalidade provocadas por esta patologia têm apresentado taxas mais elevadas nos últimos anos (García-Ruiz *et al.*, 2004; Alangaden, 2011).

Os fatores de risco para estas infeções estão relacionados principalmente com a imunossupressão ou alteração das barreiras anatómicas, favorecendo a entrada de microrganismos no hospedeiro. Existem várias causas que levam ao desenvolvimento destas doenças, tais como o tempo prolongado de permanência no hospital, diabetes, insuficiência renal, hemodíalise, antibióticos de largo espectro, cancro e quimioterapia, cateter venoso, fármacos imunossupressores, bem como cirurgias e transplantes de órgãos ou medula óssea (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2006).

Entre as infeções sistémicas causadas por fungos, as mais comuns são a candidíase e a aspergilose, cujas espécies mais frequentemente envolvidas são *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, respetivamente (Alangaden, 2011).

1.2- Candidíase

A candidíase é uma infeção oportunista que se pode manifestar nas mucosas oral e vaginal, podendo também desenvolver-se sistemicamente, na qual 90% das infeções são causadas pelas seguintes espécies: *Candida albicans* – que corresponde a 50% do total, sendo a espécie mais prevalente –, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Entre as espécies não-*albicans*, a que é descrita mais frequentemente nos Estados Unidos, França, Alemanha e Inglaterra é *C. glabrata*, enquanto a mais descrita no sul da

Europa é *C. parapsilosis*. Já na América Latina, predominam *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Estas diferenças regionais devem-se provavelmente à diversidade observada entre os pacientes destes locais, bem como as várias técnicas usadas clinicamente (Castón-Osorio *et al.*, 2008; Weindl *et al.*, 2010; Alangaden, 2011).

Em ambiente hospitalar, as infecções causadas por *Candida* spp, que correspondem ao fungo mais comumente isolado, resultam num maior tempo de permanência dos pacientes nos hospitais, aumentando os custos, sendo, portanto, considerado um problema de saúde pública (Rentz *et al.*, 1998).

A mortalidade por candidemia, apesar dos tratamentos disponíveis, é elevada, ocorrendo em 15 a 25% nos casos dos adultos e cerca de 10 a 15% em crianças. Um fato importante que se tem observado é que o número de casos de candidíase sistêmica tem aumentado tanto em ambiente hospitalar como em pacientes ambulatoriais, indicando que este tipo de infecção não está restrito a pacientes internados (Castón-Osorio *et al.*, 2008; Alangaden, 2011).

A candidemia leva à colonização de órgãos internos, induzindo a candidíase disseminada, sendo que estas condições clínicas são extremamente graves e fatais para o doente, em particular os mais debilitados. Por isso, antifúngicos são administrados como prevenção depois de transplantes de medula óssea ou cirurgias abdominais, de modo a evitar este tipo de infecção (Sudbery *et al.*, 2011).

A candidíase oral (Figura 1) é a infecção oportunista mais comum nesta cavidade, podendo apresentar-se de diferentes formas, tais como candidíase aguda pseudomembranosa, candidíase atrófica crônica, queilite angular, leucoplasia e candidíase mucocutânea crônica (Weindl *et al.*, 2010).

Em pacientes com o sistema imune comprometido, a forma pseudomembranosa também afeta outras regiões além da cavidade oral, como a orofaringe e esôfago (Figura1). Os pacientes podem relatar uma sensação de ardência local ou gosto metálico decorrente da infecção. Em pacientes idosos, o uso de medicamentos, como antidepressivos, diuréticos e com efeitos anticolinérgicos, constitui uma causa importante de candidíase oral. Isto deve-se ao fato de que estas substâncias são capazes de gerar xerostomia. A diminuição do fluxo de saliva reduz a capacidade de limpeza promovida por este fluido, diminuindo também os níveis locais de imunoglobulina A, o que propicia o crescimento de *C. albicans*. O uso de dentaduras, infecções por HIV (vírus da imunodeficiência humana) e pacientes com cancro oral também constituem fatores importantes que conduzem ao desenvolvimento de candidíase orofaríngea (Sudbery *et al.*, 2011).

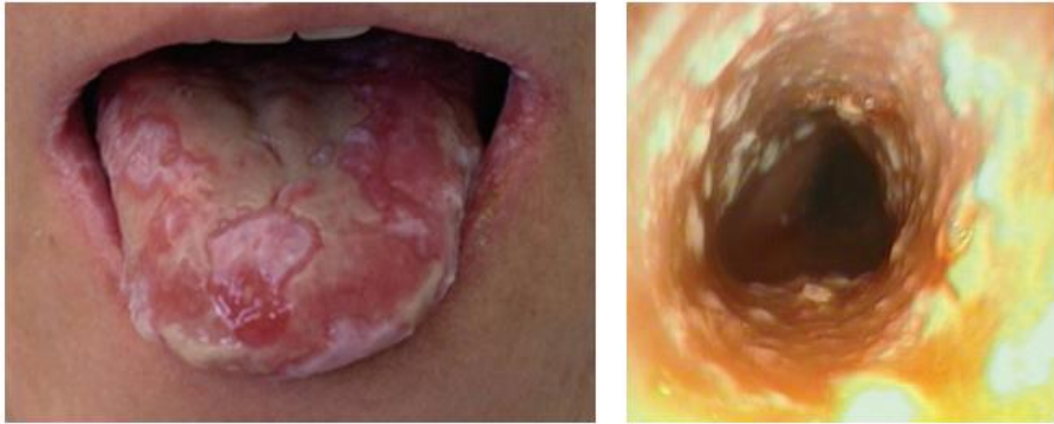


Figura 1- Infecções por *C. albicans*. (A) Candidíase oral. (B) Candidíase gastrointestinal (adaptado de FIRINU *et al.*, 2011).

A apresentação mucocutânea da doença, onde normalmente o fungo é encontrado sob a forma de micélio ou hifa, está geralmente associada com uma resposta imune inadequada, já que a resposta celular consiste na primeira defesa do organismo do hospedeiro contra organismos patogênicos. A resposta imune inata é mediada por neutrófilos e macrófagos, células envolvidas no processo de fagocitose. A resposta celular é de extrema importância para a defesa contra o fungo na mucosa orofaríngea e esôfago. O epitélio também é capaz de secretar moléculas efetoras de defesa. Moléculas-chave para a defesa inata do hospedeiro têm sido identificadas, dentre as quais destacamos os receptores Toll-like (TLRs), capazes de reconhecer moléculas antigênicas específicas de patogênicos, receptores lectina tipo C (CLRs), que induzem a resposta imune inata e ativam a resposta humoral e celular durante o curso das infecções, e os receptores NOD-like (NLR), que em conjunto com os TLRs regulam a resposta inflamatória e apoptose. Estes são os receptores de reconhecimento padrão (PRRs). A ativação do sistema imune vai induzir a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas co-estimulatórias (Weindl *et al.*, 2010; Sudbery *et al.*, 2011).

A candidíase vulvovaginal ocorre pelo menos uma vez na vida de 75% das mulheres. São vários os fatores de risco para o desenvolvimento desta forma de doença, tais como a utilização de hormonas, tratamento com antibióticos, uso de contraceptivos locais e diabetes. A imunidade inata é a resposta mais importante na mucosa vaginal e os sintomas são causados por uma resposta inflamatória excessiva (Sudbery *et al.*, 2011).

1.3- *Candida albicans*

C. albicans é um fungo trimórfico, normalmente encontrado na mucosa dos tratos gastrointestinal e genitourinário, em 30 a 60% da população, onde reside em equilíbrio com a flora bacteriana e o sistema imune do hospedeiro. Este fungo possui mecanismos de adaptação aos diferentes nichos do hospedeiro, devido a características peculiares de pH, níveis de O₂, temperatura e disponibilidade de nutrientes (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006).

Os fungos são dotados de parede celular, cujas principais funções são manter a forma das células e mediar a comunicação entre estas e o meio ambiente, no que respeita à nutrição e à capacidade de funcionar como uma barreira que protege o microrganismo de danos físicos e osmóticos. Os principais componentes da parede celular (80 a 90 %) são polímeros de manose, covalentemente associados com proteínas para formar glicoproteínas, β -glucanos, polímeros de glicose contendo ligações β -1,3 e β -1,6, e quitina, polímero de N-acetil-D-glucosamina contendo ligações β -1,4. As proteínas e lípidos são constituintes da parede celular presentes em menor proporção. Os polímeros estruturais, β -glucano e quitina, são responsáveis pela rigidez da parede celular. Os polímeros de manose constituem uma matriz amorfa na qual os polímeros estruturais estão inseridos. Proteínas e manoproteínas são capazes de induzir uma potente resposta imune humoral no hospedeiro, incluindo a produção de alguns anticorpos, o que pode ser utilizado como uma estratégia para o desenvolvimento de vacinas, por exemplo (López-Ribot *et al.*, 2004).

C. albicans tem a capacidade de se apresentar em diferentes morfologias, na forma leveduriforme, pseudo-hifa ou de hifa verdadeira conforme ilustrado na Figura 2.

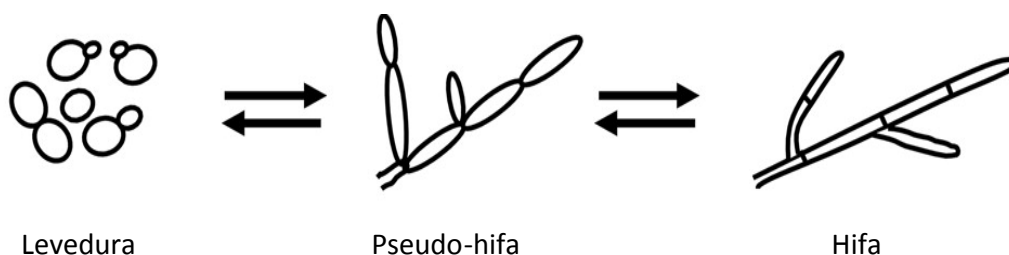


Figura 2- Representação esquemática da morfologia de *C. albicans* (adaptado de Thompson *et al.*, 2011).

As leveduras unicelulares reproduzem-se assexuadamente por gemulação. Entre a fase de leveduras e a formação de hifas existe um estado de transição, os tubos germinativos. As pseudo-hifas podem ocorrer aquando da gemulação em que há um alongamento e ocorre uma falha na separação a partir da célula mãe, o que produz

filamentos alongados, que mantém as constrictões nas junções do septo, sendo que o seu comprimento é bastante variável. Os filamentos das pseudo-hifas podem consistir em células que são apenas alongadas que são parecidas a hifas. No entanto, existem diferenças entre o modo de crescimento de hifas e pseudo-hifas. O crescimento das hifas, um dos principais fatores de virulência, é promovido por condições ambientais como crescimento à temperatura de 37 °C, presença de soro, pH neutro, alta concentração de CO₂ e presença de N-acetilglicosamina. O crescimento de leveduras é favorecido à temperatura de 30 °C em pH ácido (pH 4,0). Quanto à formação de pseudo-hifas, esta é favorecida a 35 °C em pH 5,5 (Sudbery *et al.*, 2011).

Outra característica importante de *C. albicans* é a sua capacidade de formar biofilmes (Figura 3) quando as células viáveis livres são colocadas numa superfície sólida. Inicialmente, as leveduras aderem a esta superfície e sofrem morfogénese para produzir uma camada densa de células, com morfologia mista, com uma matriz extracelular rica em β -1,3-glucano. *In vivo*, o biofilme protege as células contra as defesas do hospedeiro. No entanto, os biofilmes constituem um problema na prática médica, pois podem formar-se na superfície de cateteres intravenosos, o que promove a entrada direta de células fúngicas na corrente sanguínea do paciente. Também se podem formar biofilmes em válvulas cardíacas artificiais e em dentaduras (Sudbery *et al.*, 2011). Atualmente existe um interesse muito grande no estudo dos fatores de virulência deste microrganismo, pois constituem importantes alvos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento desta patologia. Entre tais fatores destaca-se a produção de enzimas hidrolíticas. Em *C. albicans*, os principais grupos de enzimas hidrolíticas são as proteases aspárticas secretadas (Sap), fosfolipase B e lípases (Naglik *et al.*, 2003).

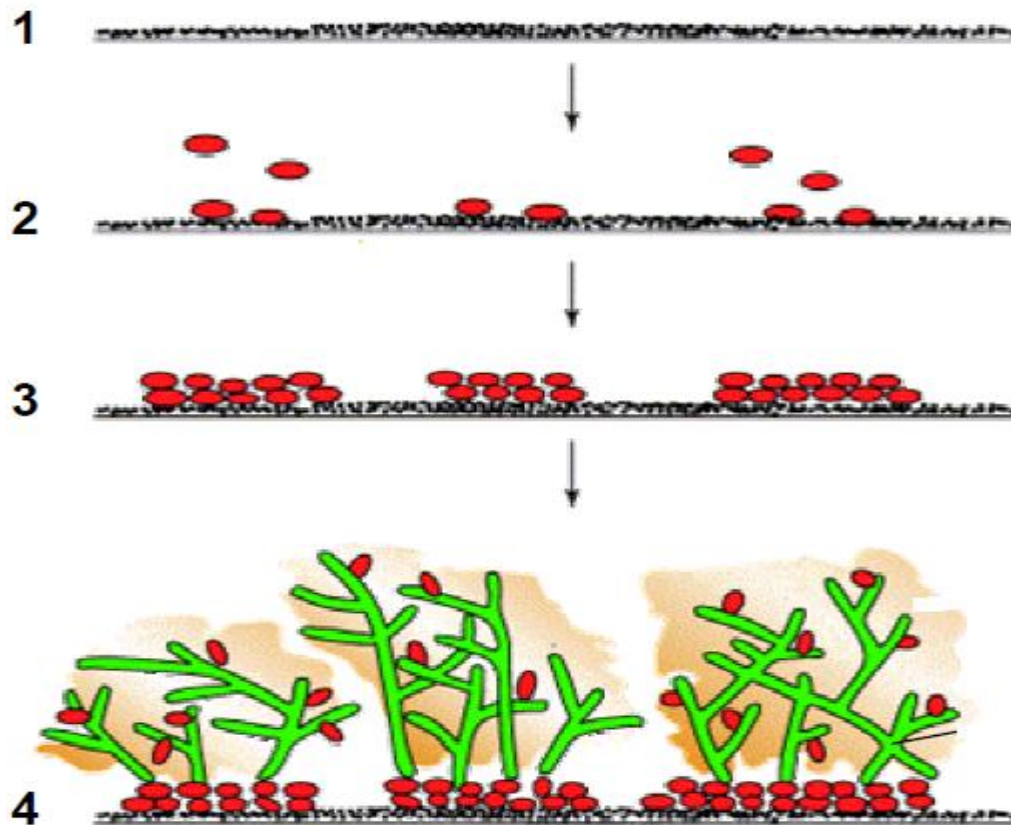


Figura 3- fases da formação do biofilme de *C. albicans* numa superfície de um cateter de PVC. **1** - Superfície do cateter com uma camada de substâncias condicionantes da adesão adsorvida (pontos pretos). **2** - Adesão primária das leveduras (vermelho) à superfície. **3** - Formação das camadas basais das microcolônias de leveduras, ficando cada microcolônia aderida à superfície. **4** - Conclusão da formação das microcolônias por adição da formação de hifas (verde) e da matriz polimérica (amarelo) extracelular que envolve as células. Biofilmes maduros contêm numerosas microcolônias com canais de água intercaladas para permitir a circulação de nutrientes. Noutras superfícies (por exemplo, fibras de celulose) são produzidas microcolônias inteiramente constituídos por células de levedura. (adaptado de Douglas *et al*, 2003).

1.3.1- Fatores de virulência

A patogenicidade de *C. albicans* é regulada por uma rede de fatores de virulência e pela interação com o sistema imunológico do hospedeiro. Estes fatores de virulência são essenciais para determinar o papel de patógenos oportunistas nas infeções. *C. albicans* interage com as células epiteliais em termos de adesão, invasão e dano celular. Os principais fatores de virulência são a morfogénese, biomoléculas de reconhecimento ao hospedeiro (adesinas), secreção de enzimas hidrolíticas, tais como lípases, fosfolípases e proteases, alternância fenotípica e trigmotropismo, ou seja, capacidade de reconhecer junções intercelulares na superfície da mucosa através de reconhecimento pelo contato,

promovendo a penetração. Todos estes mecanismos promovem a invasão da superfície mucosa e a capacidade deste microrganismo desencadear uma infecção (Naglik *et al*, 2003; Weindl, *et al*, 2010). A Figura 4 descreve as várias fases de invasão de *C. albicans*.

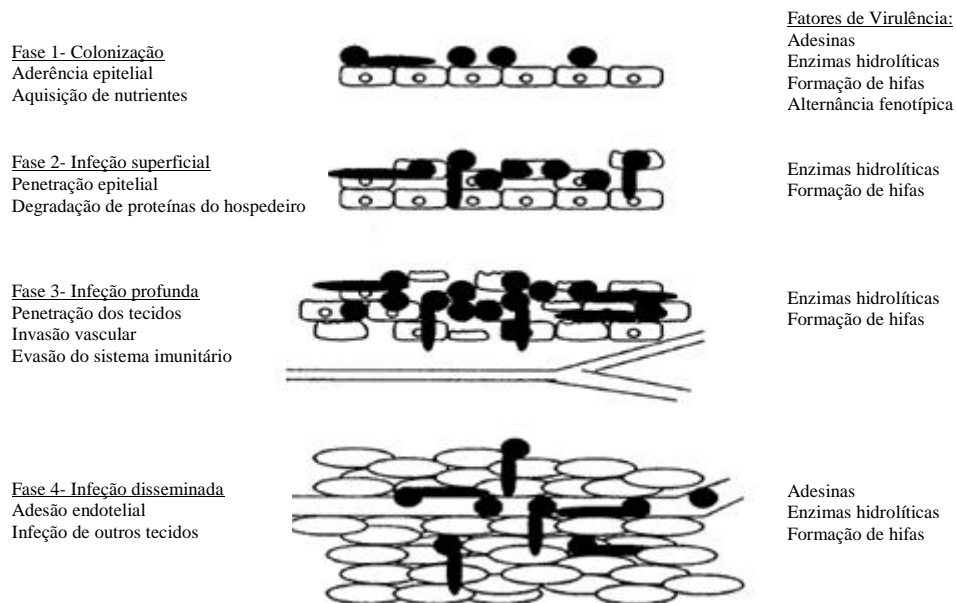


Figura 4- Diagrama esquemático ilustrando a contribuição dos vários fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade de *C. albicans*. Normalmente, *C. albicans* coloniza a superfície epitelial (fase 1) e provoca infecções superficiais (fase 2), mas em condições em que o hospedeiro está comprometido, o fungo estabelece infecções profundas (fase 3), penetrando mais para o tecido epitelial. Ocasionalmente, *C. albicans* causa infecções disseminadas (fase 4), que permitem o fungo colonizar e infetar outros tecidos do hospedeiro que podem ser fatais. Este processo infeccioso envolve numerosos fatores de virulência, incluindo adesinas, produção de enzimas hidrolíticas (proteínas Sap, fosfolipases e lipases), formação de hifas e alternância fenotípica. Sap2 (e possivelmente outras proteínas Sap) é conhecido por degradar muitas proteínas humanas, incluindo mucina, proteínas da matriz extracelular, numerosas moléculas do sistema imunológico, proteínas de células endoteliais e da coagulação e fatores de coagulação. Portanto, a ação das proteínas Sap estão envolvidas em todas as quatro fases de infecção e provavelmente reforça significativamente a capacidade patogénica de *C. albicans* (adaptado de Naglik *et al*, 2003).

1.3.2- Interação de *Candida albicans* com células do hospedeiro

A interação primária fungo-hospedeiro ocorre através da parede celular. A adesão ao hospedeiro, a evasão do sistema imune e a integridade estrutural das proteínas envolvidas constituem peças-chave para a infecção (Ekkehard *et al.*, 2011).

C. albicans apresenta proteínas específicas, as adesinas, responsáveis pela formação de biofilmes. Um grupo importante destas proteínas são as proteínas codificadas pela família de genes ALS (*agglutinin-like sequence*), que funcionam como aglutininas em

diferentes condições experimentais. As proteínas ALS são ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e a sua função é mediar a adesão entre células e substratos do hospedeiro. ALS 3 é a principal enzima desta família, sendo normalmente detetada *in vivo* em infecções vaginais e *in vitro* em células do epitélio oral. Também são conhecidas proteínas específicas relacionadas com a adesão de *C. albicans* ao epitélio, o que demonstra a eficiência deste fungo em colonizar superfícies do hospedeiro (Ekkehard *et al.*, 2011; Naglik *et al.*, 2003).

A infecção do epitélio oral por *C. albicans* é dividida em três fases, a adesão, a invasão e a destruição do tecido (Figura 5). Normalmente, o fungo encontra-se na forma de levedura, mas quando estes aderem, após o contato com as células epiteliais, rapidamente formam tubos germinativos e ocorre a diferenciação em hifas que penetram no epitélio. A interação resulta numa reorganização do citoesqueleto, mediada por recetor/ligando, envolvimento da hifa por estruturas semelhantes a pseudópodes provenientes da membrana e captação da célula fúngica. Este processo é conhecido como endocitose induzida, descrito também para bactérias patogénicas, como ocorre nos géneros *Salmonella* e *Shigella*. Pode ocorrer também a penetração ativa do fungo nas células do hospedeiro. A fase inicial de formação de hifas, adesão e endocitose induzida é seguida pela fase de invasão, que resulta na morte de células do hospedeiro por necrose ou apoptose, esta última em fase tardia da infecção, com consequente dano tecidual (Naglik *et al.*, 2003).

O dano no tecido aumenta com o tempo, na medida em que as hifas penetram nas camadas epiteliais mais profundas. Durante a colonização, *C. albicans* suprime a expressão de TLR4 pelo epitélio e não induz a produção de citocinas. A infecção, particularmente em pacientes predispostos, gera um aumento da secreção de citocinas, o que atrai células polimorfonucleares (PMNs) para o local de infecção. Posteriormente, ocorre a formação de TNF (fator de necrose tumoral) no local, que favorece a expressão de TLR4, protegendo a mucosa oral da invasão fúngica e promovendo a produção de peptídeos antimicrobianos (Weindl *et al.*, 2010).

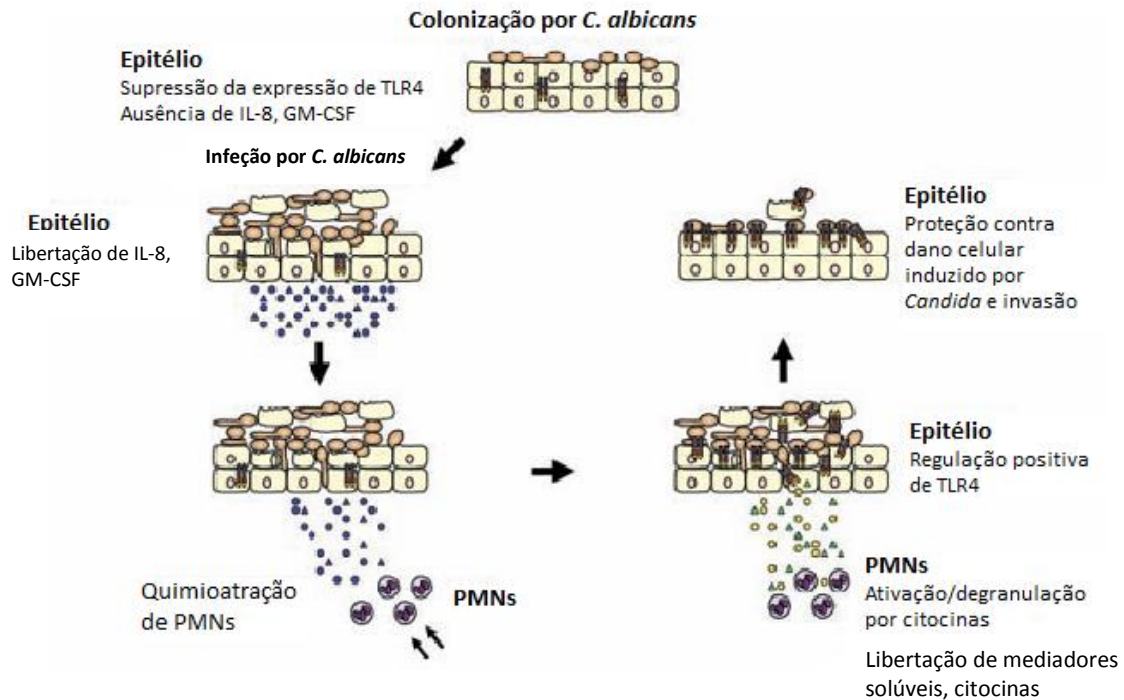


Figura 5- Representação das três fases da infecção oral por *C. albicans*: adesão, invasão e destruição do tecido (adaptado de WEINDL *et al*, 2000).

1.4- Macrófagos

Os **macrófagos** são células derivadas de monócitos presentes em tecidos e no peritônio dos animais. Quando presentes no sangue chamamos estas células de monócitos, porém ao transferirem-se para os tecidos estas diferenciam-se em macrófagos. A sua principal função é fagocitar antígenos (corpos estranhos) presentes no tecido. No entanto, possui uma função imunológica muito importante, apresentando os patógenos ao sistema imune. Os macrófagos são as principais células efetoras e possuem um papel crucial nas diversas fases de resposta inflamatória. Entre as suas funções está a ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa, por terem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos aos linfócitos T (Villacres-Erikson, 1995). Destacam-se também a capacidade de remoção de células apoptóticas (Aderem *et al.*, 1999), resolução de processos inflamatórios (Leibovich *et al.*, 1975), bem como reparo e remodelamento de dano tecidual (Werb *et al.*, 1975).

As respostas antifúngicas pelas células efetoras incluem a morte e a inibição do crescimento do fungo. Em geral, as células fagocíticas possuem atividade antifúngica intrínseca que pode ser potencializada por opsoninas ou citocinas derivadas de células T, o que indica que as respostas imune inata e adaptativa não funcionam de forma

independente, mas são reciprocamente reguladas (Romani *et al.*, 2002; Huffnagle *et al.*, 2003).

A ativação de macrófagos residentes confere ao hospedeiro maior resistência a infecções. Um macrófago ativado difere do residente em vários aspectos, como mudanças morfológicas, expressão de receptores na superfície celular, aumento de reagentes oxidativos (H_2O_2 , O^{2-} , OH^-) e nitrogenados (NO^-), e conseqüentemente um aumento da atividade microbicida e produção de citocinas. Em geral, macrófagos ativados fagocitam e matam microrganismos mais eficientemente que macrófagos residentes. *In vivo*, a ativação de macrófagos ocorre principalmente através da interação com linfócitos T e é mediado por citocinas, tais como interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), que podem estimular outras células ou os próprios macrófagos numa atividade autócrina (Maródi *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1998).

A citocina IFN- γ (interferão gama) é essencial para a resistência a infecções fúngicas. Pode ativar as funções fungicidas de macrófagos, restabelecendo a resposta imune celular em indivíduos imunodeprimidos (Vásquez-Torres *et al.*, 1997). Macrófagos ativados por IFN- γ podem produzir a interleucina 12 (IL-12), que é indicadora da resposta protetora contra infecções fúngicas, além de ser necessária para uma resposta celular eficiente (Cenci *et al.*, 1998; Kashino *et al.*, 2000).

TNF- α desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans*. Esta citocina é produzida principalmente por macrófagos, em resposta a infecções fúngicas e estimula a síntese de quimiocinas e moléculas de adesão por estes fagócitos, além de possuir ação estimuladora sobre a atividade candidicida destas células (Filler *et al.*, 2005). A citocina TNF- α pode também estimular a expressão de outras moléculas envolvidas na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans*. Entre estas moléculas incluem-se as moléculas de adesão, E-selectinas e VCAM-1, IL-8, fator ativação de plaquetas (PAF), que estão relacionadas à adesão, e do recrutamento de leucócitos (Filler *et al.*, 2005; Orozco *et al.*, 2000).

1.5- Adenosina trifosfato (ATP)

O ATP é encontrado em todas as células vivas e é reconhecido pelo seu papel intracelular no metabolismo energético (Agteresch *et al.*, 1999). No entanto, foi-se observando que este também tinha um papel importante em processos extracelulares.

Estudos sobre os efeitos do ATP extracelular e os seus produtos de degradação (ADP (adenosina-5'-difosfato), AMP (adenosina-monofosfato 5') e adenosina), bem como de outros nucleótidos, são observados em diferentes processos biológicos, incluindo neurotransmissão, contração muscular, vasodilatação, metabolismo ósseo, metabolismo do glicogênio hepático, agregação plaquetária, inflamação, resposta imune, entre outros (Agteresch *et al.*, 1999; Bours *et al.*, 2006). Assim, após décadas de estudos, ficou claro que o ATP e os seus produtos de degradação, assim como outros nucleótidos, fazem parte de um conjunto de moléculas, estabelecidas como mensageiros extracelulares, que exibem uma variedade de efeitos sobre os mais diversos tecidos e sistemas (Dombrowski *et al.*, 1998; Bours *et al.*, 2006).

Em condições normais, o ATP encontra-se praticamente todo no citoplasma celular (3-10 mM), enquanto no compartimento extracelular os níveis são mantidos na ordem dos nanomolar (1-10 nM) (Di Virgilio, 2005). As concentrações extracelulares de ATP, bem como de outros nucleótidos, podem ser aumentadas em resposta a diferentes estímulos ou condições, tais como lise celular, hipóxia e inflamação (Lazarowski *et al.*, 1997). O aumento do ATP extracelular pode ser interpretado como um “sinal de perigo”, este interage com os recetores purinérgicos específicos iniciando respostas inflamatórias caracterizadas pela libertação de diversas citocinas (Burnstock, 2006).

O sistema de sinalização purinérgica atua de forma integrada com outras células imunes no controlo do processo inflamatório. O ATP libertado para o espaço extracelular, rapidamente alerta o sistema imune para o dano celular que pode ser de origem endógena ou exógena (Bours *et al.*, 2006).

1.5.1- Ectonucleotidases

Um fator importante que modula a resposta mediada por nucleótidos é o metabolismo extracelular dos mesmos, catalisado pelas ectonucleotidases. Estas enzimas incluem as difosfohidrolase trifosfato ectonucleosidases (NTPDase), que catalisam a degradação sequencial de ATP para ADP e AMP, as pirofosfatase ectonucleotidases (NPP), que catalisam a hidrólise de ADP para AMP e de AMP para adenosina, as fosfatases alcalinas, que catalisam a degradação de ATP em ADP, ADP para AMP e de AMP para adenosina e por último as ecto-5'-nucleotidase (CD73), que catalisam a hidrólise de AMP para adenosina, as quais têm sido detalhadamente estudadas nos últimos anos (Zimmermann, 2001; Robson *et al.*, 2006).

Através de reações sucessivas, estas enzimas constituem uma cascata enzimática altamente eficiente, com capacidade de controlar a concentração e o tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no espaço extracelular (Zimmermann, 2001).

1.5.2- Adenosina

A adenosina, produto da hidrólise do ATP, também é considerada uma molécula sinalizadora de dano celular, exercendo em geral ações contrárias às do ATP extracelular (Bours *et al.*, 2006). Concentrações de adenosina em situações homeostáticas variam entre 10 a 200 nM, enquanto em situações de stress os níveis de adenosina variam entre 10 a 100 μ M (Fredholm, 2007). O aumento da concentração extracelular de adenosina ocorre em situações de isquemia, hipóxia ou trauma (Haskó *et al.*, 2004).

A adenosina age mediando uma resposta imunossupressora para proteger os tecidos adjacentes à inflamação dos ataques promovidos pelas células de defesa (Sitkovsky *et al.*, 2005). Estas ações imunes, envolvendo a adenosina, têm sido caracterizadas em diversos estudos. Em neutrófilos ativados, a adenosina inibe a produção do fator ativação de plaquetas (PAF), além de inibir a produção de proteínas inflamatórias em macrófagos (MIPs), que estão envolvidas na migração dos neutrófilos para o foco inflamatório (Stewart *et al.*, 1993). Em macrófagos, a adenosina provoca a diminuição da produção de IL-12, uma potente citocina pró-inflamatória, e de IFN- γ , molécula central na ativação de macrófagos (Haskó *et al.*, 1998).

1.5.3- Recetores purinérgicos

Os efeitos biológicos dos nucleótidos e nucleósidos são exercidos através da sensibilização de distintos recetores purinérgicos, denominados P1 e P2, os quais foram originariamente identificados por Burnstock e colaboradores (Burnstock, 1976; Burnstock, 1978). A variedade de respostas biológicas mediadas pelos recetores purinérgicos depende principalmente da distribuição destes na membrana das células, assim como a disponibilidade dos seus agonistas, os quais são produzidos pela ação de ectoenzimas localizadas na membrana plasmática e que catalisam a hidrólise sequencial dos nucleótidos até aos seus respetivos nucleosídeos no meio extracelular. Como consequência, o número de funções mediadas por esses recetores é amplo e varia desde a proliferação e

diferenciação celular, neurotransmissão até fenômenos mais complexos como fertilização, angiogênese e resposta imune (Burnstock, 2006).

Os receptores purinérgicos P1, para a adenosina, são divididos em quatro subtipos, A1, A2A, A2B e A3 (Abbracchio *et al.*, 1994), podendo ser identificados pela diferença de afinidade de ligação a agonistas e antagonistas e pela ativação de vias sinalizadoras acopladas à proteína-G (Palmer *et al.*, 1995).

Os receptores P2, que reconhecem principalmente ATP e UTP, são subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores do tipo P2X (1-7) são receptores ionotrópicos, estão ligados a canais iônicos, enquanto os receptores P2Y (1, 2, 4, 6, 11-14), que são receptores metabotrópicos, estão acoplados à proteína-G (Di Virgilio *et al.*, 2001; Robson *et al.*, 2006). A Figura 6 ilustra a estrutura dos receptores P2X, P2Y e P1.

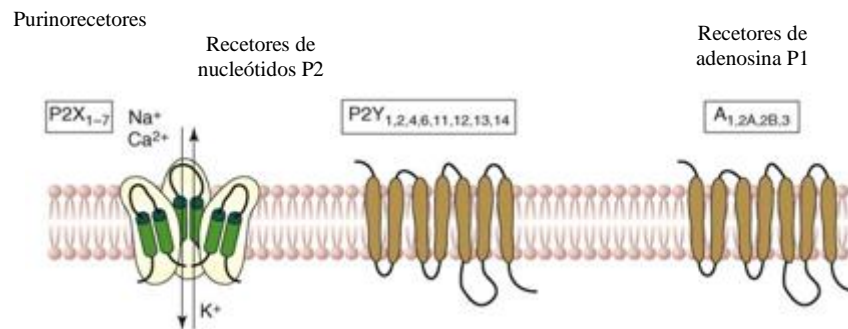


Figura 6- Estrutura dos receptores P2X, P2Y e P1 (Adaptado de Abbracchio *et al.*, 2009).

Objetivos

As infecções causadas por *C. albicans* têm aumentado significativamente nas últimas décadas, tornando-se importante perceber como estas leveduras interferem com os mecanismos de defesa do hospedeiro devido à capacidade que têm em evadir-se do sistema imunitário. Por outro lado, sabemos que o ATP é um importante sinalizador na ativação destes mecanismos de defesa, nomeadamente na ativação de macrófagos. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi tentar perceber qual era o papel do ATP durante a infecção de macrófagos com *C. albicans*, tanto na internalização como na viabilidade das leveduras internalizadas. Para a concretização deste objetivo utilizou-se uma linha celular de macrófagos de ratinhos, células RAW 264.7, e várias estirpes de *C. albicans* com diferentes atividades de ectonucleotidases.

Capítulo II

Material e Métodos

2- Material e Métodos

2.1-Estirpes de leveduras

Neste estudo utilizaram-se várias estirpes da levedura *C. albicans*, isoladas de hemoculturas (a partir de uma situação de candidemia) e depositadas na coleção de fungos patogênicos existentes na Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com a referência YP0037, YP0537, YP0569 e YP0831.

2.1.1- Meio de Cultura

Para a manutenção das diferentes estirpes de levedura utilizou-se um meio de cultura sólido, o meio de cultura YPD (“Yeast-Peptide-Dextrose”) em agar, sendo constituído com 0,5% de extrato de levedura (p/v), 1% bacto peptona (p/v), 2% de agar (p/v) e 2% de glucose, esterilizado em autoclave, à temperatura de 121 °C e à pressão de 1,2 atm, durante 20 minutos e por fim distribuído em placas de Petri.

2.1.2- Condições de crescimento da levedura

As estirpes foram mantidas em meio sólido YPD (“Yeast Peptide Dextrose”) e incubadas à temperatura de 30 °C durante pelo menos dois dias. Para os ensaios de internalização por macrófagos, as culturas de *C. albicans* foram repicadas no dia anterior ao dia do ensaio, no mesmo meio de cultura, e incubadas a 30 °C de modo a termos culturas frescas no dia do ensaio

2.2- Cultura de Macrófagos RAW 264.7

Para este estudo, foi usada uma linha celular de macrófagos RAW 264.7 de ratinhos, proveniente da “European Collection of Cell Cultures (ECACC catalog number 91062702).

As células RAW 264.7 são conservadas em azoto líquido. Para os ensaios *in vitro* as células foram descongeladas e semeadas em frascos de cultura com 75 cm² de área. O meio de cultura utilizado para a manutenção das células foi DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium-Sigma Chemical Co., St Louis, MO,USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino não inativado, 12 mM de bicarbonato de sódio, 11mg/ml de piruvato de sódio e 10 mM de tampão HEPES.

As células foram cultivadas à temperatura de 37 °C, com 5% de CO₂. Quando os frascos apresentavam uma confluência de aproximadamente 70% utilizavam-se as células para a realização das experiências.

2.2.1- Procedimento de sub-cultura dos macrófagos

Removeu-se o meio das células e lavou-se duas vezes com uma solução de PBS (“Phosphate Buffered Saline”), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM, Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7.4. De seguida, raspam-se as células do frasco e ressuspenderam-se em 10 ml de meio DMEM, para um tubo de falcon estéril. Colocaram-se 2 ml de meio com células mais 23 ml de meio DMEM em frascos de cultura com 75 cm² de área e foram cultivadas à temperatura de 37 °C, com 5% de CO₂. Quando se atingiu uma confluência de aproximadamente 70% lavaram-se, raspam-se e ressuspenderam-se as células como descrito anteriormente. Usaram-se estas células para a realização das experiências.

2.3-Ensaio de infeção de macrófagos por *C. albicans*

2.3.1- Infeção de macrófagos por diferentes estirpes de *C. albicans*

Para os ensaios de infeção com co-cultura de macrófagos e *C. albicans*, utilizaram-se placas *multiwell* de 96 poços. Para a preparação da suspensão celular utilizaram-se os macrófagos de acordo com o procedimento 2.2.1, procedendo-se de seguida à contagem de células em câmara de Neubauer, para ajustar a concentração de 1,25x10⁵ macrófagos/ml. São adicionados 100 µl desta suspensão a cada poço. São adicionados mais 100 µl de meio DMEM a cada poço de modo a ter um volume final de 200 µl. As placas foram incubadas à temperatura de 37 °C sob atmosfera de 5% CO₂, durante a noite (aproximadamente 18 h de modo a que no início do ensaio se tenha o dobro dos macrófagos colocados em cada poço).

No dia do ensaio, retirou-se o meio das placas, colocou-se novo meio, DMEM (100 µl) e voltou a incubar-se à temperatura de 37 °C com 5% CO₂.

Para a preparação da suspensão de células de levedura para a infeção dos macrófagos, ressuspendeu-se uma colónia de *C. albicans* em 0,5 ml de PBS. Centrifugou-se durante 5 minutos, à temperatura de 4 °C a 12000 rpm e repetiu-se mais uma vez este processo. De seguida diluíram-se as leveduras em 1 ml de meio DMEM e procedeu-se à contagem de células em câmara de Neubauer, para ajustar a quantidade de células de levedura a adicionar à cultura de macrófagos, 2,5x10⁵ células de levedura/ml. Adicionam-se 100 µl de leveduras a cada poço de modo a que o número de macrófagos seja igual ao número de leveduras.

Estas co-culturas prosseguiram à temperatura de 37 °C, sob atmosfera de 5% CO₂ durante 1 h. Ao fim deste tempo removeu-se o sobrenadante e lavou-se os poços com 200 µl de PBS, adicionando-se 200 µl de meio DMEM. Estas culturas prosseguiram, às mesmas condições de incubação, por 1,5 h e 3 h de infeção.

Após cada período de infecção (0 h, 1,5 h e 3 h), as placas *multiwell* foram retiradas da incubadora e foram mantidas em gelo enquanto se fazia a recolha dos sobrenadantes. O sobrenadante de cada poço foi centrifugado a 4 °C, durante 5 minutos, a 12000 rpm. De seguida transferiu-se o sobrenadante para novos eppendorfs e congelaram-se a -80 °C.

Após a recolha de todos os sobrenadantes, adicionou-se 200 µl de meio DMEM a cada poço mais 50 µl de Triton X-100 a 0,5%, e raspavam-se as células para eppendorfs em gelo. Adicionaram-se 250 µl de água estéril a cada poço e colheu-se para os eppendorfs, mantendo os eppendorfs em gelo.

2.3.2 – CFU (“colony forming unit” – unidade formadora de colónias) dos ensaios de infecção de macrófagos com *C. albicans*

Diluíram-se 100 µl das suspensões de células obtidas em 2.3.1 em 900 µl de água estéril e plaqueou-se 100 µl desta diluição em placas com meio sólido YPD. Incubou-se estas placas numa estufa com uma temperatura constante de 30 °C para permitir o crescimento das leveduras internalizadas pelos macrófagos. Após 3 dias foram feitas as contagens do número de colónias por placa. Uma colónia corresponde a uma célula de levedura viável (1 unidade formadora de colónias – 1 CFU).

2.3.3 - Infecção de macrófagos por *C. albicans* na presença de apirase (Sigma)

Seguiu-se o mesmo procedimento de 2.3.1 e 2.3.2, adicionando apirase, fazendo ensaios em que se adiciona a apirase desde o início da infecção, ao fim de 1 h de infecção (às 0 h) e um controlo sem apirase.

2.4- ATP extracelular

2.4.1- Quantificação de ATP extracelular

Para quantificar o ATP extracelular dos sobrenadantes das células RAW 264.7, obtidos no ensaio 2.3.1, utilizou-se o Kit “Bioluminescent assay Kit” (FL-AA, Sigma®), seguindo as indicações do fabricante. Primeiramente, construiu-se uma curva padrão com diluições seriadas, a partir de soluções padrão de diferentes concentrações de ATP (fornecidas pelo fabricante), usando o reagente, contendo a luciferase-luciferina, em meio DMEM. Imediatamente antes dos ensaios de quantificação de ATP, descongelaram-se os sobrenadantes, obtidos nas co-culturas de RAW 264.7. De seguida, colocaram-se 80 µl de cada sobrenadante numa placa *multiwell* de 96 poços e adicionou-se uma mistura de 40 µl luciferina-luciferase (Bioluminescent assay Kit, Sigma®) através do injetor automático. Posteriormente, os sobrenadantes foram medidos por um tempo de integração de 5 s na

plataforma de leitura VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer™), que nos fornece os valores da leitura de luminescência. Após obter os valores de luminescência de todas as amostras recorreu-se à curva padrão para calcular os níveis de ATP extracelular.

2.5- Análise Estatística

Os dados obtidos são as médias de um $n=3 \pm$ erro padrão. As diferenças entre grupos foram analisadas com o teste t de Student na plataforma GraphPad Prism 6 (CA, EUA), comparando com grupo de controlo respetivo, $p<0,05$, estatisticamente significativo.

Capítulo III

Resultados

3- Resultados

3.1- Viabilidade de diferentes estirpes de *C. albicans* em macrófagos (RAW 264.7)

Os macrófagos são as principais células efetoras e possuem um papel crucial nas diversas fases de resposta inflamatória em resposta à presença de organismos estranhos, tendo a capacidade de os fagocitar (Villacres-Erikson, 1995). Dentro da espécie *C. albicans* existe uma variedade de estirpes, devido à sua capacidade de alternância fenotípica, permitindo que este fungo tenha a capacidade de se adaptar a diferentes ambientes do hospedeiro durante a infecção (Naglik *et al.*, 2003). Esta levedura, o agente mais comum de infecções fúngicas, associado a uma elevada taxa de morbidade e mortalidade em seres humanos, tem a capacidade de evadir-se do sistema imunitário, provocando infecções em indivíduos com o sistema imunitário comprometido (Ekkehard *et al.*, 2011).

Com o objetivo de verificar a viabilidade das diferentes estirpes de *C. albicans* em macrófagos, foram realizados ensaios de infecção utilizando uma linha celular de macrófagos, células RAW 264.7, e várias estirpes de *C. albicans* isoladas de hemoculturas. As diferentes estirpes desta levedura (YP0037, YP0537, YP0569 e YP0831) apresentam diferenças na atividade basal de ectonucleotidases. As estirpes YP0537 e YP0831 têm uma elevada atividade de ectonucleotidases, enquanto que a estirpe YP0569 e a YP0037 têm uma baixa atividade destas enzimas (Ferreira, 2011) Culturas de macrófagos confluentes foram infetadas com *C. albicans* numa razão de macrófagos: levedura de 0,5-1:1.

Com o intuito de perceber se a diferença de atividade das ectonucleotidases interferia na viabilidade de *C. albicans*, internalizadas por macrófagos, fomos infetar os macrófagos com as várias estirpes mencionadas anteriormente. Depois da infecção esperou-se uma hora, com as placas incubadas à temperatura de 37 °C sob atmosfera de 5% CO₂, de modo a que as leveduras fossem internalizadas pelos macrófagos. Ao fim deste tempo removeu-se o sobrenadante, lavou-se com PBS e adicionou-se meio fresco (DMEM), de modo a que apenas se medisse a viabilidade das leveduras internalizadas pelos macrófagos (este é o nosso tempo 0 h). Seguiu-se a infecção pelos tempos 1,5 h e 3 h.

Observou-se que a diferença de atividade de ectonucleotidases não interfere na internalização de leveduras pelos macrófagos, pois, como podemos observar na Figura 7, a formação de CFU às 0 h é semelhante para todas as estirpes, ou seja, o número de leveduras internalizadas pelos macrófagos é praticamente igual para as diferentes estirpes.

À 1,5 h verifica-se que as leveduras estão a morrer, pois o número de CFU está a diminuir, não se verificando diferenças significativas na viabilidade entre as diferentes estirpes. Às 3 h observa-se um ligeiro aumento das CFU, indicando que as leveduras estão a morrer mais lentamente e até a dividir-se.

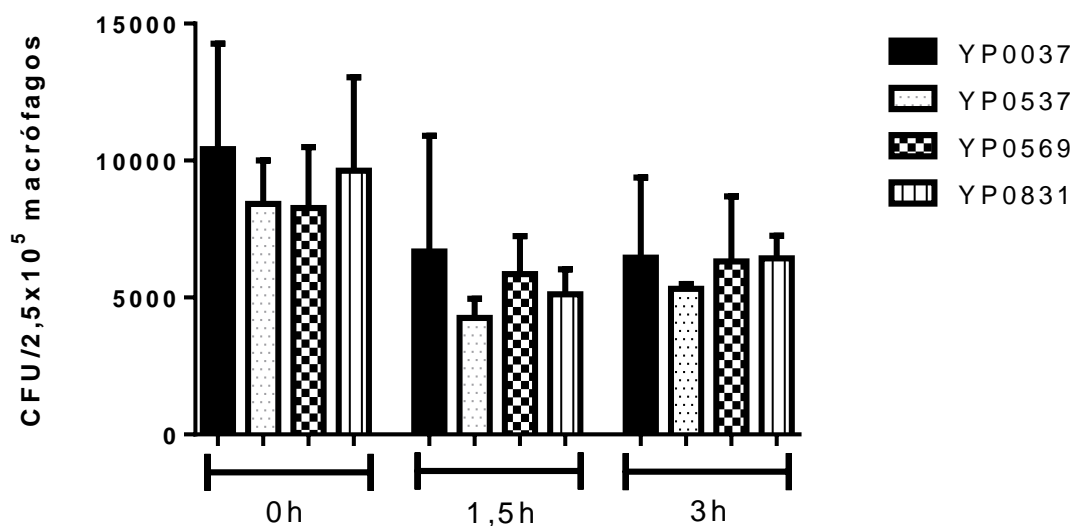


Figura 7- Variação do número de leveduras viáveis após co-cultura com macrófagos RAW 264.7. CFU total da co-cultura, de todos os macrófagos presentes durante a infeção.

De modo a perceber melhor o gráfico apresentamos de seguida uma tabela com a viabilidade de cada estirpe às 3 h.

Tabela I- Percentagem de morte das leveduras internalizadas pelos macrófagos.

Estirpe	Morte de <i>C. albicans</i> às 3 h (%)
YP0037	38,1
YP0537	36,8
YP0569	23,6
YP0831	33,2

A percentagem de morte foi calculada da seguinte forma: $\% \text{ Morte} = \frac{CFU\ 0\ h - CFU\ 3\ h}{CFU\ 0\ h} \times 100$

Através da Tabela I verificamos que a viabilidade das leveduras é semelhante para todas as estirpes, na casa dos 30%, observando-se apenas uma ligeira diferença em relação à estirpe YP0569 com uma morte de aproximadamente 24%, ou seja inferior às outras estirpes. Parece indicar que esta estirpe tem uma suscetibilidade menor à morte por ação dos macrófagos.

3.2- Quantificação do ATP extracelular na infeção de macrófagos por diferentes estirpes de *C. albicans*

O ATP é encontrado em todas as células vivas, sendo uma fonte de energia envolvida em numerosos processos celulares (Agteresch *et al.*, 1999). No entanto, foi-se observando que este também tinha um papel importante em processos extracelulares, nomeadamente funcionando como uma molécula sinalizadora (Bours *et al.*, 2006).

A libertação de ATP para o exterior, por parte dos macrófagos, pode ser interpretado como um “sinal de perigo”, interagindo com os recetores purinérgicos específicos e iniciando respostas inflamatórias (Burnstock, 2006).

Através da recolha dos sobrenadantes, ao fim duma hora de infeção (0 h), e de 1,5 h e 3 h (depois de adicionar meio fresco), obtidos a partir do ensaio de infeção realizado em 3.1, foi-se estudar a concentração de ATP extracelular durante a infeção de macrófagos com *C. albicans*. Foi utilizado um método de bioluminescência, tal como descrito no capítulo dos materiais e métodos. Através duma curva de calibração, que correlaciona as diferentes concentrações de ATP conhecidas com os valores de luminescência, determinou-se os valores de concentração de ATP extracelular nos diferentes tempos de interação de macrófagos com *C. albicans*.

Como se pode observar na Figura 8, ao fim de uma hora de infeção dos macrófagos com as diferentes estirpes de *C. albicans* ocorreu um aumento da concentração de ATP extracelular, em relação ao controlo. O controlo corresponde apenas a macrófagos não infetados. Entre as diferentes estirpes de *C. albicans* a concentração de ATP extracelular é muito semelhante, não se observando diferenças significativas. Comparando estes valores com as concentrações de ATP extracelular ao fim de 1,5 h, depois de mudar o meio e adicionar meio fresco, verifica-se que estas são semelhantes, mantendo-se os níveis de ATP extracelular. Estas concentrações são superiores às do controlo, logo está a haver uma resposta à presença das leveduras. Novamente, não se verificam diferenças significativas entre as diferentes estirpes. Às 3 h verifica-se uma diminuição da concentração do ATP extracelular comparando com as 1,5 h, sendo que esta concentração é semelhante entre as diferentes estirpes. No entanto, comparando com o controlo, verifica-se que ainda há um aumento da concentração do ATP extracelular. Sendo assim, no período de tempo em que se estudou a infeção de macrófagos com *C. albicans*, a concentração de ATP extracelular mantém-se sempre superior à dos macrófagos não infetados.

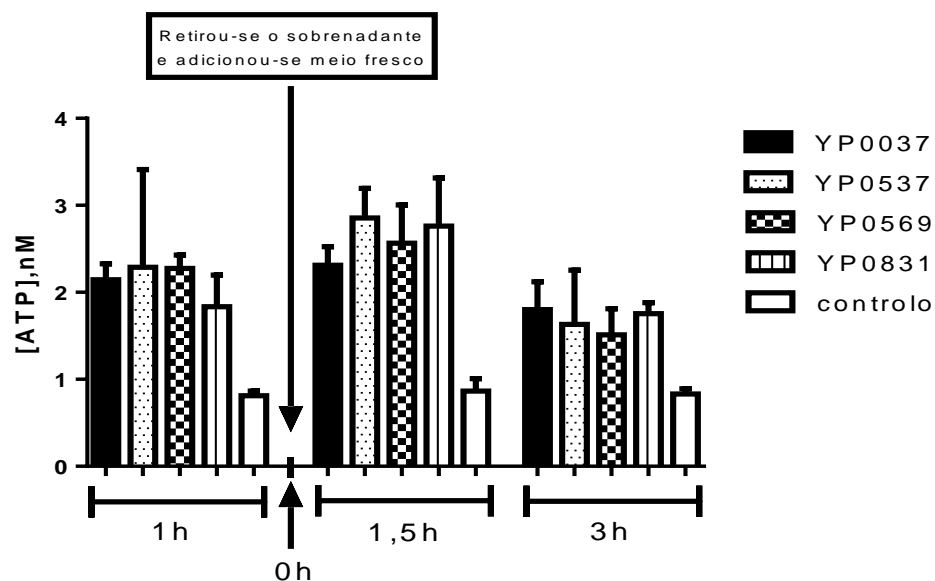


Figura 8- Concentração extracelular de ATP em macrófagos infectados com *C. albicans*.

3.3- Viabilidade de *C. albicans* em macrófagos (RAW 264.7) na ausência de ATP extracelular

O ATP funciona como um sinal de perigo nos macrófagos, alertando o sistema imunitário para a presença de organismos patogénicos, tais como *C. albicans*. Os recetores P2 para o ATP, nomeadamente os P₂X₇, presentes nas membranas celulares, são cruciais para que os macrófagos possam destruir os vários tipos de patogénios intracelulares, sendo necessário um controlo muito rigoroso do ATP extracelular, pois pode induzir a morte de macrófagos não infectados (Coutinho-Silva *et al*, 2007). Existe ainda um catabolismo extracelular por ectonucleotidasas reguladoras para o ATP extracelular. As ectonucleotidasas apresentam o local ativo voltado para o meio extracelular e estão presente na membrana dos macrófagos, sendo que também é descrita em vários microrganismos, tais como *C. albicans* (Zimmermann *et al*, 2012). Durante a infeção as ectonucleotidasas presentes nos macrófagos vão ser ativadas, degradando o ATP extracelular levando à formação de adenosina, sendo que este é um sinal “STOP” para o sistema imunitário. Este mecanismo impede que o sistema imunitário seja superativado e comece a destruir as células do próprio organismo (Coutinho-Silva *et al*, 2007; Save *et al*, 2010; Vylkova *et al*, 2007).

Com o objetivo de perceber qual a influência do ATP extracelular na internalização e na viabilidade de *C. albicans* fomos infectar macrófagos, células RAW 264.7, com duas estirpes de *C. albicans*, YP0537 e YP0569 isoladas de hemoculturas. Neste ensaio, para

ambas as estirpes, infetámos os macrófagos na presença de apirase, que é uma enzima que degrada o ATP em ADP e AMP (Roux *et al*, 2007), sem apirase e adicionando apirase 1 h após a infeção e após retirar o sobrenadante. Nestas condições a apirase é adicionada quando já não há leveduras extracelulares. Todas as que não foram internalizadas pelos macrófagos foram retiradas juntamente com o sobrenadante. Desta forma, nestas condições, apenas se estuda o efeito de apirase sobre a eficiência dos macrófagos na eliminação das células de levedura internalizadas. Culturas de macrófagos confluentes foram infetadas com *C. albicans* numa razão de macrófagos: levedura de 0,5-1:1. A infeção seguiu-se por 1,5 h e 3 h em todas as situações.

Observou-se que a presença de apirase não tem influência na internalização de *C. albicans* por parte dos macrófagos, pois como podemos ver na Figura 9, tanto na estirpe YP0569 como na YP0537, o número de CFU às 0 h é semelhante com apirase ou sem apirase. A presença de apirase leva a uma maior morte de leveduras ao longo do tempo; o número de CFU às 3 h reduziu para aproximadamente metade, em ambas as estirpes, enquanto que nos ensaios sem apirase se verifica que a morte das leveduras não é tão acentuada, não há uma redução tão grande de CFU às 3 h em relação às 0 h. Por outro lado, quando adicionamos apirase à 1 h, ou seja quando já só há leveduras dentro dos macrófagos, observa-se que às 3 h a morte de leveduras é superior às dos ensaios na ausência de apirase. A diminuição de CFU entre as 0 h e as 3 h é maior, aproximando-se dos valores da morte de leveduras na presença de apirase.

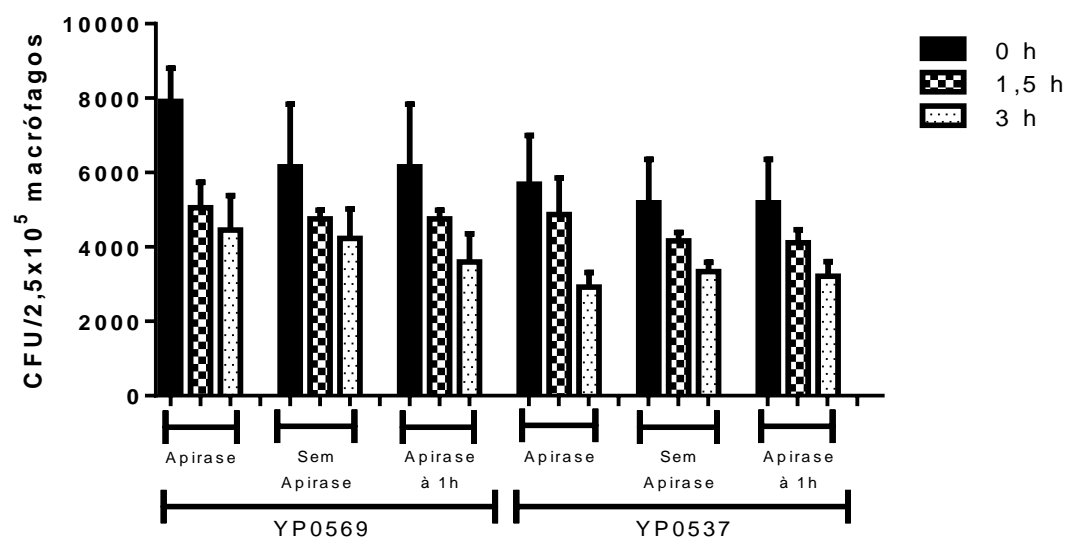


Figura 9- Efeito da apirase na variação da viabilidade de leveduras em macrófagos. CFU total da co-cultura, de todos os macrófagos presentes durante a infeção.

De modo a entender melhor o gráfico apresentamos de seguida uma tabela com a viabilidade celular de cada estirpe às 3 h, em todas as condições.

Tabela II- Efeito da apirase na morte de *C. albicans* por ação de fagocitose.

Estirpe	Morte de <i>C. albicans</i> às 3 h (%)		
	Com apirase	Sem apirase	Apirase à 1 h
YP0537	48,7	35,6	38,1
YP0569	43,8	31,2	41,5

A percentagem de morte foi calculada da seguinte forma: $\% \text{ Morte} = \frac{\text{CFU } 0 \text{ h} - \text{CFU } 3 \text{ h}}{\text{CFU } 0 \text{ h}} \times 100$

Através da Tabela II verificamos que na presença de apirase, para a estirpe YP0537, há uma morte celular de mais de 13% do que sem apirase e aquando da adição de apirase à 1h a percentagem de morte está a aumentar, provavelmente aproximando-se dos valores obtidos do ensaio com a presença de apirase. No caso da estirpe YP0569, verificamos que a presença de apirase provoca uma morte de leveduras de mais de 12%, comparando com os valores obtidos no ensaio que não tem apirase. Em relação à adição de apirase à 1 h observamos uma morte de leveduras muito semelhante ao ensaio na presença de apirase, embora inferior.

Capítulo IV

Discussão

4- Discussão

Nas últimas duas décadas as infecções provocadas por *C. albicans* têm aumentado substancialmente, sendo esta cada vez mais responsável pela morbidade e mortalidade em seres humanos. A variedade de estirpes de *C. albicans*, devido à sua capacidade de alternância fenotípica, permite que este fungo tenha a capacidade de se adaptar a diferentes ambientes do hospedeiro durante a infecção (Naglik *et al.*, 2003). Esta levedura faz parte da flora normal do Homem, residindo em equilíbrio com a flora microbiana e com o sistema imunitário. No entanto, quando o sistema imune está comprometido *C. albicans* torna-se patogénica, podendo provocar graves infecções (Santos *et al.*, 2006). Em resposta a estas infecções, os macrófagos possuem um papel crucial, iniciando diversas fases da resposta inflamatória, entre as quais destacamos a capacidade de fagocitar (Villacres-Erikson, 1995). O ATP é reconhecido pelo seu papel no funcionamento da célula no processo de armazenamento de energia (Agteresch *et al.*, 1999), no entanto, este também desempenha um papel importante como sinalizador no meio extracelular (Bours *et al.*, 2006). Elevadas concentrações de ATP extracelular podem ser interpretadas como um “sinal de perigo”, interagindo com os recetores purinérgicos específicos, e iniciar uma resposta inflamatória. Este sistema de sinalização purinérgica atua de forma integrada com outras células imunes no controlo do processo inflamatório (Burnstock, 2006). De maneira a modular a resposta mediada por nucleótidos, existe um metabolismo extracelular regulado por ectonucleotidases, presentes na membrana dos macrófagos. Sabe-se também que existem ectonucleotidases em *C. albicans* (Zimmermann *et al.*, 2012).

Com o objetivo de perceber se uma maior ou menor taxa de atividade de ectonucleotidases, presentes em *C. albicans*, interferiam na internalização das leveduras, por parte dos macrófagos, e na sua viabilidade no interior destes, realizamos vários ensaios de infecção usando uma linha celular de macrófagos, células RAW 264.7, e várias estirpes de *C. albicans* com diferentes níveis de atividade de ectonucleotidases. Através de resultados obtidos pelo grupo (Ferreira, 2011), em que se mediu a atividade de todas as ectonucleotidases presentes nas várias estirpes utilizadas, sabíamos que as estirpes YP0537 e YP0831 têm uma elevada atividade de ectonucleotidases, enquanto que as estirpes YP0569 e YP0037 têm uma baixa atividade destas enzimas. Ao fim de uma hora de infecção, ao tempo zero horas, a internalização de *C. albicans* é semelhante para todas as estirpes, deduzindo então que a diferença de atividade de ectonucleotidases das diferentes estirpes não interfere com a capacidade de internalização dos macrófagos. A resposta dos macrófagos à presença de fungos, tais como *C. albicans*, inclui a morte e inibição do

crescimento destes (Huffnagle *et al.*, 2003). De facto, à uma hora e meia de co-cultura podemos verificar que as leveduras estão a morrer. Por outro lado, observamos que a viabilidade das diferentes estirpes é semelhante, concluindo que a diferença de atividade das ectonucleotidasas não influencia a viabilidade de *C. albicans*. Após fagocitose por macrófagos, ao fim de três horas de infeção observa-se um ligeiro aumento de CFU, que pode ser explicado na medida em que, após a internalização das leveduras, estas continuam a crescer e a sofrer gemulação no interior dos macrófagos (Coutinho-Silva *et al.*, 2007). Devido a isso há um ligeiro aumento das CFU formadas, uma vez que cada célula filha viável irá dar origem a uma CFU.

Um mecanismo de defesa dos macrófagos contra organismos patogénicos, é a libertação de ATP para o exterior. Este pode ser interpretado como um “sinal de perigo” e iniciar uma resposta inflamatória (Burnstock, 2006). Procedeu-se então à quantificação do ATP extracelular nos sobrenadantes obtidos nos ensaios de infeção. Os resultados obtidos mostraram que ao fim de uma hora de infeção há um aumento do ATP extracelular, comparando com o grupo controlo, macrófagos não infetados com *C. albicans*. Pode concluir-se então que existe uma resposta inflamatória dos macrófagos à presença organismos patogénicos, neste caso de *C. albicans*, com a libertação de ATP para o meio extracelular, o que está de acordo com a literatura (Bours *et al.*, 2006). Estirpes com diferentes atividades de ectonucleotidasas apresentam a mesma variação nos níveis de ATP extracelular. Uma possível explicação para este facto reside na medição das ectonucleotidasas. A metodologia de medição dos níveis de atividade das ectonucleotidasas usada (Ferreira, 2011) mede a atividade de todas as ectonucleotidasas, e em condições basais. Neste trabalho utilizou-se sempre o modelo de infeção de macrófagos e portanto poderá ocorrer alterações nessas atividades que não foram aferidas. Depois de adicionar meio fresco observamos que ao fim de uma hora e meia de infeção os níveis de ATP extracelular estão aumentados em relação ao controlo, deduzindo que ainda está a haver uma resposta inflamatória por parte dos macrófagos à presença das leveduras, não havendo novamente diferenças significativas entre as diferentes estirpes. Às três horas de infeção observamos que a concentração de ATP extracelular ainda está aumentada em relação ao controlo, no entanto a concentração deste está diminuída em relação aos outros tempos. Isto poderá dever-se ao facto de haver uma adaptação das leveduras ao ambiente do hospedeiro (Naglik *et al.*, 2003), diminuindo a resposta inflamatória dos macrófagos. Ou seja, podemos supor que as leveduras “enganam” os mecanismos de defesa dos macrófagos de modo a que estes não sejam capazes de matar as leveduras, não se conhecendo os mecanismos que estas usam para se evadirem do sistema imunitário.

Existem várias vias de ativação dos macrófagos em resposta à presença de organismos patogênicos. Entre essas vias podemos destacar a produção de citocinas, tais como interleucinas e IFN- γ , e TNF- α (Maródi *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1998). Como já referimos anteriormente, sabemos que o ATP também desempenha um papel importante na defesa dos macrófagos contra microrganismos patogênicos, tendo a capacidade de ativá-los em resposta à infecção. No entanto, existe um mecanismo de regulação dos níveis de ATP extracelular, regulado por ectonucleotidases, que permite que o sistema imunitário não seja superativado e comece a destruir as células do próprio organismo. A CD73 tem um papel fundamental nesta regulação, pois é esta enzima que leva à formação de adenosina, o sinal “STOP” do sistema imunitário (Coutinho-Silva *et al.*, 2007). Com o objetivo de perceber qual era o papel do ATP durante a infecção de macrófagos por *C. albicans* realizamos vários ensaios de infecção de macrófagos, células RAW 264.7, com *C. albicans*, em que uma condição era a presença de apirase durante todo o tempo de infecção, esta que degrada o ATP extracelular em ADP e AMP (Roux *et al.*, 2007), outro em que nunca houve contato com apirase e outra em que adicionamos apirase ao fim de uma hora de infecção, no tempo zero horas. Estes ensaios foram realizados com duas estirpes de *C. albicans* (YP0537 e YP0569) deixando-se interagir as leveduras com os macrófagos durante uma hora de modo a que estas fossem internalizadas. Observou-se então, que para ambas as estirpes não há diferença na internalização das leveduras com apirase ou sem apirase, portanto a ausência de ATP extracelular não vai interferir na internalização das leveduras por parte dos macrófagos. Por outro lado, verificou-se que a presença de apirase vai interferir na viabilidade das leveduras, efeito observado em ambas as estirpes. Na verdade, ao contrário do esperado, vai haver um aumento da morte de *C. albicans*. Portanto, podemos concluir que a ausência de ATP extracelular vai aumentar a morte das leveduras internalizadas pelos macrófagos. Segundo Fausther e colaboradores (2012) elevadas concentrações de ADP extracelular são inibidoras da CD73, enzima responsável pela formação de adenosina, sinal stop do sistema imunitário. Assim, quando da adição de apirase vai haver um elevado metabolismo de degradação do ATP em ADP e AMP, deixando de haver ATP extracelular e havendo elevados níveis de ADP e AMP, portanto as elevadas concentrações de ADP vão inibir a CD73 diminuindo a formação de adenosina. Ou seja, não vai estar presente o sinal de ativação dos macrófagos, o ATP, nem o sinal “STOP” do sistema imunitário, a adenosina. No entanto, estão presentes outros mecanismos de ativação dos macrófagos, tais como citocinas e TNF- α . Assim, mesmo na ausência de ATP extracelular, os mecanismos de defesa do macrófago estão ativos mas o mecanismo de parar o sistema imunitário, através da adenosina, pode não estar presente, por inibição da CD73, resultando

numa maior morte de *C. albicans*, situação observada nos nossos ensaios.

Capítulo V

Conclusão

5- Conclusão

As infeções causadas por *C. albicans* constituem um importante e crescente problema de Saúde Pública, pois a sua incidência tem aumentado gradualmente nas últimas décadas, estando associada a uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade em seres humanos. Visto que estas leveduras fazem parte da flora normal do Homem, vivendo de uma forma comensal, torna-se importante perceber a capacidade que este microrganismo tem em evadir-se do sistema imunitário. Os macrófagos possuem um papel crucial nas diversas fases de resposta inflamatória tendo a capacidade de responder à presença de organismos patogénicos. Sabemos que o ATP tem a capacidade de ativar o sistema imunitário respondendo à presença destes microrganismos, nomeadamente na ativação dos macrófagos, então tentou-se perceber qual era o papel deste na interação de *C. albicans* com estas células defensoras. Primeiramente tentou perceber-se se as diferentes estirpes de *C. albicans*, com diferentes atividades intrínsecas de ectonucleotidases, interferiam na internalização e na viabilidade das leveduras em macrófagos, verificando-se que não havia diferenças significativas entre as diferentes estirpes. No entanto, não podemos tirar conclusões mais detalhadas através destes resultados devido ao facto de não se saber quais as ectonucleotidases que estão a interferir numa medição de maior ou menor atividade destas enzimas e pelas condições diferentes em que decorreram os ensaios. Fez-se ainda uma medição do ATP extracelular. Através dos resultados obtidos, traduzidos num aumento do ATP extracelular em comparação com o controlo, concluímos que efetivamente existe um mecanismo de defesa dos macrófagos, em resposta à presença de *C. albicans*, que se traduz na libertação de ATP para o meio extracelular de modo a que estes sejam ativados e iniciem uma resposta inflamatória. Numa outra fase, realizaram-se ensaios na presença e ausência de ATP extracelular. Através destes resultados concluímos que a presença ou ausência de ATP extracelular não interfere na internalização de *C. albicans* por parte dos macrófagos. Ainda mais, a ausência de ATP extracelular não se transmite numa não ativação dos macrófagos em resposta à presença de *C. albicans*, pois na ausência de ATP extracelular as leveduras continuam a morrer e até a morrer mais do que na presença deste. Este facto dever-se-á a um aumento excessivo da concentração extracelular de ADP (devido à presença de apirase que degrada o ATP em ADP e AMP). Este aumento excessivo de ADP leva á inibição da enzima CD73 o que faz com que não haja produção de adenosina, logo não há sinal stop do sistema imunitário. Portanto, não está presente nem o sinal “STOP”, a adenosina, nem um dos sinais de ativação, o ATP, do sistema imunitário mas estão presentes outros mecanismos de ativação dos macrófagos, levando a que estes estejam

mais ativos traduzindo-se numa maior morte de *C. albicans*. Como mera suposição, através dos resultados obtidos, podemos pensar que *C. albicans* liberta ATP para o meio extracelular e através das suas ectonucleotidasas degradam-no levando a um aumento da produção de adenosina e conseqüentemente pararem o sistema imunitário, conseguindo evadirem-se das defesas do hospedeiro e vivendo numa forma comensal.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

6- Referências Bibliográficas

Abbracchio, M.P. et al. (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32(1):19-29.

Abbracchio M.P., Saffrey M.J., Póquer V., Burnstock G. (1994) Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience*. 59:67-76.

Aderem A., Underhill D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 17, p. 593-623, 1999.

Agteresch H. J., Dagnelie P. C., van den Berg J. W., Wilson J. H. (1999) Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58(2): 211–232.

Alangaden G.J. (2011) Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*. 25:201-225.

Baron S. (1996) *Medical Microbiology*. 4a edição, University of Texas Medical Branch.

Bours M.J., Swennen E.L., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 112(2):358-404.

Burnstock G (2006). Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found Sym.* 276:26-48.

Burnstock G (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones. *Raven Press, New York*. pp. 107-118.

Burnstock G. (1976) Purine nucleotides. *Adv Biochem Psychopharmac.* 15:225-235.

Castón-Osorio J.J., Rivvero A., Torre-Cisneros J. (2008) Epidemiology of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32(2):S103-S109.

- Coutinho-Silva R., Cruz C.M., Persechini P.M., Ojcius D.M. (2007) The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. *Purinergic Signalling*. 3:83-90.
- Di Virgilio F. (2005) Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*. 1:205–209.
- Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J.M., Morrelli A., Torboli M., Bolognesi G., Baricordi O.R. (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 97:587-600.
- Dombrowski K.E., Ke Y., Brewer K. A., Kapp J.A. (1998) Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev*. 161:111-118.
- Dwyer k., S. Deaglio. (2007) CD39 and Control of Cellular Immune Response. *Purinergic Signalling*. 3:171-180.
- Ekkehard H., Zavrel M., Hauser N. *et al.* (2011) Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host – Focus on the function of cell wall proteins. *International Journal of Medical Microbiology*. 301:384-389.
- Fausther M., Lecka J., Soliman E., Kauffenstein G., Pelletier J., Sheung N., Dranoff J.A., Sévigny J. (2012) Coexpression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with specific) NTPDases differentially regulates adenosine formation in the rat liver. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 302:447-459.
- Ferreira H. (2011) A importância das ectofosfatases na patogenicidade de *Candida albicans*. Tese de Mestrado em Microbiologia Molecular, Universidade de Aveiro.
- Filler S.G., Yeaman M.R., Sheppard D.C. (2005) Tumor Necrosis Factor Inhibition and Invasive Fungal Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 41:208–212.
- Firinu D. Massidda O. Lorrai M.M. *et al.* (2011) Successful treatment of chronic mucocutaneous candidiasis caused by azole-resistant *Candida albicans* with posaconazole. *Clinical and Developmental Immunology*. v. 2011, article ID 283239, 4 pages.

- Fredholm B.B. (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 14:1315-1323.
- García-Ruiz J. C., Amutio E., Pontón J. (2004) Invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Revista Iberoamericana de Micología.* 21:55-62.
- Haskó G., Cronstein B.N. (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25(1):33-39.
- Haskó G., Nemeth Z.H., Vizi E.S., Salzman A.L., Szabo C. (1998) An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon- γ production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol.* 358(3):261-268.
- Huffnagle G. B., Deepe jr G. S. (2003) Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Current. Op. Microbiol.* 6:344-350.
- Lazarowski E.R., Homolya L., Boucher R.C., Harden T.K. (1997) Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. *J Biol Chem.* 272(33):20402–20407.
- Leibovich S. J., Ross R. (1975) The role of macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *American Journal of Pathology* 78:71-100.
- López-Ribot J.L., Casanova M., Murgui A. *et al.* (2004) Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 41:187-196.
- Maródi L., Forehand J.R., Johnston Jr. R.B. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. II. Biochemical basis for the killing of *Candida* by mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 146(8):2790-2794.
- Murphy G.M., Yang L., Cordell B. (1998) Macrophage Colony-stimulating Factor Augments β -Amyloid-induced Interleukin-1, Interleukin-6, and Nitric Oxide Production by Microglial Cells. *J. Biol. Chem.* 273(33):20967-20971.

- Naglik J. R., Challacombe S.J., Hube B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(3): 400-428, 2003.
- Orozco A.S., Zhou X., Filler S.G. (2000) Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. *Infect. Immun.* 68(3):1134-1141.
- Ostrosky-Zeichner L., Pappas P.G. (2006) Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*. 34(3):857-863.
- Palmer T.M., Stiles G.L. (1995) Neurotransmitter receptors, VII. Adenosine receptors. *Neuropharmacol.* 34:683-694.
- Rentz A.M., Halpern M.T., Bowden R. (1998) The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clinical Infectious Diseases*. 27(4):781-788.
- Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H. (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationship and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2:409-430.
- Romani L., Bistoni F., Puccetti P. (2002) Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Tren. Microbiol.* 10(11):508-514.
- Roux S.J., Wu J., Steinebrunner I., Sun Y., Butterfield T., Torres J., Arnold D., Gonzalez A., Jacob F., Reichler S. (2007) Apyrases (Nucleoside Triphosphate-Diphosphohydrolases) Play a Key Role in Growth Control in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 144:961–975.
- Santos A.L.S., Carvalho I.M., Silva B.A. *et al.* (2006) Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 46(2):209-220.

- Save S., Persson K. (2010) Extracellular ATP and P2Y Receptor Activation Induce a Proinflammatory Host Response in the Human Urinary Tract. *Infection And Immunity*. 78(8):3609-3615.
- Seider K., Heyken A., Lüttich A. *et al.* (2010) Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Current Opinion in Microbiology*. 13(4):392-400.
- Sitkovsky M.V., Ohta A. (2005) The “danger” sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?. *Trends Immunol.* 26(6):299-304.
- Stewart A.G., Harris T. (1993) Adenosine inhibits platelet-activating factor, but not tumour necrosis factor- α -induced priming of human neutrophils. *Immunology*. 78:152-158.
- Subdery P., Kim J. (2011) *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*. 49(2):171-177.
- Thompson D.S., Carlisle P.L., Kadosh D. (2011) Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 10(9):1173-1182.
- Villacres-Eriksson M. (1995) Antigen presentation by naïve macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 102:46-52.
- Vylkova S., Sun J.N., Edgerton M. (2007) The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. *Purinergic Signalling*. 3:91–97
- Weindl G., Wagener J., Schaller M. (2010) Epithelial cells and innate antifungal defense. *Journal of Dental Research*. 89(7):666-675.
- Werb Z., Gordon S. (1975) Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142:346-360.

Zimmermann H., Zebisch M., Sträter N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling*. 8:437–502

Zimmermann H. (2001) Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res*. 52:44-56.